

50
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

INFLUENCIA DE LOS LIPIDOS EN LA
BIODISPONIBILIDAD DEL ACIDO ACETIL
SALICILICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
JOSE LINO GOMEZ BRINGAS

ASESOR: PROFRA. INES FUENTES NORIEGA



MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

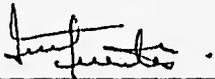
PRESIDENTE: Prof. INES FUENTES NORIEGA
VOCAL: Prof. ROSA LORENIA MORA-TOVAR Y CHAVEZ
SECRETARIO: Prof. RAFAEL RION ARRIOLA.
1^{er} SUPLENTE: Prof. ELIA BROSLA NARANJO RODRIGUEZ.
2^o SUPLENTE: Prof. LAURO MISAEL DEL RIVERO RAMIREZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO. DEPARTAMENTO DE FARMACIA
DIVISIÓN DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. LABORATORIO 112 DE
BIOFARMACIA.**

FACULTAD DE QUÍMICA.

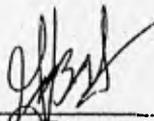
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.



Inés Fuentes Noriega.
ASESOR DEL TEMA.



José Manuel Morales Ramírez
SUPERVISOR TECNICO



José Lino Gómez Bringas
SUSTENTANTE.

AGRADECIMIENTOS

*Este trabajo esta dirigido a todas aquellas personas que confiaron en mi de alguna u otra forma y que gracias a ese apoyo logré culminar esta meta.
De corazón mil gracias*

Agradezco a Dios y a la Vida el haberme permitido culminar este objetivo, significa el fin de un largo camino y el principio de otro aun mas largo.

*Agradezco profundamente a mis Padres su apoyo incondicional por haberme dado TODO sin pedirme NADA a cambio.
Mil gracias*

A CONACYT PFPN1121/92 por el apoyo brindado para la realización de este trabajo, así como a PADEP proyecto 05006

A mi Madre:

Por haber estado cerca de mí en todo momento y hacer el camino más sencillo, por alentarme y ayudarme siempre que lo necesite. Te Quiero Mucho.

A mi Padre:

Por procurar darme más de lo indispensable cuando se pudo, por tener siempre una palabra de apoyo y darme la mano cuando lo necesité.

Gracias a ambos por haberme dado la mejor herencia de la vida.

A Aida:

Por el Amor, Cariño y Paciencia que me has dado, por todos los buenos e inolvidables momentos compartidos, como amigos y como novios, y por muchas cosas más...¡Gracias!

A la Maestra Inés Fuentes Noriega:

Gracias por la paciencia y el apoyo brindado a lo largo del proyecto y mi estancia en Biofarmacia.

A mi Jurado de Examen.

Profesora Rosa Lorenia Mora-Tovar y Clúvez y Profesor Rafael Rión Arriola, por sus consejos.

A Manuel:

Por prestarme ayuda desinteresadamente y facilitarme el trabajo siempre que se pudo.

Al laboratorio de Biofarmacia:

En especial a Misael, y Guadalupe Canseca, Maestros J. Manuel, Helgi y Margarita, por el apoyo académico brindado. A todos mis compañeros con los que compartí momentos muy agradables.

A Eduardo y Saúl:

Por la amistad que nos une, por los gratos momentos compartidos a lo largo de la carrera y después de ella.

A Lydia:

Por ser la amiga perfecta y contar contigo.

A Elizabeth:

Por ser amiga en todo momento.

A Fa:

Por los grandes recuerdos.

A Toda la Familia Q.F.B.-90

Olga, Cinthya, Nancy, Veronica, Adriana, Nelly, Ana, Tere N., Claudia S. Claudia C. Katy. Adrián, Alfredo, Sergio, Agustín, Francisco, Fernando, Franklin, Ismael, Zenón, Alejandro F., Alejandra R., Samuel.

A mis amigos los Ing's: Ganaliel y Manuel R.

A mis amigos de siempre: Armando, David, Carlos, Roberto y Araceli.

A mis familiares, maternos como paternos, a mis primos, y en especial a mi tío Leonardo, ya que de alguna u otra forma todos me ayudaron...¡gracias!

A la memoria de una persona que me enseñó más estando en otro mundo, que lo que me pudo haber enseñado en este.

*D.M.G.**

ÍNDICE	PÁGINA
Índice General	i
Índice de Tablas y Figuras	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVO	2
III. GENERALIDADES	3
3.1. Reseña Histórica	3
3.2. Bases Teóricas	5
3.3. Definiciones	7
3.4. Aspectos regulatorios en la determinación de la biodisponibilidad y bioequivalencia	9
3.4.1. Consideraciones regulatorias.	9
3.4.2. Sugerencias para determinar la biodisponibilidad <i>In vivo</i> .	9
3.4.3. Productos que requieren de estudios de biodisponibilidad o bioequivalencia	10
3.4.4. Medicamentos que no requieren demostrar biodisponibilidad o bioequivalencia.	10
3.4.5. Bases para establecer la bioequivalencia o biodisponibilidad	12
3.4.6. Análisis estadístico	14
3.5. Propiedades fisicoquímicas del ácido acetil salicílico	15
3.5.1. Nombre químico	15
3.5.2. Fórmula condensada	15
3.5.3. Fórmula desarrollada	15
3.5.4. Masa molecular	15
3.5.5. Densidad	16
3.5.6. Punto de fusión	16

3.5.7. Constante de disociación	16
3.5.8. Descripción	16
3.5.9. Solubilidad	16
3.5.10. Coeficientes de partición	16
3.6. Farmacocinética y mecanismo de acción	16
3.6.1. Absorción	16
3.6.2. Distribución	17
3.6.3. Biotransformación y Excreción	18
3.7. Propiedades Farmacológicas de los salicilatos.	21
3.7.1. Analgesia	21
3.7.2. Antipirexia	22
3.7.3. Respiración	22
3.7.4. Usos terapéuticos y Dosificación	22
3.8. Reacciones adversas y toxicidad	23
3.9. Métodos de valoración en fluidos biológicos	24
3.9.1. Métodos colorimétricos	24
3.9.2. Cromatografía líquida - Gas (CLG)	24
3.9.3. Cromatografía líquida de Alta Resolución (CLAR)	25
3.9.10. Propiedades particulares de la orina	28
IV. PARTE EXPERIMENTAL	29
4.1. Material, equipos e instrumento	29
4.2. Reactivos y sustancias de referencia	29
4.3. Soluciones	30
4.4. Preparación de soluciones	31
4.5. Condiciones cromatográficas	33
4.6. Procedimiento de extracción	33
4.7. Pruebas de validación del sistema	36
4.7.1. Linealidad	36
4.7.2. Precisión o repetibilidad	36

4.8. Pruebas de validación del método analítico	36
4.8.1. Linealidad	36
4.8.2. Precisión del método	37
4.9. Pruebas de control de calidad de los productos	37
4.9.1. Uniformidad de dosis	37
4.9.2. Friabilidad	38
4.9.3. Prueba de dureza	38
4.9.4. Valoración	38
4.9.5. Prueba de disolución	39
4.10. Análisis de las muestras por CLAR	39
4.10.1. Diseño experimental del estudio de bioequivalencia	40
4.10.2. Diseño experimental del estudio de biodisponibilidad	41
V. RESULTADOS EXPERIMENTALES	42
5.1. Resultados de las pruebas de validación del sistema y del método analítico	42
5.1.1. Linealidad del sistema	43
5.1.2. Linealidad del método	46
5.2. Resultados de las pruebas de control de calidad de las tabletas	49
5.2.1. Prueba de dureza	49
5.2.2. Prueba de friabilidad	50
5.2.3. Prueba de valoración	51
5.2.4. Prueba de disolución	51
5.2.5. Prueba de uniformidad de dosis	52
5.3. Resultados del estudio previo de bioequivalencia	53
5.4. Resultados del estudio de la influencia de los lípidos en la biodisponibilidad del ácido acetil salicílico.	54
VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	56
6.1. Pruebas de validación del sistema y método analítico.	56
6.1.1. Linealidad del sistema	56

6.1.2. Linealidad del método	57
6.2. Pruebas de control de calidad de los productos farmacéuticos	57
6.3. Estudio de la influencia de los lípidos en la biodisponibilidad del AAS	59
VII. CONCLUSIONES	61
VIII. BIBLIOGRAFÍA	62
APENDICES	
Apéndice 1	65
Apéndice 2	66
Apéndice 3	67
Apéndice 4	68

ÍNDICE DE TABLAS

PÁGINA

4.1. Diluciones para construir la curva de calibración de Asu y Asa en metanol	32
4.2. Diluciones para construir la curva de calibración de Asu y Asa en orina	32
4.10.1. Diseño experimental del estudio de bioequivalencia	40
4.10.2. Diseño experimental del estudio de biodisponibilidad	41
5.1. Tiempos de retención de los componentes	42
5.1.1.A Linealidad del sistema para el ácido salicílico	43
5.1.1.B Linealidad del sistema para el ácido salicílico	45
5.1.1.A Linealidad del método para el ácido salicílico	46
5.1.2.B Linealidad del método para el ácido salicílico	48
5.2.1. Resultados de la prueba de dureza para el producto comercial e innovador	49
5.2.2. Resultados de la pruebas de friabilidad en producto comercial e innovador	50
5.2.3. Prueba de valoración	51
5.2.4. Prueba de Disolución	51
5.2.5. Prueba de uniformidad de dosis para los productos innovador y comercial	52
5.3. Resultados estadísticos del ANADEVVA hecho en el programa BIOPAK	53
5.4.1. Promedio de cantidad excretada acumulada promedio vs. Tiempo en ayuno	55
5.4.2. Perfil promedio del estudio de la influencia de los lípidos en la biodisponibilidad del aas. Datos urinarios con dieta lipídica.	56
5.4.3. Comparación de la cantidad excretada acumulada promedio (+/-) d.s. vs. tiempo en las dos semanas de estudio en cada uno de los intervalos.	57

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

3.1. Metabolitos del ácido acetil salicílico	21
4.1. Procedimiento de extracción	35
5.1. Cromatogramas con muestra en metanol y en orina	42
5.4.1. Perfil promedio del estudio de la influencia de los lípidos en la biodisponibilidad del aas, datos en ayunas	55
5.4.2. Perfil promedio del estudio de la influencia de los lípidos en la biodisponibilidad del aas, datos con dieta lipídica.	56
5.3.3. Perfil comparativo del estudio de la influencia de los lípidos en la biodisponibilidad del aas, datos urinarios.	57

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

El ácido acetil salicílico (AAS) es un analgésico, antirreumático, antipirético y antiagregante plaquetario, ampliamente utilizado en el alivio del dolor y la fiebre en procesos infecciosos, catarro común, malestares musculares, dolores de artritis, reumatismo y neuralgias. También está indicado para reducir el riesgo de ataques isquémicos transitorios o apoplejías, y para reducir el riesgo de muerte y/o infarto al miocardio en pacientes con infarto previo.

Las fármacos antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos constituyen un grupo homogéneo de compuestos, con frecuencia no relacionados químicamente, muchos de ellos son ácidos orgánicos y comparten ciertas acciones terapéuticas y efectos colaterales. El prototipo es la aspirina (AAS), por lo tanto este tipo de compuestos se mencionan como fármacos tipo aspirina, también es frecuente la denominación de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE).

A pesar de la introducción de muchas fármacos nuevos, la aspirina (ácido acetil salicílico), aún es el agente analgésico-antipirético y antiinflamatorio más usado y es el estándar para la comparación y evaluación de los otros. En E.U.A. se consumen de 10 000 a 20 000 toneladas anuales.

CAPITULO II

OBJETIVO

En la Literatura científica no existe una gran información acerca de la influencia de la dieta en la biodisponibilidad de diversos fármacos, por lo que el objetivo de este trabajo es observar la absorción y biodisponibilidad del ácido acetil salicílico en una forma farmacéutica sólida (tableta), bajo la influencia de una dieta rica en lípidos.

Se pretende evaluar la bioequivalencia de dos formas farmacéuticas sólidas que contienen ácido acetil salicílico, fabricadas por la misma compañía farmacéutica, usando como innovador una tableta de 350 mg y como producto estándar, al producto comercial de 500 mg.

Con las bases teóricas y de investigación de este trabajo se pretende lograr la formación de recursos humanos, capaces de desarrollar estudios de biodisponibilidad en el laboratorio de Biofarmacia, de la facultad de Química de la U.N.A.M.

CAPITULO III

GENERALIDADES

3.1. Reseña histórica.

Durante los últimos 25 años y en diversos países, el tema de la biodisponibilidad de los medicamentos ha sido motivo de preocupación creciente para las autoridades de salud, sobre todo en lo concerniente a la seguridad y eficacia. Se ha hecho evidente que productos comerciales que contienen la misma cantidad de sustancia activa pueden exhibir marcadas diferencias en sus respectivas respuestas terapéuticas.

Los primeros estudios de bioequivalencia se realizaron en Canadá en el año de 1971 en 229 medicamentos, de los cuales solo 95 resultaron bioequivalentes. Numerosos estudios han demostrado que preparaciones farmacéuticas aparentemente iguales o químicamente equivalentes, por ejemplo aquellas que contienen la misma cantidad de un principio activo con especificaciones precisas, no siempre producen los mismos resultados terapéuticos o no poseen la misma biodisponibilidad. Esto se debe a que cada uno de los fabricantes tiene su propio proceso de manufactura y sus propios excipientes.

Particularmente en aquellos productos similares que contienen sustancias muy activas y que se intenta utilizarlos de manera intercambiable, debe definirse la biodisponibilidad y probarse la bioequivalencia. Las primeras observaciones sobre la bioequivalencia, estuvieron encaminadas hacia las pruebas de desintegración de tabletas, cápsulas y tabletas con capa entérica. La mayoría de estas preparaciones farmacéuticas se utilizaron para demostrar lo que se conocía como "el efecto del todo o nada", esto es, si una cápsula o una tableta se desintegraba apropiadamente en el tracto gastrointestinal, se decía que el fármaco se había absorbido y se obtenía la respuesta biológica esperada, en caso contrario, si la preparación no se desintegraba *in vivo*, y llegaba intacta a las heces, era un claro caso de ineffectividad.

La posibilidad de contar con formas farmacéuticas sólidas no desintegrantes de algunos fármacos, representaba un caso extremo de bioinequivalencia, donde la eficiencia clínica variaba

dramáticamente, llegando incluso a no tener efecto ^{1,2}. Sin embargo, también se encontraron serias deficiencias en la disponibilidad fisiológica de los medicamentos aún cuando la tableta se hubiera desintegrado por completo *in vivo* ³.

En 1960, Levy ^{4,5} inició los estudios sobre las tabletas de aspirina, encontrando una relación entre la velocidad de absorción y la incidencia y severidad de la irritación gástrica localizada, después de la administración de las tabletas de aspirina, la cual estaba en función de su velocidad de disolución, apuntó que el tiempo de desintegración era un buen indicador de la velocidad de absorción de las tabletas mencionadas. La comparación de los tiempos de desintegración y las velocidades iniciales de absorción de los productos probados, indicó que el producto con el mayor tiempo de desintegración era el absorbido más rápidamente, por lo que concluyó que la desintegración retardada influye sobre la absorción, no solamente por su efecto en la disolución, por lo que sugirió el reemplazamiento de la prueba de desintegración, por la prueba de disolución.

En 1963, Cartney y Carminetsky ¹² fueron los primeros en reportar la ineficacia clínica de algunas tabletas genéricas de tolbutamida. Varley ¹⁵, condujo posteriormente un estudio clínico bien llevado (con parámetros definidos y controlados), para demostrar el efecto de pequeños cambios en la formulación sobre la biodisponibilidad y eficacia clínica del medicamento. Los resultados del estudio indicaron, que es posible producir diferencias significativas tanto en la biodisponibilidad del fármaco como en la utilidad terapéutica con solo hacer pequeños cambios en la formulación. De esta forma la FDA, reconoció a la tolbutamida como un fármaco con problemas potenciales de biodisponibilidad.

Posteriormente se reportó el caso de la bioequivalencia de los productos que contenían cloramfenicol. Basados en los niveles sanguíneos y en datos de excreción urinaria y sus metabolitos, Glazko *et al*,¹¹ demostraron que la absorción del cloramfenicol a partir de un producto genérico después de una administración oral, era solamente una tercera parte de la que presentaba el innovador. Un año más tarde, otros dos importantes antibióticos, la oxitetraciclina y la tetraciclina, fueron catalogados como productos con serios problemas de bioequivalencia ^{22, 23, 24}.

La biodisponibilidad es particularmente importante en fármacos tales como la digoxina, dado su estrecho índice terapéutico, por lo que fluctuaciones significantes en los niveles sanguíneos pueden

resultar en una respuesta subclínica o en una respuesta tóxica. En dicho principio activo, el problema es aún más grande debido a su baja solubilidad en agua e incompleta absorción en el tracto gastrointestinal⁶.

La variación en la biodisponibilidad de los productos tales como la digoxina así como la demostración de sus consecuencias en la seguridad y eficacia terapéutica del fármaco, impulsaron a la bioequivalencia de ser un mero tópico académico, a un mayor impacto entre los farmacéuticos, productores de medicamentos y agencias gubernamentales y privadas. Muchos más fármacos de los aquí mencionados, han sido identificados como propensos a problemas de biodisponibilidad y como resultado de esto, se ha generado una lista de fármacos con problemas de biodisponibilidad, conocida como *Federal Register* publicada por la FDA, reglamentando que son necesarias las pruebas de biodisponibilidad para 110 medicamentos.

Estudios de bioequivalencia realizados en Costa Rica y Panamá, demostraron que la biodisponibilidad es un problema mayor en los países de América Latina, que en los países europeos, esto puede deberse a que existe un comportamiento terapéutico diferente, según la región y las características de su población, y en gran parte a que los estudios de biodisponibilidad en América Latina son escasos.

3.2 Bases Teóricas.

En los últimos veinte años los estudios de bioequivalencia han sido objeto de gran interés por parte de la industria farmacéutica, desarrollándose paralelamente con el avance científico y tecnológico, apoyándose a su vez en disciplinas tales como la farmacocinética, estadística, farmacología, computación y otras, lográndose con ello una reglamentación internacional más eficiente y acorde a las necesidades del mercado actual¹⁵. Cabe señalar que siempre se ha considerado que el desarrollo, fabricación, prescripción y administración de un medicamento debe de tener como objetivo común la obtención de una eficacia terapéutica.

La eficacia y seguridad de un producto farmacéutico está en la función de su capacidad para liberar la cantidad correcta de fármaco, para alcanzar y mantener por un tiempo adecuado concentraciones sanguíneas dentro del intervalo terapéutico.

La biodisponibilidad es una medida que puede ser utilizada como parte importante para evaluar la eficacia y seguridad de un medicamento. También puede funcionar como una comparación de la biodisponibilidad de dos o más productos farmacéuticos que contengan el mismo principio activo; por lo tanto, estos estudios de bioequivalencia proporcionan información acerca de la eficacia y/o toxicidad del medicamento.

En México se han efectuado estudios de bioequivalencia de algunos fármacos, sin embargo, el número estudiado hasta la fecha es muy pequeño, lo cual establece como una necesidad el ampliar este tipo de estudios, con el fin de garantizar que al sustituir una marca comercial por otra, se obtenga el mismo efecto terapéutico.

En general el protocolo a seguir para estos estudios es el siguiente:

a) Selección de fármacos que se encuentren dentro del cuadro básico de medicamentos.

Los criterios de selección serán:

- 1) Importancia terapéutica.
- 2) Consumo en el país.
- 3) Número de marcas comerciales existentes.

b) Selección del método analítico para cuantificar el fármaco en fluidos biológicos:

El método deberá ser específico, sensible y reproducible.

c) Selección de los voluntarios para participar en el estudio:

Serán voluntarios (preferentemente de sexo masculino) clínicamente sanos en base a exámenes de laboratorio como:

Bimetría hemática, examen general de orina y pruebas de función hepática y renal.

Estos voluntarios firmarán una hoja de consentimiento y podrán dejar de participar en el estudio en el momento en que lo deseen.

3.3. Definiciones.

Se ha definido la biodisponibilidad como una medida de la cantidad relativa de fármaco que alcanza la circulación general y la velocidad a la que ésto sucede. En el caso de los medicamentos que se administran de manera crónica, la cantidad total del fármaco absorbido es más decisiva que su velocidad de absorción. Sin embargo, para los fármacos que deberán ser efectivos después de una sola dosis, el parámetro farmacocinético de incidencia más crítica puede ser la velocidad de absorción (más que la magnitud de la misma). Un medicamento que alcanza la circulación rápidamente, puede provocar al principio, reacciones adversas si los niveles resultan excesivos.

Por otro lado, si la absorción es demasiado lenta, puede no llegarse a alcanzar los niveles necesarios para producir el efecto o la intensidad del efecto que se espera, aún en el caso de que la dosis se haya absorbido por completo. De manera similar, resulta evidente que el inicio de la respuesta farmacológica tras una dosis única de medicamento, depende directamente de la velocidad a la que éste se hace disponible.

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

Biodisponibilidad, Bioequivalencia, Bioinequivalencia, Equivalencia Química, Clínica y Terapéutica.

Biodisponibilidad.

Se define como una medida de la cantidad relativa de un fármaco que llega a la circulación general y la velocidad a la que ésto ocurre, es un concepto basado en el supuesto de que los niveles de fármaco en plasma u orina pueden correlacionarse con la eficacia clínica.

Biodisponibilidad Absoluta.

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

Bioequivalencia.

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

Bioinequivalencia.

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

Equivalencia.

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

Equivalencia Química.

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

Equivalencia Clínica.

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

Equivalencia Terapéutica.

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

3.4. Aspectos regulatorios en la determinación de la biodisponibilidad y la bioequivalencia.

3.4.1. Consideraciones regulatorias.

El 7 de enero de 1977, la FDA (Food and Drug Administration), estableció los requerimientos para los estudios de Biodisponibilidad y Bioequivalencia *in vivo*, efectivos a partir de julio del mismo año. De acuerdo a tal reglamentación, cada estudio debe incluir la evidencia que demuestre la biodisponibilidad *in vivo* del medicamento o la información adecuada que le permita aprobar tales reglamentos. Además, cualquier cambio en la formulación o en el proceso de manufactura, nuevas indicaciones para el uso del medicamento o cualquier cambio en la dosificación para establecer un nuevo régimen en la misma, también deberán documentar la biodisponibilidad. Tales reglamentaciones aparecieron en el Federal Register, 2F CFR, Capítulo 1 (De.4-8), parte 320.

3.4.2. Sugerencias Para Determinar La Biodisponibilidad *In Vivo*.

- a) Determinar las concentraciones del fármaco y/o sus metabolitos en un fluido biológico en función de tiempo.
- b) Medir la cantidad de fármaco excretada en orina y/o sus metabolitos en función del tiempo.
- c) Medir el efecto farmacológico adecuado en función del tiempo, si tal efecto puede ser medido con exactitud, sensibilidad y reproducibilidad. Esta sugerencia es aplicable cuando no existan métodos analíticos disponibles para medir la concentración del fármaco en el fluido biológico.
- d) Cuando no existan métodos analíticos disponibles para medir de una forma adecuada la cantidad de fármaco y de sus metabolitos en un fluido biológico se pueden realizar ensayos de eficacia clínica en los que se observe el efecto terapéutico, siempre y cuando se establezcan las condiciones de seguridad

y efectividad del fármaco, síntomas adversos y qué hacer en caso de presentarse; esta sugerencia debe ser considerada como la menos exacta, sensible y menos reproducible de todas las formas para determinar la biodisponibilidad *in vivo*, en humanos.

3.4.3. Productos que requieren de estudios de biodisponibilidad o bioequivalencia.

La Secretaría de Salud se ha pronunciado en favor de solicitar la demostración directa de la bioequivalencia de todos los fármacos, que según la información que aparece en la bibliografía mundial, presenten problemas de bioinequivalencia y/o biodisponibilidad, o tengan un índice terapéutico estrecho. Se debe demostrar la biodisponibilidad/bioequivalencia de productos cuando:

- a) Mediante la evidencia de estudios clínicos en humanos, se encuentre que tales productos no presenten un efecto terapéutico comparable.
- b) Exista evidencia de que el producto tiene un estrecho índice terapéutico.
- c) Exista evidencia clínica que indique problemas de bioequivalencia durante la terapia, cuando exista un cambio en la dosis de un fármaco.
- d) Se presenten ciertos factores relacionados a propiedades fisicoquímicas del fármaco que afecten la velocidad y grado de absorción, como:
 1. - Baja solubilidad en agua (< 5 mg/ml)
 2. - Excipientes que intervienen en la absorción.
 3. - La disolución en el estómago es crítica para la absorción.
 4. - El volumen de líquido requerido para disolver el principio activo excede en gran medida al volumen del fluido gástrico (100ml aproximadamente en adultos).
 5. - El tamaño de partícula y/o área superficial es crítico para la absorción.
 6. - Se presenten ciertas características estructurales como formas de complejos que se disuelven pobremente y pueden afectar la disolución o la biodisponibilidad.
 7. - El medicamento tiene una alta relación excipientes/principio activo, por ejemplo una relación 5:1.
 8. - Los excipientes en la formulación tienen propiedades hidrofílicas o hidrofóbicas muy altas y son añadidos para mejorar la absorción, o si la presencia de tales excipientes puede interferir en la absorción.

e) Exista evidencia de estudios farmacocinéticos que indiquen que:

1. - El fármaco es absorbido principalmente en un sitio muy particular del tracto gastrointestinal.
2. - El grado de absorción del fármaco es muy bajo (<50 por ciento), comparado con una administración intravenosa (aún cuando sea administrado en solución). O tiene una ventana de absorción limitada y gran variabilidad interindividual.
3. - Se presenten indicaciones del que el fármaco se metaboliza rápidamente en la pared intestinal o en ligado (metabolismo > 70 por ciento) durante el proceso de absorción, de tal forma que la respuesta biológica del fármaco es dependiente de la velocidad y del grado de absorción.
4. - El fármaco es excretado o metabolizado rápidamente y por lo tanto se requiere una absorción rápida para la efectividad del fármaco.
5. - El fármaco es inestable en áreas específicas del tracto gastrointestinal y requiere de un recubrimiento (formulación especiales).
6. - El fármaco muestra una cinética dosis-dependiente cerca del intervalo terapéutico, y por ello, la velocidad y su grado de absorción son importantes para la efectividad clínica.

3.4.4. Medicamentos que no requieren demostrar biodisponibilidad o bioequivalencia.

Los productos o formas farmacéuticas que no requieren demostrar biodisponibilidad es debido a que ya existen antecedentes de estudios previos de biodisponibilidad, o por que no sufren un grado de absorción sistémica, a excepción de las formulaciones de uso terapéutico local. Por lo tanto no se requieren estudios de biodisponibilidad y/o bioequivalencia para:

- A) Preparaciones para uso intravenoso.
- B) Preparaciones tópicas, cuyos efectos sean locales, tales como cremas o ungüentos. Aún cuando esto no elimina la posibilidad de estudiar su paso a la circulación general.
- C) Formas para dosificación oral que no sufran absorción sistémica, tales como los antiácidos y medios radiopacos de contraste.
- D) Productos administrados por inhalación en forma de gas o vapor, como los anestésicos que contenga la misma concentración de ingredientes activos.
- E) Productos elaborados por el mismo fabricante, en el mismo sitio de producción o bien que haya sido reformulado en relación al colorante, endulcorante o preservativo siempre y cuando la

biodisponibilidad sea conocida y las dos versiones reúnan los requisitos de una prueba adecuada *in vitro* como el perfil de disolución.

- F) Soluciones orales, elixires, tinturas, jarabes u otras formas líquidas solubilizadas para administración oral, que contengan el mismo ingrediente activo en la misma concentración o dosis que el innovador y ningún otro ingrediente que pueda modificar significativamente su absorción.
- G) Medicamentos que hayan demostrado ser efectivos mediante un estudio de eficacia clínica y cuyo principio activo no se encuentre incluido en la lista de la FDA como fármaco con problemas de biodisponibilidad.
- H) Productos parenterales que han sido efectivos, por lo menos en una indicación en estudios de eficacia clínica o que demuestren contener los mismos ingredientes activos y excipientes que un producto similar que haya sido aprobado previamente, a excepción de algunos fármacos como en el caso de la fenitoína.

3.4.5. Bases para establecer la bioequivalencia o biodisponibilidad.

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

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

Los mejores estudios *in vivo* son aquellos diseñados para revelar cualquier diferencia en la velocidad y eficiencia de absorción así como la magnitud de tales diferencias. Los niveles sanguíneos y/o las cantidades excretadas en orina pueden ser medidas después de:

1. La administración de una dosis del medicamento.
2. Un intervalo de dosificación en el estado estacionario, después de la administración de una dosis múltiple del medicamento (intervalos de tiempo a los cuales se administra una dosis del medicamento).
3. La primer dosis y durante un intervalo de dosificación en el estado estacionario después de una dosis múltiple.

La necesidad de efectuar estudios de bioequivalencia en productos ya existentes, para propósitos de comparación, han sido registrados por de "The Drug Price Competition" y por "Patent Term Restoration Act" en 1984. Estos registros permiten evaluar los duplicados de algún producto que haya salido al mercado después de 1962, con la premisa de que el medicamento demuestre ser bioequivalente al original. Lo anterior indica que en muchos de los casos, se deberán efectuar estudios de biodisponibilidad comparativa *in vivo*.

Para establecer la bioequivalencia, es necesario que la absorción neta de los productos no presente diferencias significativas y que las velocidades de absorción sean tan cercanas que los perfiles de niveles sanguíneos sean muy parecidos.

El protocolo para los estudios de bioequivalencia es más simple que el que se requiere para los estudios farmacocinéticos de un fármaco nuevo, dado que :

- a) Al mismo grupo de voluntarios se le administrarán las mismas formulaciones, por lo que los parámetros farmacocinéticos tales como volumen aparente de distribución, las microconstantes (farmacocinéticas) de velocidad que controlan la transferencia entre los compartimentos y la vida media de eliminación, pueden ser considerados constantes.
- b) Los voluntarios están sujetos al mismo protocolo de ayuno en el estudio, la eficiencia en la absorción del fármaco, después de que es liberado por la forma farmacéutica y ha sido disuelto en el fluido corporal, puede ser considerado tentativamente como la misma. Por lo tanto, las diferencias en la absorción neta del fármaco pueden ser atribuidas a diferencias en las características de liberación de la forma farmacéutica.

Se recomienda que sea un estudio de diseño cruzado, para detectar las diferencias entre las formas de dosificación en un 20 por ciento ó más. Existe una cierta diferencia entre a cual producto se considera como "referencia" o "producto estándar". Generalmente el primer producto en salir al mercado, conocido como innovador se considera como el producto de referencia.

Los intentos REGULATORIOS para establecer criterios específicos para juzgar la bioequivalencia, han generado debates acalorados dada la naturaleza del tópico y sus aplicaciones. El asunto es complicado, ya que los conceptos generales y procedimientos para la medición de la bioequivalencia, están basados en los conocimientos de dos disciplinas: Biofarmacia y Farmacocinética. Dos puntos de mayor interés, y que son los que causan los debates, se señalan a continuación.

3.4.6. Análisis estadístico.

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

Otro punto de debate es la regla de poder 80/20, la cual requiere que el diseño estadístico del estudio deberá ser capaz de proveer un 80 por ciento de probabilidad de detectar diferencias de hasta un 20 por ciento en las medias de las ABC (Area Bajo la Curva) y Cmax (Concentración Máxima) de las formulaciones bajo prueba. Aunque una diferencia del 20 por ciento en los fármacos con una modesta pendiente en las curvas de dosis-respuesta puede ser clínicamente insignificante, la diferencia puede causar problemas en la terapéutica, al no tener la misma respuesta, por esta razón se ha recomendado que la regla que se emplee sea 80/10.

Actualmente son los intervalos de confianza clásico y Westlake,^{20,21,22} los que señalan los indicios para predecir la bioequivalencia o no de los productos.

VOLUNTARIOS PARA EL ESTUDIO.

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

3.5. Propiedades fisicoquímicas del ácido acetil salicílico.¹³

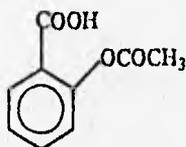
3.5.1. Nombre químico

2-Acetoxibenzoico

3.5.2. Fórmula condensada.

$C_9H_8O_4$

3.5.3. Fórmula desarrollada.



ASPIRINA

3.5.4. Masa molecular.

180.16 g/mol

3.5.5. Densidad : 1.40 mg/ml

3.5.6. Punto de fusión: 135°C.

3.5.7. Constante de disociación: pKa 3.5 a 25°C.

3.5.8. Descripción.

Cristales incoloros o polvo blanco, cristalino; inodoro. Es estable en aire seco; en aire húmedo se hidroliza gradualmente formando ácidos salicílico y acético.

3.5.9. Solubilidad

1 g en 5 ml de alcohol; 1 g. en 17 ml de cloroformo; 1 g. en 15-17 ml de éter; 1 g. en 300 ml de agua a 25°C, en 100 ml de agua a 37°C.

3.5.10. Coeficiente de partición.

Log P (octanol/Amortiguador pH = 7.4) = -1.1

3.6. Farmacocinética y mecanismo de acción.

3.6.1. Absorción⁶.

Los salicilatos se absorben con rapidez; una pequeña porción lo hace en el estómago, pero en su mayor parte se absorbe en el intestino delgado superior. Se encuentran concentraciones plasmáticas apreciables en menos de 30 minutos; después de una dosis individual, se alcanza un valor máximo aproximadamente a las dos horas, disminuyendo luego en forma gradual. El porcentaje de la absorción está determinado por muchos factores, en particular por la velocidad de desintegración y disolución. Si se administran comprimidos, el pH de las superficies mucosas y el tiempo de vaciado gástrico son importantes. La aspirina se absorbe con más lentitud que el salicilato de sodio.

El salicilato se absorbe principalmente por difusión pasiva de moléculas no disociadas (ácido acetilsalicílico y salicílico), a través de las membranas gastrointestinales y por ello influye el pH

gástrico, la velocidad de difusión depende de la concentración de sustancia no ionizada y su solubilidad en lípidos. Cuando el pH del jugo gástrico es bajo (por debajo del pKa), el salicilato se encuentra principalmente en su forma no ionizada y más liposoluble, por ello se absorbe con mayor rapidez. Como el pH del líquido de la porción superior del intestino es bajo (hasta 5.3), algo del salicilato se encuentra aún no ionizado, y así la absorción ocurre en este sitio.

En las preparaciones con amortiguadores los salicilatos se absorben con más lentitud porque hay menor forma no ionizada; sin embargo la absorción global no disminuye porque el aumento de la solubilidad permite que la sustancia se distribuya mejor en la mucosa gástrica y que pase al intestino con mayor rapidez. El factor limitante en la absorción es la difusión por las membranas del estómago y del intestino, cuando son administrados en forma sólida, los salicilatos tienen que disolverse para ser absorbidos, dicha solubilidad se ve aumentada por las sustancias que elevan el pH del contenido gástrico.

Cuando las moléculas de salicilato no ionizadas entran en las células de la mucosa gástrica se disocian pasando a su forma no ionizada por el alto pH (7.0) intracelular, presentándose concentraciones del anión salicilato 15 a 20 veces la del lumen gástrico, lo que puede producir lesiones de la mucosa gástrica. El hecho de que rara vez sea dañada la mucosa intestinal por los salicilatos es debido al menor gradiente de pH que hay entre el contenido intestinal y las células de la mucosa

La absorción rectal suele ser más lenta, incompleta y poco segura; por consiguiente, no es aconsejable esta vía cuando se requieren altas concentraciones plasmáticas. El ácido salicílico se absorbe con rapidez por la piel intacta, en especial cuando se aplica en linimentos o ungüentos oleosos (como la lanolina).

3.6.2 Distribución ⁶.

Los salicilatos se distribuyen en la mayor parte de los tejidos y los líquidos extracelulares, en especial por procesos pasivos pH-dependientes. Se le encuentra en los líquidos sinovial, cefalorraquídeo y peritoneal, este compuesto puede atravesar la barrera placentaria. No se secreta en el jugo gástrico aunque lo contenga en gran concentración. Solo indicios de salicilato aparecen en el sudor, la bilis y las

heces. Fuera del plasma, las mayores concentraciones se encuentran en la corteza renal, el hígado, el corazón, los pulmones, en cerebro y músculos esqueléticos la concentración es baja.

Los volúmenes de distribución de las dosis usuales de aspirina y salicilato de sodio promedian alrededor de 170 ml/Kg de peso corporal. La aspirina ingerida se absorbe como tal, pero cierta cantidad entra como ácido salicílico, a causa de la hidrólisis por esterasas de las mucosas gástrica e intestinal. Puede detectarse en el plasma durante un corto tiempo como resultado de la hidrólisis plasmática, hepática y eritrocitaria, por ejemplo con una dosis de 0.65g, solo 27 por ciento se encuentra en forma acetilada, como resultado la concentración plasmática de la aspirina siempre es baja y rara vez excede de 20 µg/ml.

En las concentraciones encontradas en la clínica, un 80 a 90 por ciento del salicilato está unido a las proteínas plasmáticas, en particular a la albúmina. Los salicilatos compiten con otros compuestos por los sitios de unión con las proteínas plasmáticas; éstos incluyen tiroxina, triyodotironina, penicilina, fenitoína, sulfipirazona, bilirrubina, ácido úrico y naproxeno. La aspirina inalterada se liga a las proteínas del plasma en muy pequeño grado; pero acetila la albumina del plasma humano "in vivo" por reacción con el grupo ε-amino del aminoácido lisina, lo que puede alterar el carácter antigénico de la albumina y tener reacción con el síndrome de hipersensibilidad a la aspirina. (Hawkins y col., 1969).

3.6.3 Biotransformación y Excreción ⁶.

El ácido acetilsalicílico es desacetilado con rapidez por esterasas plasmáticas para formar ácido salicílico (metabolito farmacológicamente activo) y ácido acético. La biotransformación de los salicilatos se realiza en muchos tejidos, en particular en el retículo endoplásmico y en las mitocondrias hepáticas.

Los tres productos metabólicos principales son el ácido salicílico (el conjugado de glicina), el éter o glucurónido fenólico y el éster o acilglucurónido. Además, una pequeña fracción se oxida a ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxi benzoico) y en ácidos 2,3-dihidroxi benzoico y 2,3,5-trihidroxi benzoico; también se forma ácido gentísúrico, conjugado de glicina del ácido gentísico.

Los salicilatos se excretan por la orina como ácido salicílico libre (10 por ciento), ácido salicílico (75 por ciento), glucurónidos salicílico fenólico (10 por ciento) y acético (5 por ciento) y ácido gálico (<1 por ciento). No obstante, la excreción de salicilato libre es en extremo variable y depende tanto de la dosis como del pH urinario. En la orina alcalina, más del 30 por ciento del fármaco ingerido puede eliminarse como salicilato libre, mientras que en la orina ácida puede ser solo del 2 por ciento.

Todos los procesos de transformación y de excreción del AS (Ácido salicílico) siguen una cinética de primer orden, excepto las conjugaciones de ácido salicílico con glicina y ácido glucurónico que son cinéticas que dependen de la dosis administrada ⁷.

La vida media plasmática de la aspirina es de alrededor de 15 minutos, la del salicilato en dosis de 650 mg/día es de alrededor de 2 a 3 horas y en dosis antiinflamatorias usuales es de 12 horas. La vida media del salicilato puede ser de 15 a 30 horas con dosis terapéuticas altas (4g/día) o cuando hay intoxicación. La eliminación dosis-dependiente es el resultado de la capacidad limitada del hígado para formar ácido salicílico y glucurónico fenólico; en dosis mayores una gran cantidad del fármaco se excreta por la orina.

Todos los salicilatos se eliminan por vía renal y lo realizan por filtración glomerular, reabsorción y secreción tubular. Las cantidades reportadas que se excretan en orina son las siguientes:

- Ácido salicílico	75.0 por ciento
- Ácido salicílico	10.0 por ciento
- Glucurónico salicílico fenólico	10.0 por ciento
- Glucurónico salicílico acético	5.0 por ciento
- Ácido gálico	1.0 por ciento

La alcalinización de la orina incrementa la velocidad de excreción de los salicilatos libres; cuando el ácido acetilsalicílico se usa en bajas concentraciones (650 mg/día) la eliminación está de acuerdo a una cinética de primer orden y la vida media en plasma es aproximadamente cerca de 3-5 horas mientras que a dosis altas (4 g/día) la cinética es de orden cero y la vida media en plasma aumenta

de 15 a más horas.¹⁴ Este efecto puede observarse después de una semana y está dado por la saturación de los sistemas hepáticos que catalizan la formación de salicilato a salicilglucurónido y ácido gentísico^{13,19}

Los conjugados glucurónicos de los ácidos salicílico y gentísúrico son ácidos orgánicos hidrosolubles, por lo cual no difunden con facilidad a través de las células del túbulo renal, estos productos de biotransformación no se excretan mediante un proceso pH dependiente como lo hace el ácido salicílico libre, sino que se filtran en el glomérulo y son excretados por el sistema para el transporte de ácidos orgánicos.

El volumen de distribución de la aspirina es de 0.15 L, del ácido salicílico cerca de 0.1 a 0.2 L. La unión a proteínas en plasma para el ácido salicílico es de cerca del 90 por ciento en concentraciones por abajo de 100 µg/ml; disminuyendo alrededor del 50 por ciento a concentraciones de 400 µg/ml. La figura 3.1. muestra los metabolitos del Ácido acetilsalicílico.

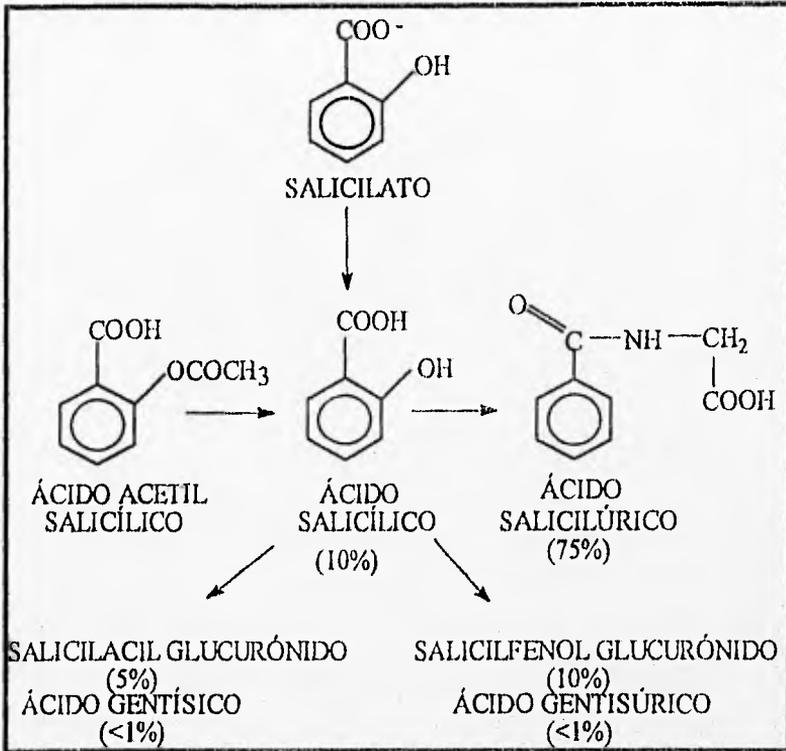


Fig. No. 3.1. Metabolitos del AAS

3.7. Propiedades farmacológicas de los salicilatos.

Las concentraciones terapéuticas en plasma del ácido salicílico son en el intervalo de 20 a 100 $\mu\text{g/ml}$ para analgesia y de 150 a 300 $\mu\text{g/ml}$ para efectos anti-inflamatorios.

3.7.1. Analgesia ⁶.

Los salicilatos alivian ciertos dolores por acción en el SNC, cuyo mecanismo no se ha elucidado del todo, sin embargo bajo un gran número de observaciones se ha consolidado la teoría de la

inhibición enzimática de las prostaglandinas en la patogénesis de la inflamación y la fiebre, incluyendo la de la liberación de prostaglandinas en cualquier lugar en donde se produjera daño celular. En general se considera que la inhibición de la ciclooxigenasa, enzima responsable de la biosíntesis de las prostaglandinas, constituye una faceta importante en el mecanismo de acción de las drogas tipo aspirina.

3.7.2. Antipirexia⁶.

Los salicilatos suelen disminuir con rapidez la temperatura corporal elevada. Las dosis usuales de 0.3 a 1.0 g por vía oral cada 3 ó 4 horas que producen este efecto también aumentan el consumo de oxígeno y la tasa metabólica. En dosis tóxicas, estos compuestos tienen un efecto febril que produce sudoración; esto incrementa la deshidratación, que ocurre en la intoxicación por salicilatos

3.7.3 Respiración⁶.

Producen perturbaciones graves del equilibrio ácido-base que es característico de esta clase de compuestos. Los salicilatos estimulan la respiración en forma directa e indirecta; dosis terapéuticas completas de salicilatos aumentan el consumo de oxígeno y la producción de CO₂, este aumento estimula la respiración. Los pacientes con intoxicación por salicilatos pueden tener alcalosis respiratoria. Las dosis tóxicas de salicilatos producen parálisis respiratoria central y colapso circulatorio secundario a la depresión vasomotora.

3.7.4. Usos terapéuticos y dosificación⁶.

La dosis antipirética de salicilato para adultos es de 325 a 650 mg cada 4 hrs. por vía oral, para los niños es de 50 a 75 mg/Kg diarios en cuatro a seis dosis divididas, no excediendo una dosis diaria total de 3.6 g. Para la analgesia se prescriben las mismas dosis y forma de administración que para la antipiresis. Para supresión máxima de la inflamación, conviene mantener concentraciones plasmáticas de salicilato de 150 a 300 µg/mL. Para los adultos basta una cantidad total diaria de 5 a 8 g fraccionada en dosis de 1 g. Para los niños se necesitan cantidades de 100 mg/Kg por día, en porciones divididas, cada 4 a 6 horas, en el curso de hasta una semana, luego la dosis se reduce en forma gradual con intervalos semanales, a 60-75 mg/Kg por día, manteniéndola tanto tiempo como sea necesario.

3.8. Reacciones adversas y toxicidad.

Se ha estimado que la dosis mínima letal corresponde a 15 g, concentraciones en plasma de 300 µg/ml pueden producir reacciones tóxicas, concentraciones mayores de 500 µg/ml pueden ser asociadas con intoxicaciones moderadas a severas. La intoxicación leve se le conoce como salicilismo y se caracteriza por zumbidos en los oídos, vértigo, cefalea, mareos, sudoración, somnolencia, hiperventilación, vómitos, náuseas, disminución visual y confusión mental ^{2,6}. En el salicilismo severo se presentan los mismos síntomas además, alteraciones graves en el equilibrio ácido-base, y en la composición electrolítica del plasma, seguida de convulsiones, delirios, estado de coma y paro respiratorio. Los efectos o reacciones adversas de los salicilatos se manifiestan a diferentes niveles de los sistemas orgánicos. A continuación se mencionan los más importantes:

Gastrointestinal: El principal efecto adverso es la irritación gastrointestinal causando, náuseas, vómito, malestares hipogástricos, empeoran la úlcera péptica, la dispepsia, hemorragia gástrica y gastritis erosiva. La hemorragia gástrica inducida por salicilatos es indolora y puede producir una anemia ferropénica. Aproximadamente la mitad de los individuos en que el salicilato en el plasma pasa de 30 mg/mL sufren náuseas ⁶.

Sangre: Aumenta el tiempo de sangrado en individuos normales. Se debe tener cuidado con la aspirina y la administración de anticoagulantes ².

Hipersensibilidad: Causa urticaria, broncoconstricción y en ocasiones choque anafiláctico. Aproximadamente el 15 por ciento de los pacientes que toman aspirina experimentan reacciones de hipersensibilidad ¹⁸.

Aparato respiratorio: En dosis utilizadas para la artritis reumatoidea puede causar depresión respiratoria.

Sistema Hepático: Puede producir lesión hepática por lo cual se restringe su uso en pacientes con hepatopatía crónica ⁶.

Efectos metabólicos: Los salicilatos tienen múltiples efectos sobre los procesos metabólicos, pueden causar hiperglucemia, glucosuria y agotar el glucógeno muscular y hepático ¹⁸.

3.9. Métodos de valoración en fluidos biológicos.

Varios métodos han sido reportados para determinar ácido acetilsalicílico y ácido salicílico en fluidos biológicos principalmente en plasma y orina, las técnicas más empleadas son la colorimetría y la espectrofotometría que, generalmente carecen de alta especificidad y sensibilidad, además que la determinación de AS (Ácido salicílico) es indirecta después de realizada una hidrólisis. Existen otras técnicas que son más específicas y sensibles para hacer estos estudios, como son las técnicas cromatográficas, principalmente la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y la cromatografía líquido-gas.

Los artículos que hacen referencia a la determinación de ácido acetilsalicílico y sus metabolitos en fluidos biológicos, son en su mayoría por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), empleando diferentes detectores como son el ultravioleta (UV), fluorescencia y electroquímico así como diversas fases móviles; existen pocos artículos que reportan por colorimetría

3.9.1. Métodos Colorimétricos.

La desventaja principal de los métodos colorimétricos es su baja especificidad, sensibilidad para los salicilatos y su dependencia a la hidrólisis diferencial de ácido acetilsalicílico a ácido salicílico para su cuantificación. Uno de los métodos para cuantificar al salicilato es el colorimétrico con reactivo de Trinder, en el cual utilizan el nitrato férrico para desarrollar el color y el ácido clorhídrico como agente acidificante. Otro método colorimétrico es el Dupont que es parecido al anterior sólo que en éste se emplea el ácido nítrico antes del nitrato férrico^{25,26}

3.9.2. Cromatografía Líquido - Gas (CLG).

Son pocos los artículos que hacen referencia para determinar AAS (Ácido acetilsalicílico) y sus metabolitos por CLG. Estos métodos son específicos y sensibles permitiendo el análisis simultáneo de todos los metabolitos sin conversión de AAS (Ácido acetilsalicílico) a ácido salicílico, sin embargo presentan una desventaja, al necesitar derivatizaciones químicas tal como la silanización para que sean detectados adecuadamente. Las derivatizaciones que se requieren, necesitan mucho tiempo, cerca de 60

minutos, y suelen complicarse por la hidrólisis parcial que sufre el AAS (Ácido acetilsalicílico) durante ésta, además de la múltiple formación de subproductos de tipo éster y éter^{27,9}.

Morris H. Clarence y Colab²⁸, proponen un método por cromatografía gas-líquido para determinar AAS (Ácido acetilsalicílico) y AS (Ácido salicílico) en plasma. Ellos utilizan el fluoruro de potasio y enfriamiento para minimizar la hidrólisis del ácido acetilsalicílico usando al bisulfito de potasio al 10 por ciento como agente acidificante y el cloroformo como agente extractor, reportando que se utilicen propilparabeno y n-butilbenzoico como estándar interno. El detector empleado fue el de ionización de flama y una columna de vidrio de empaque OV-25 al 3 por ciento (68-80 mallas) Chromosorb G; la temperatura de operación del inyector es de 240°C y utilizan Helio como gas acarreador. Comentan que es posible aumentar la sensibilidad y especificidad del método si se usa un detector de conductividad térmica.

Seeger²⁹ describe un método para cuantificar AAS (Ácido acetilsalicílico) y AS (Ácido salicílico), en plasma, empleando un detector de ionización de flama, una columna de vidrio con empaque de OV-17 al 3 por ciento (80-100 mallas). con programación de temperatura de 105 °C a 195 °C, y el gas acarreador empleado es el argón.

3.9.3.- Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).

La Cromatografía líquida de alta resolución presenta las ventajas requeridas para realizar un estudio de farmacocinética, ya que ofrece especificidad, sensibilidad y simplicidad para analizar un gran número de muestras en un corto período de tiempo.

Casi todos los métodos analíticos reportados emplean una fase móvil terciaria con acetonitrilo, soluciones amortiguadoras, metanol y agua a flujos altos; con respecto a la técnica de extracción, algunos de ellos emplean gran volumen de disolvente orgánico para la extracción lo que dificulta el proceso de evaporación, causando que la técnica sea de elevado costo y el tiempo de análisis largo.

Harrison y Funk¹⁰ en 1980, desarrollaron un método para cuantificar el ácido acetyl salicílico y ácido salicílico en plasma y orina humana. Utilizaron una columna de fase inversa C₁₈ de 300 X 4 mm,

empleando como fase móvil metanol, ácido acético glacial al 1.0 por ciento (60:40 v/v), a flujo de 2 mL/min. utilizando un detector UV a λ (longitud de onda) de 310 y 280 nm. Emplean 2 ml de orina, 0.9 ml de HCl 0.27 N, 100 μ L de estándar interno y 10 ml de hexano, se agita durante 10 min. y se centrifuga a 750 r.p.m. por 5 minutos, se evapora la fase orgánica a sequedad y se resuspende en metanol para inyectar 25 μ l al cromatógrafo.

En 1981 Rumble y Roberts ⁹, propusieron un método analítico para determinar Aspirina y sus principales metabolitos en plasma y orina sin realizar extracción. Se emplea una columna en fase inversa C₁₈ de 300 X 39 mm; como fase móvil acetonitrilo, ácido fosfórico (70:30) pH 2.5 a flujo de 1 mL/min. y con detector U.V. a una λ (longitud de onda) de 313 nm. El método propuesto es complicado por el tiempo de hidrólisis de los conjugados glucurónidos. Toman 2 ml de orina en un frasco ampula con 2 ml de HCl 10 N sellándolo al vacío y esterilizándolo a 120°C durante 3 horas en una autoclave; posteriormente se enfría y se diluyen 20 μ l con agua y acetonitrilo, se centrifuga a 1500 r.p.m. durante 5 minutos y finalmente se inyectan 20 μ L del sobrenadante.

N. Buskin y Roberts en 1982 ³⁰, optimizaron un método para cuantificar salicilato y ácido salicílico en plasma, con una modificación para orina empleando una columna de ODS de 250 X 4.6 mm, con fase móvil de agua, amortiguador de fosfatos pH 2.5, acetonitrilo (30:50:20 v/v) a flujo de 1.0 ml/min, usando como estándar interno ácido m-hidroxibenzoico y empleando un detector UV a una λ (longitud de onda) de 303 nm. El análisis lo realizaron con 1 ml de orina, 1 ml de ácido oxálico 1 M y 1 ml de estándar interno; el procedimiento de extracción lo realizaron una mezcla de acetato de etilo-hexano, en una proporción de (1:4 v/v). También cuantificaron los conjugados glucurónidos del ácido salicílico con una hidrólisis térmica a 120 °C durante una hora.

Mays y Sharp en 1984 ²⁴, desarrollan un método semiautomático para determinar en plasma y orina ácido salicílico, ácido acetilsalicílico, ácido salicílico y conjugados glucurónidos en conejos y humanos. El método se ha aplicado a estudios de farmacocinética y biodisponibilidad en conejos, ratas y humanos. Las condiciones cromatográficas empleadas fueron una columna de C₁₈ de 250 X 46 mm, una fase móvil de amortiguadores de fosfatos pH 2.5, metanol, acetonitrilo (68:16:16) a flujo de 1.5 ml/min, con un detector UV a una λ (longitud de onda) de 237 nm. El método de preparación de muestra que

ellos emplearon es laborioso y requiere un tiempo de análisis largo, por el tiempo de incubación con la enzima β -glucuronidasa durante 20 horas; además se toman múltiples alícuotas y aforos durante el procedimiento y se utiliza un volumen grande de diclorometano (12ml) para la extracción.

James.O Kruk y Michael en 1984 ⁸, reportaron un método al cual sólo le hicieron modificaciones a la técnica original de Rumble ⁹, mejoraron la resolución de los metabolitos y acortaron el tiempo de retención de los mismos, requiriendo un tiempo de análisis de 10 min. Posteriormente probaron el método en ratas y humanos; las condiciones que emplearon fueron una columna de fase inversa C₈ de 250 X 4.6 mm, usando como fase móvil metanol y amortiguador de fosfatos pH 3.9 (35:65 v/v) a flujo de 2 ml/min, con un detector de UV, a una λ (longitud de onda) de 313 nm.

En 1991 Shen Jinglian ⁷, reportaron un método para determinar simultáneamente todos los metabolitos de Aspirina en orina y plasma; realizaron 2 hidrólisis una alcalina con NaOH 0.1 M y otra enzimática empleando la β -glucuronidasa. La separación la llevaron a cabo en una columna de fase inversa fenólica de 300 X 4.6 mm, usando una fase móvil de metanol, acetonitrilo, trietilamina y amortiguador de fosfatos pH 2.8 (18:110:1:87 v/v), a flujo de 1 ml/min., empleando un detector UV a 237 nm. El tratamiento para la hidrólisis de los glucurónidos es de 2 horas a 37 °C y no se requiere extracción con disolventes orgánicos, lo cual facilita el método de análisis.

Winthrop Lague y col. ³¹ Realizaron un método para cuantificar AAS (Ácido acetilsalicílico) y AS (Ácido salicílico), en plasma, utilizando diclorometano y HCl 6 N para la extracción, trabajando con un detector de fluorescencia a una λ (longitud de onda) de 318-327 nm de excitación y de 350-488 nm de emisión.

Saúl L. y Kander ³², desarrollaron un método por CLAR acoplado a un detector de fluorescencia para cuantificar el AS (Ácido salicílico), utilizando nitrato de amonio como agente extracción; la determinación la efectuaron a una λ (longitud de onda) de 323 nm de excitación y 455 nm de emisión.

3.10. Propiedades particulares de la orina.

La orina a diferencia del plasma está libre de proteínas y lípidos, sin embargo puede presentar una mayor variación en su composición y esto se puede observar en el color ámbar oscuro de la orina recolectada en las mañanas y en el color amarillo pálido cuando se colecta durante el día. La composición de la orina depende de la dieta así como del estado de salud del individuo.

En la recolección de la muestra es importante medir el volumen total de orina recolectada, así como evitar perder volumen de ésta. En los métodos de excreción urinaria lo que interesa es la cantidad excretada, si el volumen de orina es muy grande la cantidad de fármaco excretado será muy pequeña y por lo tanto el análisis estará sujeto a errores asociados con bajas concentraciones y la pérdida de volumen sería una fuente importante en la variación de la cantidad de fármaco.

La orina está sujeta a cambios de pH en un amplio intervalo, que dependen en su mayor parte de la dieta y de los medicamentos ingeridos. El pH normal se encuentra entre 5.5 y 7.0 y cualquier alteración en el pH de la orina altera la excreción de los fármacos. Los fármacos básicos se excretan más fácilmente en orina ácida, mientras que los fármacos ácidos se excretan mejor en orina alcalina. Por otra parte, la composición de la orina cambia con el tiempo de almacenamiento ya que el CO_2 se va perdiendo, causando que la orina se vuelva más alcalina y cause la precipitación de fosfatos inorgánicos

CAPITULO IV

PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Material, Equipos e Instrumentos

1. Balanza analítica digital Sartorius, Mod 895320.
2. Balanza granataria Ohaus, Mod. 21975.
3. Baño water-Bath Lab-Line.
4. Sonificador Branson, Mod. 5210.
5. Centrifuga Clay Adams, Mod. 211466.
6. Vortex, Agitador vortex Thermolyne, modelo 16700.
7. Centrifuga Damon/EC División, modelo IEC HN-SII.
8. Balanza analítica Sartorius 1801.
9. Evaporador de disolventes.
10. Sistema de filtración de disolventes Millipore.
11. Equipo desionizador de agua Millipore.
12. Micropipeta de 100 - 1000 mL con puntas de propileno de capacidad de 1 mL, Beckman.
13. Micropipeta de 50 - 200 mL con puntas de propileno de capacidad de 200 mL, Beckman.
14. Durómetro Schleuniger Mod.2E/106.
15. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Waters-Millipore, equipado con:
Bomba Waters modelo 481, integrador Waters 745-b Data Module, inyector manual Perkin Elmer modelo 7125 con un loop de inyección de 20 µL, Detector UV-VIS de longitud de onda variable.
16. Columna fase inversa, Spherisorb, ODS 250 x 4.6 mm con 5m de tamaño de partícula. C₁₈.

4.2. Reactivos y sustancias de referencia.

- a) Ácido salicílico, Tecnología Farmacéutica, lote N° KR114
- b) Ácido salicílico (ácido O-hidroxihipúrico), marca Sigma, lote N° 103H744.
- c) Metil parabeno, Tecnología Farmacéutica, lote N° 19910.

- d) Ácido clorhídrico concentrado, J.T.Baker, lote N° 9535-61.
- e) Metanol R.A, J. T Baker, lote N° 96-110.
- f) Acetato de etilo R.A, J.T.Baker, lote N° M-36448.
- g) Diclorometano, R.A, Merck, lote N° 234.
- h) Ácido acético glacial, R.A, J.T.Baker, lote N° 9601-59.
- i) Metanol grado cromatografico, (filtrado y desgasificado), Mallinckrodt, lote N° 9093-03.
- j) Agua grado cromatográfico, (destilada, desionizada, filtrada en 0.22 μ y desgasificada).
- k) Nitrógeno no cromatográfico, Infra.
- l) Hidroxido de sodio, R.A.
- m) Ácido sulfurico, R.A.

4.3. Soluciones

- a) Solución amortiguadora de acetatos pH = 4.5
- b) Solución de NaOH 0.5 N
- c) Ácido sulfúrico 0.5 N
- d) Ácido Clorhídrico 0.6 N.
- e) Mezcla de acetato de etilo-diclorometano (80:20 v/v).
- f) Solución de metilparabeno de concentración de 50 μ g/mL (estándar interno).
- g) Solución estándar de ácido salicílico de concentración 1000 μ g/mL en metanol grado cromatografico, (filtrado y desgasificado).
- h) Solución estándar de ácido salicílico de concentración 1000 μ g/mL en metanol grado cromatografico, (filtrado y desgasificado).
- i) Solución de ácido salicílico de concentración 1000 μ g/mL en orina libre de fármaco.
- j) Solución de ácido salicílico de concentración 1000 μ g/mL en orina libre de fármaco.

4.4. Preparación de las soluciones.

- Solución amortiguadora de acetatos pH = 4.5.

Transferir 3.0 g de acetato de sodio trihidratado a un matraz volumétrico de 1 L, adicionar 30 mL de agua destilada, agitar hasta disolución, agregar 1.6 mL de ácido acético glacial, llevar a volumen, mezclar y verificar el pH, ajustar, si es necesario, según sea el caso, con ácido acético glacial 0.1 N o con NaOH 0.1 N a pH 4.5 +/- 0.1.

- Solución de NaOH 0.5 N.

Transferir 20 gramos de hidróxido de sodio a un matraz volumétrico de 1 L disolver y llevar a volumen con agua destilada hervida.

- Solución de H₂SO₄

Adicionar 24.52 gramos de ácido sulfúrico a 700 mL de agua destilada contenida en un matraz volumétrico de 1 L. Enfriar y llevar a volumen con agua destilada.

- Solución de ácido clorhídrico 0.6 N.

Transferir 3.2 mL de HCl concentrado a un matraz volumétrico de 50 mL, llevar a volumen con agua destilada y mezclar.

- Solución estándar de ácido salicílico y ácido salicílico en metanol grado cromatográfico.

Transferir 0.0250 g de ácido salicílico (ASu) y 0.0250 g de ácido salicílico (ASa) en matraz volumétrico de 25 mL, disolver y aforar a volumen con metanol grado cromatográfico

Esta es la solución estándar contiene de 1000 µg/mL de cada sustancia. De ella se toman alícuotas para las diluciones de la curva patrón.

- Solución estándar de metilparabeno en metanol grado cromatográfico (Estándar interno).

Transferir 0.0250 g de metilparabeno a un matraz de 25 mL, disolver y llevar a volumen con metanol grado cromatográfico. Esta solución contiene 1000 µg/mL, a partir de ella se efectúa una dilución de 2.5 mL a 50 mL para obtener una concentración de 50 µg/mL, de esta solución se tomarán

alícuotas para reconstituir las muestras y los puntos de la curva patrón, una vez evaporadas las muestras.

Tabla No 4.1

Diluciones para la curva de calibración de ácidos salicílico y salicílico en metanol

Solución No.	Alícuota de solución estándar [1000 µg/mL] mL	Alícuota de estándar interno Metil-parabeno [1000 µg/mL] mL	Aforo con metanol R.A. (mL)	Conc. ASu ácido salicílico µg/mL	Conc. ASa ácido salicílico µg/mL.
1	3	0.5	10.0	300	300
2	2	0.5	10.0	200	200
3	1	0.5	10.0	100	100
4	0.5	0.5	10.0	50	50
5	0.1	0.5	10.0	10	10

Tabla No. 4.2

Diluciones para la curva de calibración de ácidos salicílico y salicílico en orina

Solución No.	Alícuota de solución estándar [1000 µg/mL] en mL	Aforo con orina libre de fármaco	Conc. Asu µg/mL.	Conc. As µg/mL.
1	0.1	10.0	10	10
2	0.5	10.0	50	50
3	1	10.0	100	100
4	2	10.0	200	200
5	3	10.0	300	300

4.5. Condiciones Cromatográficas.

Columna: C₁₈ ODS-2, dimensiones 250 × 4.6 mm, tamaño de partícula, 5 micras.

Fase móvil: Metanol/Agua/ ácido acético filtrado (55:44:1) v/v

Flujo: 0.7 mL/ minuto.

Detector de longitud de onda variable U.V.-VIS a una longitud de onda de : 290 nm.

Para llevar a cabo la correlación de la concentración con respecto a la respuesta, se utilizaron las alturas relativas (Arel.), con respecto al estándar interno, para determinar la concentración de Asu y As.

$$Arel. = (\text{Altura del analito} / \text{Altura de estándar interno})$$

NOTA: El estándar interno tiene una concentración constante de 50 µg/mL.

4.6. Procedimiento de extracción.

Las muestras biológicas para la realización de este estudio fueron donadas por seres humanos aparentemente sanos, con edades comprendidas entre los 20 y 30 años, de sexo masculino, los cuales firmaron una carta de consentimiento (Apéndice 1).

El método analítico empleado fue el propuesto por la tesisista Guadalupe Canseco Ruiz, el cual se presenta en la tesis titulada "Desarrollo y validación de un método analítico para determinar metabolitos de aspirina, ácido salicílico y ácido salicílico en orina por cromatografía de líquidos de alta resolución". Se modificó solamente la concentración del estándar interno a 50 µg/mL en vez de la concentración propuesta de 200 µg/mL.⁴¹

Método propuesto:

Transferir 1 mL de orina problema a un tubo de ensaye, adicionar 0.5 mL de HCl 0.6 N, mezclar durante 10 segundos en vortex, agregar 2.0 mL de una mezcla de acetato de etilo-diclorometano (80:20 v/v) y agitar fuertemente en vortex durante 1 minuto.

Centrifugar durante 10 minutos a 2500 r.p.m., con el objeto de romper la emulsión y separar las fases orgánica y acuosa, separar el sobrenadante orgánico (fase superior) y transferirlo en un tubo de

ensaye limpio; desechar la fase acuosa. Evaporar el extracto orgánico a sequedad utilizando una suave corriente de nitrógeno, y un baño con agua a 35 °C.

Resuspender el residuo en 1.5 mL de solución de estándar interno (contiene 50 µg/mL de metilparabeno), agitar en vortex durante 30 segundos y proceder a inyectar 20 µl al cromatógrafo.

Nota: Durante la evaporación, la corriente de nitrógeno debe ser suave y la temperatura no mayor a 35 °C, para evitar la sublimación del ácido salicílico y se dé lugar a la formación de un compuesto metil éster de ácido salicílico⁴². El diagrama de flujo se esquematiza en la siguiente figura.

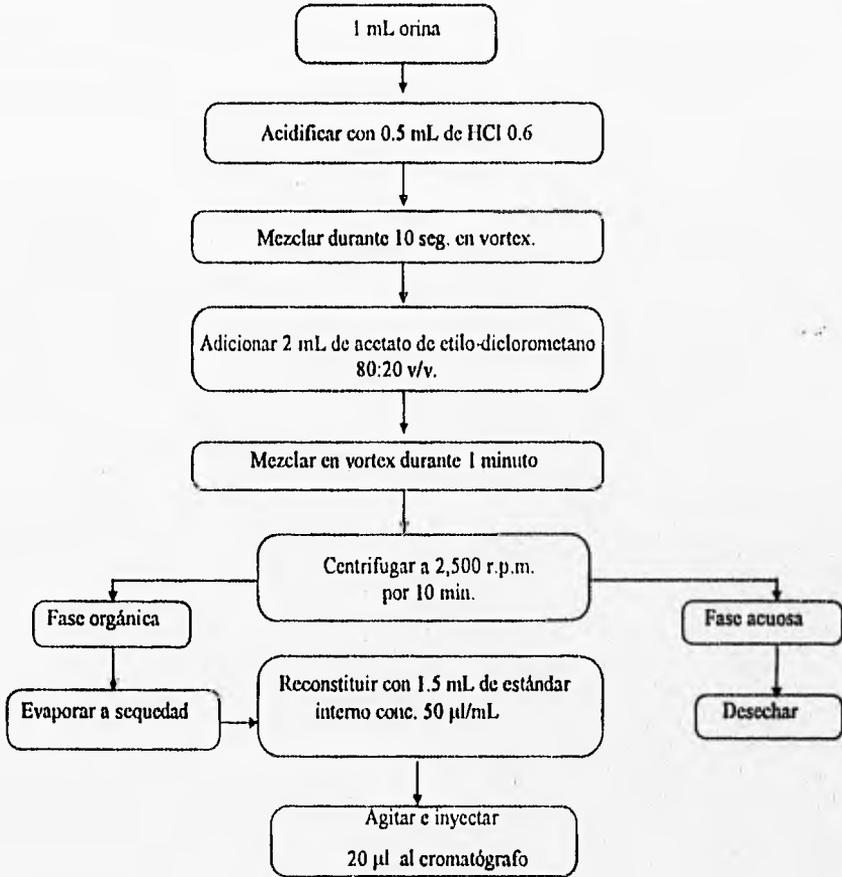


Fig.no. 4.1. Diagrama de flujo de la extracción de ASu y ASa en orina.

4.7.- Pruebas de validación del sistema.

4.7.1.- Linealidad.

Para determinar si la relación de áreas con respecto a las diferentes concentraciones de ASu y As en metanol, presentan un comportamiento lineal en el intervalo de concentraciones propuesto, preparar tres curvas de calibración de concentraciones de 10, 50, 100, 200, 300 $\mu\text{g/mL}$ de ácido salicílico y ácido salicílico en metanol en un mismo día, como se indica en la tabla 4.1.

Criterio de aceptación:

Si $r > 0.99$, $r^2 > 0.98$, entonces se acepta el coeficiente de regresión.³⁹

4.7.2.- Precisión evaluada como repetibilidad.

Se determina la precisión del sistema al analizar por sextuplicado bajo las mismas condiciones de operación de equipo, reactivos, analista y día, una muestra ácido salicílico y ácido salicílico de 300 $\mu\text{g/mL}$ en metanol, en el intervalo de linealidad propuesto.

Criterio de aceptación:

Si el C.V. < 2.0 por ciento entonces el sistema es preciso.³⁹

4.8.- Pruebas de validación del método analítico.

4.8.1.- Linealidad.

Para evaluar la relación que existe entre la cantidad agregada de analitos y la cantidad recobrada después de la extracción en orina, se prepararan tres curvas de calibración en orina en el intervalo de concentraciones de 10, 50, 100, 200, y 300 $\mu\text{g/mL}$ de ácido salicílico y de ácido salicílico respectivamente en un mismo día, como se indica en la tabla 4.2.

Criterio de aceptación:

Si $r > 0.98$, $r^2 > 0.98$ y C.V. < 10 por ciento, para que el método se considere lineal.⁴³

4.8.2.- Precisión del método, evaluada como repetibilidad.

Para evaluar la precisión del método analítico en el mismo día de trabajo bajo las mismas condiciones de operación de reactivos, equipo, día y analista. Se determina al analizar por sextuplicado una solución estándar con 300 µg/mL de ácido salicílico y ácido salicílico en orina.

Criterio de aceptación:

Si el % C.V. < 10 por ciento entonces el método es preciso intradías.⁴⁴

4.9. Pruebas de control de calidad de los productos.

Las pruebas de control de calidad se efectuaron de acuerdo a los lineamientos especificados en la FEUM sexta edición (1994).

4.9.1. Uniformidad de dosis por el método de Variación de peso.

Se elige este método porque la cantidad de principio activo único es mayor de 50 mg y constituye más del 50 por ciento del peso total de la tableta. Se pesan con precisión 10 tabletas, determinándose el peso promedio. Con el resultado de la valoración del ingrediente activo obtenido como se indica en la monografía individual (4.10.4.), calcular el ingrediente activo a cada una de las 10 tabletas, suponiendo que el ingrediente activo está distribuido homogéneamente.

Criterio de aceptación:

85 a 110 por ciento de la cantidad indicada en el marbete y la desviación estándar relativa menor o igual al 6 por ciento.

4.9.2. Friabilidad.

Para la prueba de friabilidad, se pesaron 20 tabletas libres de polvo y se depositaron en el aparato, realizándose la determinación a 25 R.P.M. durante 4 minutos. Se calculó la friabilidad por ciento.

$$((\text{Peso inicial} - \text{Peso final}) / \text{Peso inicial}) * 100 \hat{=} \% \text{ Friabilidad}$$

Criterio de aceptación: % Friabilidad \leq 1.0%

4.9.3. Prueba de dureza.

Se realizó en 10 tabletas y se determino la dureza en un aparato Schleuniger Mod.2E/106, se calculó la dureza promedio y su desviación estándar.

4.9.4. Valoración.

Solución de Referencia.- Transferir 10 mg de AAS Sref. (ác. Acetilsalicílico estándar de referencia), a un matraz volumétrico de 10 mL, agregar 5 mL de agua y 2 mL de solución 1 N de NaOH, agitar, llevar al aforo con agua, y mezclar. Transferir una alícuota de 5 mL de esta solución, a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar al aforo con una solución 0.1 N de NaOH y mezclar. Esta solución contiene 50 $\mu\text{g/mL}$ de AAS.

Solución de la muestra.- Triturar hasta polvo fino no menos de 20 tabletas, y transferir una porción del polvo, equivalente a 50 mg de AAS, a un matraz volumétrico de 50 mL, agregar 20 mL de agua y 10 mL de solución 1N de NaOH, agitar, llevar al aforo con agua y filtrar. Transferir una alícuota de 5 mL del filtrado, a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar al aforo con solución 0.1 N de NaOH y mezclar.

Procedimiento.- Determinar las absorbancias de ambas soluciones, a la longitud de onda de máxima absorción (306 nm aproximadamente), en celdas de un cm, utilizando como blanco solución 0.1 N de NaOH.

Calcular la cantidad en μg de AAS en la porción de muestra tomada, por la fórmula: $CD(Am/ARef)$; en la que C es la concentración en $\mu\text{g/mL}$ de AAS, en la solución de referencia, D es el

factor de dilución de la muestra y A_m y A_{ref} son las absorbancias. Relacionar el valor obtenido con el peso promedio de las tabletas.

4.9.5. Prueba de disolución.

Emplear el aparato No.1 (aparato de disolución con la modalidad de canastillas) colocar cada tableta en el aparato con 500 mL de solución amortiguadora 0.05M de acetatos como medio de disolución y operar el aparato a 50 R.P.M. durante 30 min. a una temperatura de 37°C. Para determinar la cantidad de ácido acetil salicílico disuelta, efectuar las diluciones convenientes con solución amortiguadora y determinar las absorbancias a la longitud de 265 nm, en comparación con una solución de referencia de AAS de concentración conocida disuelta en solución amortiguadora, preparada al momento. Criterio de aceptación:

$$Q = 80 \text{ por ciento.}$$

Interpretación:

La prueba se realiza con 6 muestras y ninguno de los resultados debera de ser menor de $Q + 5$ por ciento.

Para realizar un perfil de disolución, tomar 3 mL de muestra del medio de disolución a los siguientes tiempos: 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 y 90 minutos y determinar la concentración de AAS disuelto en el medio a las condiciones mencionadas en el párrafo anterior

Preparar una curva estándar de AAS en solución amortiguadora de acetatos con las siguientes concentraciones: 20, 50, 100, 200, 300 y 500 mg/mL. determinando su absorbancia a 265 nm.

4.10. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS POR CLAR.

Estos estudios se llevaron a cabo en el laboratorio de Biofarmacia de la Facultad de Química, y el análisis de las muestra se realizó en el laboratorio 112 de Biofarmacia del edificio E de la Facultad de Química; los mismos sujetos que donaron las muestras, fungieron como su propio control experimental.

4.10.1.- Diseño experimental del estudio de bioequivalencia.

Se realizó un estudio de bioequivalencia previo al estudio de biodisponibilidad, se llevó a efecto en 2 semanas como estudio cruzado con 6 voluntarios aparentemente sanos, los cuales se ajustaron al siguiente protocolo:

- 1.- No ingerir ningún medicamento o alcohol una semana antes de iniciar y durante el estudio.
- 2.- No tomar ningún alimento 12 hrs. antes de iniciar el experimento.

Cada voluntario recibirá en días diferentes, una tableta de ácido acetil salicílico de 500 mg de un producto nacional y de un producto de referencia de acuerdo al siguiente diseño experimental:

SEM. / VOL.	1	2	3	4	5	6
1a	C	C	C	C	P	P
2a	P	P	P	P	C	C

C = Producto comercial.
P = Producto de referencia.

El protocolo a seguir se señala a continuación:

1. - Los voluntarios permanecerán en ayuno a partir de las 22:00 hrs. del día anterior al estudio.
2. - Vaciar la vejiga y desechar.
3. - Ingerir 250 mL de agua, 1.5 hrs. antes de la administración del medicamento.
4. - Antes de ingerir el medicamento vaciar la vejiga completamente y guardar una alícuota de 20 mL. Esta muestra corresponde al tiempo cero y se utilizará como blanco.
5. - Ingerir una tableta ya sea del producto comercial o bien el producto de referencia, con 200 mL de agua, de acuerdo al diseño experimental.
6. - Tomar 200 mL de agua cada media hora durante las 4 primeras horas del estudio. Ingerir alimento ligero 4 horas después de la ingestión del medicamento.
7. - Recolectar muestras de orina a los siguientes tiempos : 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0 y 30 hrs., después de ingerir el medicamento, midiendo con exactitud en probeta los volúmenes de orina colectados en cada tiempo y el pH de la muestra. Guardar en el congelador a -4°C un volumen de aproximadamente 10 mL y desechar el volumen sobrante.

8. - Cuantificar ácido salicílico y salicílico en cada una de las muestras utilizando el método analítico descrito, dejando descongelar las muestras previamente a temperatura ambiente.
9. - Interpolar los valores de alturas relativas obtenidos en el punto anterior, en la curva patrón obtenida como se señala en la tabla 4.2.

4.10.2.- Diseño experimental del estudio de biodisponibilidad.

El estudio se realizó en 6 voluntarios aparentemente sanos a los cuales se les administró una dosis única de ácido acetil salicílico (tableta comercial de 500 mg). Los voluntarios ingerirán la tableta con una dieta rica en lípidos, tomando aproximadamente 30 g de éstos (mantequilla sobre pan tostado). Se administrará una tableta del producto diez minutos después de la ingestión de los alimentos, de acuerdo al siguiente diseño experimental en paralelo:

		VOLUNTARIOS					
SEMANA	DIA	1	2	3	4	5	6
1	1	P	P	P	P	P	P
2	2	C	C	C	C	C	C

- C administración del producto comercial conjuntamente con lípidos.
 P administración del producto comercial en ayunas.

El protocolo a seguir es el mismo que el indicado en el punto 4.11.1 para el estudio de bioequivalencia.

CAPITULO V

RESULTADOS EXPERIMENTALES

5.1. Resultados de las pruebas de validación del sistema y del método analítico.

Los tiempos de retención (t_r), encontrados en las condiciones cromatográficas mencionadas en el punto 4.6. y los cromatogramas respectivos son los siguientes:

Componente	Tiempo de retención
Ácido salicílico (Asu)	6.6 min.
Ácido salicílico (As)	13.5 min.
Metil parabeno (MP)	11.5 min.

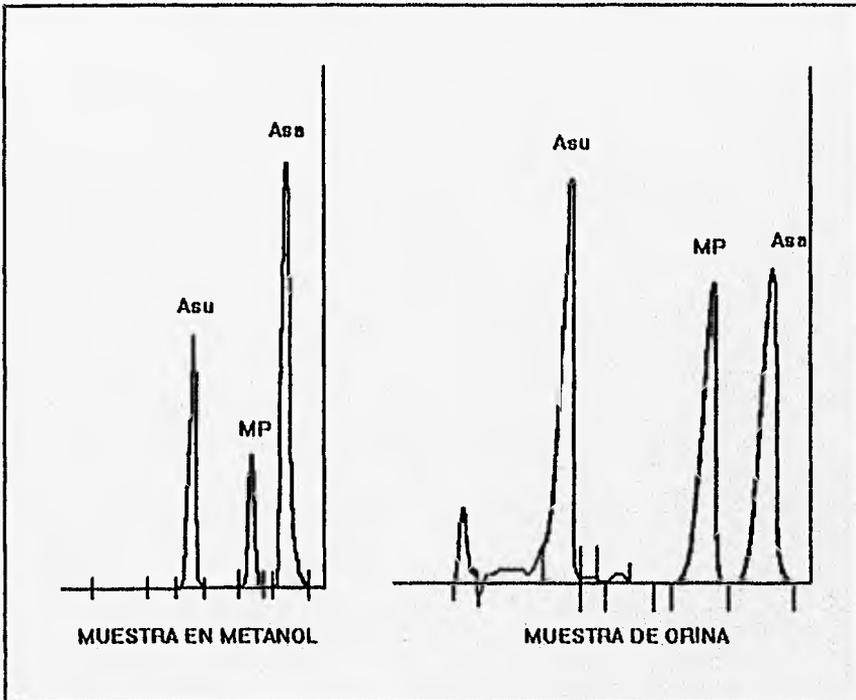


Figura 5.1 cromatogramas con muestra en Metanol y en orina.

Para llevar a cabo el desarrollo de este trabajo de tesis, fue necesario observar el comportamiento del sistema y del método analítico, empleando las muestras biológicas, con el fin de establecer el intervalo de concentración adecuado, para cuantificar los metabolitos en las muestras de orina. Se comprobó por medio del análisis de las muestras en diferentes tiempos del intervalo de recolección, que el intervalo, de concentraciones más adecuado fue de 10 a 300 $\mu\text{g/ml}$ de cada uno de los metabolitos.

Los resultados de linealidad del sistema y del método en el intervalo seleccionado se presentan a continuación.

5.1.1. Linealidad del sistema.

Resultados para ácido salicílico Asu:

CONCENTRACIÓN $\mu\text{g/ml}$	RELACIÓN DE ALTURAS	ESTADÍSTICA
10	1.2829	Media = 1.2780
10	1.365	D.E. = 0.0894
10	1.1863	C.V.% = 6.9 %
50	6.3943	Media = 6.4015
50	6.764	D.E. = 0.3589
50	6.0462	C.V.% = 5.6 %
100	12.2319	Media = 12.6379
100	13.615	D.E. = 0.8502
100	12.0668	C.V.% = 6.7 %
200	24.2708	Media = 24.8626
200	26.445	D.E. = 1.3847
200	23.8721	C.V.% = 5.5%
300	36.8393	Media = 37.3885
300	39.514	D.E. = 1.9110
300	35.8122	C.V.% = 5.1%

PARÁMETRO DE REGRESIÓN	CURVA No. 1	CURVA No. 2	CURVA No. 3	PARÁMETROS DE REGRESIÓN PROMEDIO DE LAS 3 CURVAS
r	0.999929	0.999943	0.99989	$r = 0.999920$
r^2	0.999858	0.999886	0.99978	$r^2 = 0.99984$
m	0.1219	0.1312	0.1177	m = 0.1367
b	0.1031	0.2203	0.08999	b = 0.2392

Se realizó una prueba de "t" a los parámetros m (pendiente), b (ordenada al origen), para comprobar que las diferencias existentes no son significativamente diferentes. La prueba de "t" se efectuó en el programa computacional Origin versión 3.73.

Resultado de la prueba de "t" para la pendiente en Asu

Prueba de "t" para 1 población

	Media	Varianza	N
A	0.1236	9.513E-5	3

$$t = 0 \quad p = 1$$

A un nivel de 0.05 las medias no son significativamente diferentes.

Resultado de la prueba de "t" para la ordenada en Asu:

Prueba de "t" para 1 población

	Media	Varianza	N
A	0.23923	0.02147	3

$$t = 3.94041E-4 \quad p = 0.99972$$

A un nivel de 0.05 las medias no son significativamente diferentes.

Linealidad para el ácido salicílico (Asa):

CONCENTRACIÓN µg/ml	RELACIÓN DE ALTURAS	ESTADÍSTICA
10	1.3464	Media = 1.4131
10	1.4632	D.E. = 0.0601
10	1.4299	C.V.% = 4.2 %
50	6.6296	Media = 6.7705
50	6.549	D.E. = 0.3165
50	7.1331	C.V.% = 4.6 %
100	13.4219	Media = 13.7097
100	13.0205	D.E. = 0.8696
100	14.6869	C.V.% = 6.3 %
200	26.8972	Media = 27.2675
200	25.9472	D.E. = 1.5393
200	28.9583	C.V.% = 5.6 %
300	40.23	Media = 41.0886
300	39.065	D.E. = 2.0105
300	43.386	C.V.% = 4.8 %

PARÁMETRO DE REGRESIÓN	CURVA No. 1	CURVA No. 2	CURVA No. 3	PARÁMETROS DE REGRESIÓN PROMEDIO DE LAS 3 CURVAS
r	0.999995	0.999975	0.99998	$\bar{r} = 0.999920$
r ²	0.999900	0.99995	0.99996	$\bar{r}^2 = 0.99984$
m	0.13428	0.1447	0.12969	m = 0.1367
b	-0.0209	0.0165	0.08999	b = 0.2392

Se realizó una prueba de "t" a los parámetros m (pendiente), b (ordenada al origen), para comprobar que las diferencias existentes *no son significativamente diferentes*. Esta prueba se efectuó por medio del programa computacional Origin ver. 3.73.

Resultado de la prueba de "t" para la pendiente en la linealidad del ácido salicílico en el intervalo de 10- 300 µg/ml.

Prueba de "t" para 1 población

	Media	Varianza	N
A	0.13622	5.91574E-5	3

$$t = 0.00525 \quad p = 0.99628$$

A un nivel de 0.05 las medias no son significativamente diferentes.

Resultado de la prueba de "t" para la ordenada en la linealidad del ácido salicílico en el intervalo de 10-300 $\mu\text{g/ml}$.

Prueba de "t" para 1 población

	Media	Varianza	N
A	0,0285	0,00318	3

$$t = 0.87576 \quad p = 0.47352$$

A un nivel de 0.05 las medias no son significativamente diferentes.

5.1.2. Linealidad del método.

Linealidad del método para el ácido salicílico, (Asu):

CONCENTRACIÓN $\mu\text{g/ml}$	RELACIÓN DE ALTURAS	ESTADÍSTICA
10	0.4794	Media = 0.4796
10	0.4302	D.E. = 0.04049
10	0.5294	C.V.% = 8.4 %
100	5.1128	Media = 5.0024
100	4.8835	D.E. = 0.0938
100	5.0109	C.V.% = 1.8 %
200	9.0639	Media = 9.7081
200	9.8319	D.E. = 0.4834
200	10.2286	C.V.% = 4.9 %
300	14.5058	Media = 14.9832
300	15.0987	D.E. = 0.3522
300	15.3452	C.V.% = 2.3 %

PARÁMETRO DE REGRESIÓN	CURVA No. 1	CURVA No. 2	CURVA No. 3	PARÁMETROS DE REGRESIÓN PROMEDIO DE LAS 3 CURVAS
r_2	0.9964	0.9999	-0.0311	$r_2 = 0.9997$
r^2	0.9982	0.9998	0.05121	$r^2 = 0.9995$
m	0.0474	0.0486	0.99996	m = 0.04971
b	0.0553	-0.0021	0.99992	b = -0.0377

Se realizó una prueba de "t" a los parámetros m (pendiente), b (ordenada al origen), para comprobar que las diferencias existentes *no son significativamente diferentes*. Esta prueba se efectuó por medio del programa computacional Origin ver. 3.73.

Resultado de la prueba de "t" para la pendiente en la linealidad del ácido salicílico en el intervalo de 10-300 $\mu\text{g/ml}$.

Prueba de "t" para una población

	Media	Varianza	N
A	0.04375	1.14507E-4	3

$$t = 0.00108 \quad p = 0.9992$$

A un nivel de 0.05 las medias no son significativamente diferentes.

Resultado de la prueba de "t" para la ordenada en la linealidad del ácido salicílico en el intervalo de 10-300 $\mu\text{g/ml}$.

Prueba de "t" para una población

	Media	Varianza	N
A	0.02823	0.00108	3

$$t = 1.78542 \quad p = 0.21612$$

A un nivel de 0.05 las medias no son significativamente diferentes.

Linealidad del método para el ácido salicílico (Asa):

CONCENTRACIÓN $\mu\text{g/ml}$	RELACION DE ALTURAS	ESTADÍSTICA
10	0.389784	Media = 0.4549
10	0.458189	D.E. = 0.0520
10	0.51710	C.V.% = 11.4
100	4.883561	Media = 4.9575
100	5.505800	D.E. = 0.4207
100	4.483302	C.V.% = 8.4 %
200	9.831922	Media = 9.6968
200	11.09958	D.E. = 1.2042
200	8.159029	C.V.% = 12.4
300	14.786618	Media = 14.9205
300	17.768611	D.E. = 2.2727
300	12.206379	C.V.% = 15.2 %

PARÁMETRO DE REGRESIÓN	CURVA No. 1	CURVA No. 2	CURVA No. 3	PARÁMETROS DE REGRESIÓN PROMEDIO DE LAS 3 CURVAS
R_2	0.9999	0.9990	0.9994	$\bar{r} = 0.9997$
R^2	0.9999	0.9980	0.9989	$r^2 = 0.9995$
m	0.0496	0.0593	0.0399	m = 0.04971
b	-0.0949	-0.3424	0.2546	b = -0.0377

Resultado de la prueba de "t" para la pendiente en la linealidad del ácido salicílico en el intervalo de 10-300 $\mu\text{g/ml}$.

Prueba de "t" para 1 población

	Media	Varianza	N
A	0.0496	9.409E-5	3

$$t = 0 \quad p = 1$$

A un nivel de 0.05 las medias no son significativamente diferentes.

Resultado de la prueba de "t" para la ordenada en la linealidad del ácido salicílico en el intervalo de 10-300 $\mu\text{g/ml}$.

Prueba de "t" para 1 población

	Media	Varianza	N
A	0.06107	0.09011	3

$t = -3.84665E-1$ $p = 0.99973$

A un nivel de 0.05 las medias no son significativamente diferentes.

5.2. Resultados de pruebas de control de calidad de tabletas.

5.2.1.- Prueba de dureza

Resultados de las tabletas del producto comercial de AAS

TABLETA	Kp	SC
1	10.6	15
2	9.1	12.8
3	10.6	15
4	10.2	14.2
5	8.9	12.5
6	9.3	13
7	8.9	12.5
8	9.4	13.1
9	9.1	12.7
10	9	12.5
PROMEDIO	9.51	13.33
DES.EST.	0.6871	1.0133

Resultados de las tabletas del producto innovador de AAS

TABLETA	Kp	SC
1	13.2	18.5
2	7.7	10.7
3	12.2	17
4	11.9	16.7
5	12.7	17.8
6	9.1	12.7
7	10.4	14.5
8	9.4	13.1
9	12	16.7
10	9.1	12.7
PROMEDIO	10.77	15.04
DES. EST.	1.8702	2.6412

5.2.2. Prueba de friabilidad .

Criterio: % friabilidad ≤ 1

Resultados de las tabletas de AAS (producto comercial):

TABLETA	PESO Inicial (g)
PESO INICIAL	0.5532
PESO FINAL	05508
Friabilidad %	0.24 %

Cálculo de % Friabilidad:

$$\% \text{ Friabilidad} = \frac{(\text{Peso inicial} - \text{Peso final})}{(\text{Peso inicial})} \cdot 100$$

Resultados de las tabletas de AAS (producto innovador):

TABLETA	PESO Inicial (g)
PESO INICIAL	0.3581
PESO FINAL	0.3550
Friabilidad %	0.86 %

Cálculo de % Friabilidad:

$$\% \text{ Friabilidad} = \frac{(\text{Peso inicial} - \text{Peso final})}{(\text{Peso inicial})} \cdot 100$$

5.2.3. Prueba de valoración.

$$\text{Fórmula : mg de AAS/tableta} = [C D (A_m / A_{ref}) \cdot 1000 \cdot P.P.] / M$$

Donde: C = concentración de AAS $\mu\text{g/ml}$ solución de referencia. (50 $\mu\text{g/ml}$)

D = factor de dilución.

A_m y A_{ref} = son las absorbancias de la muestra y la referencia.

P.P. = Peso Promedio (expresado en mg).

M = Muestra utilizada (expresada en mg).

Producto	C ($\mu\text{g/ml}$)	% de AAS	P.P. (mg)	AAS/tableta (mg)
Innovador	50	97.0	358.1	313.5
Comercial	50	103.0	553.3	517.1

5.2.4. Prueba de disolución.

Primera Etapa:

Porcentaje disuelto a los 30 minutos, en el aparato 1, a 37 °C y 50 r.p.m. en 500 ml de una solución 0.05M de acetatos. (Los resultados se presentan en el apéndice 4)

PRODUCTO	% DISUELTO
INNOVADOR	81.15 +/- 3.3
COMERCIAL	80.22 +/- 2.7

Criterio Q+5 %

5.2.5. Prueba de uniformidad de dosis

TABLETA	PESO (g)	CONTENIDO DE AAS (mg)	CONTENIDO POR CIENTO
1	0.3595	316.5	97.4
2	0.377	331.9	102.1
3	0.3567	314.0	96.8
4	0.3505	308.6	94.9
5	0.3508	308.8	95.0
6	0.3551	312.6	96.2
7	0.3546	312.2	96.1
8	0.3607	317.5	97.7
9	0.3632	319.7	98.4
10	0.3469	305.4	94.0
11	0.3536	311.3	95.8
12	0.3577	314.9	96.9
13	0.3588	315.9	97.2
14	0.326	287.0	88.3
15	0.3579	315.1	96.9
16	0.3611	317.9	97.8
17	0.3664	340.2	104.7
18	0.3636	320.1	98.5
19	0.3564	313.7	96.5
20	0.3656	321.8	99.0
PROMEDIO	0.3581	315.3	97.0
DER.	3.2680	3.2680	3.2680

Criterio: no menos del 85.0 por ciento y no más del 115 por ciento

DER \leq 6.0 %

Producto comercial:

TABLETA	PESO (g)	CONTENIDO DE AAS (mg)	CONTENIDO POR CIENTO
1	0.5561	517.6	103.5
2	0.5506	512.5	102.5
3	0.5477	509.8	102.0
4	0.543	505.4	101.1
5	0.5556	517.2	103.4
6	0.5589	520.2	104.0
7	0.5494	511.4	102.3
8	0.5474	509.5	101.9
9	0.5653	526.2	105.2
10	0.5514	513.3	102.7
11	0.5483	510.4	102.1
12	0.5651	526.0	105.2
13	0.553	514.7	102.9
14	0.5489	510.9	102.2
15	0.5396	502.3	100.5
16	0.5628	523.9	104.8
17	0.5847	525.6	105.1
18	0.5564	517.9	103.6
19	0.5464	508.6	101.7
20	0.5548	516.4	103.3
PROMEDIO	0.55327	515	103
DER.	1.3359	1.3359	1.3359

Criterio: no menos del 85.0 por ciento y no más del 115 por ciento

$$DER \leq 6.0 \%$$

5.3. Resultados del estudio previo de bioequivalencia.

ANADEVA HECHA EN EL PROGRAMA BIOPAK

Variable dependiente : Cantidad Excretada Acumulada Total

Total de observaciones: 14

Observaciones Usadas: 14

EFECTO	° Libertad	F exp.	
SECUENCIA	1	35.1209	S
SUJETO(SECUENCIA)	5	6.0016	S
PERIODO	1	0.7599	NS
TRATAMIENTO	1	8.2030	S

S = Significativo NS = No Significativo

FORMULACIÓN	CANTIDAD EXCRETADA ACUMULADA TOTAL (mg)	(+/-) ERROR. ESTÁNDAR
COMERCIAL	350.18	23.7126
INNOVADOR	446.227	23.7126

INTERVALOS DE CONFIANZA

	CLÁSICO	WESTLAKE
C.L. 90%	(63.3286 , 93.6230)	(67.3608 , 132.6392)

5.4. Resultados del estudio de la influencia de los lípidos en la biodisponibilidad del AAS.

Los resultados promedio, obtenidos del estudio de biodisponibilidad con la administración del producto comercial en ayunas durante la primera semana y con una dieta lipídica durante la segunda semana, así como una comparación entre ambas se presentan en las siguientes tablas, (5.4.1. , 5.4.2. y 5.4.3.). (Los valores obtenidos para cada voluntario se presentan en las tablas de los apéndices 2 y 3).

Tabla No. 5.4.1.

Perfil promedio de cantidad excretada acumulada ($\mu\text{g/ml}$) vs. Tiempo en ayuno

Tiempo (hrs.)	Promedio de los voluntarios $\mu\text{g/ml}$	Desviación estándar (+/-)	Error estándar (+/-)
0	0	0	0
0-0.5	3.2179	4.1573	1.6972
0.5-1.0	10.4445	8.4567	3.4524
1.0-1.5	29.0391	10.7389	4.3841
1.5-2.0	49.9420	18.3903	7.5078
2.0-2.5	62.0660	21.0001	8.5732
2.5-3.0	74.3647	22.3647	9.3753
3.0-4.0	94.5222	28.6944	11.7144
4.0-6.0	127.4960	23.4832	9.5869
6.0-8.0	165.6677	53.5689	21.8694
8.0-12.0	228.9721	72.9110	29.7658
12.0-24.0	267.3383	77.4995	31.6390
24.0-30.0	272.9220	81.0642	33.0943

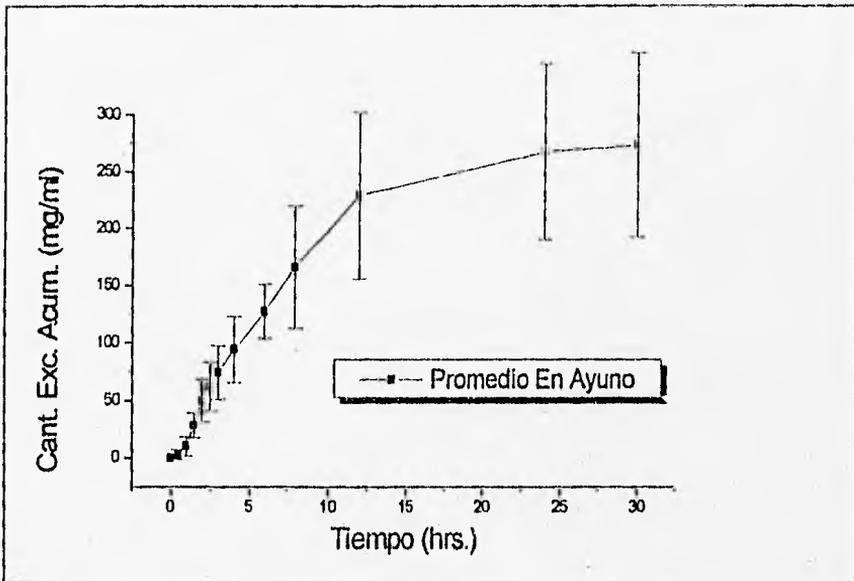


FIGURA No. 5.4.1

Perfil promedio del estudio de la influencia de los lípidos en la biodisponibilidad del AAS
 Datos urinarios en ayuno.

TABLA No. 5.4.2.
Perfil promedio del estudio de la influencia de los lípidos en la biodisponibilidad del AAS
Datos urinarios con dieta lipídica (mg/ml).

Tiempo (hrs.)	Promedio De los voluntarios $\mu\text{g/ml}$	Desviación estándar (+/-)	Error estándar (+/-)
0	0	0	0
0-0.5	1.1723	2.0151	0.8226
0.5-1.0	7.9313	6.4510	2.6336
1.0-1.5	15.6759	7.4833	3.0550
1.5-2.0	27.1573	19.6327	8.0150
2.0-2.5	44.3858	35.4312	14.4647
2.5-3.0	69.2600	46.0674	18.8069
3.0-4.0	100.6951	78.9811	32.2439
4.0-6.0	167.6339	88.8462	36.2713
6.0-8.0	249.7312	134.9508	55.0934
8.0-12.0	287.5425	123.1634	50.2812
12.0-24.0	344.0289	77.2024	31.5177
24.0-30.0	354.0885	77.9200	31.8107

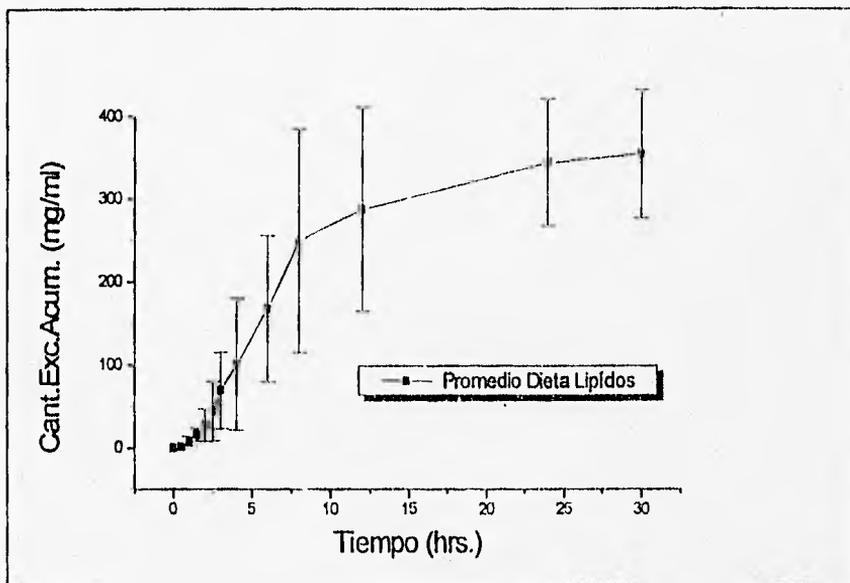


FIGURA No. 5.4.2
Perfil promedio del estudio de la influencia de los lípidos en la biodisponibilidad del AAS. Datos
urinarios con dieta lipídica.

Tabla no. 5.4.3.

Comparación de la Cantidad Excretada Acumulada promedio (mg/ml) (+/-) d.s. vs. Tiempo en las dos semanas de estudio en cada uno de los intervalos

Tiempo (hrs.)	Promedio en ayuno	Desviación estándar en ayuno	Promedio con dieta lipídica	Desviación estándar con lípidos
0	0	0	0	0
0-0.5	3.2179	4.1573	1.1723	2.0151
0.5-1	10.4445	8.4567	7.9313	6.4510
1-1.5	29.0391	10.7389	15.6759	7.4833
1.5-2	49.9420	18.3903	27.1573	19.6327
2-2.5	62.0660	21.0001	44.3858	35.4312
2.5-3	74.3647	22.9647	69.2600	46.0674
3-4	94.5222	28.6944	100.6951	78.9811
4-6	127.4960	23.4832	167.6339	88.8462
6-8	165.6677	53.5689	249.7312	134.9508
8-12	228.9721	72.9110	287.5425	123.1634
12-24	267.3383	77.4995	344.0289	77.2024
24-30	272.9220	81.0642	354.0885	77.9200

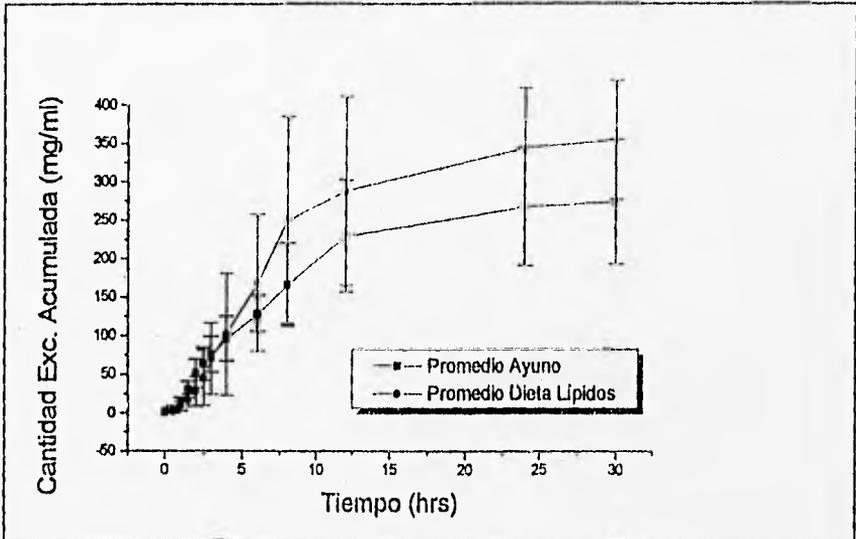


FIGURA No. 5.3.3.

Perfil comparativo de la influencia de los lípidos en la biodisponibilidad del AAS Datos urinarios.

CAPITULO VI

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1. Pruebas de validación del sistema y del método analítico.

Es indispensable que antes de realizar este tipo de estudios, se efectúen pruebas de validación de la metodología analítica a seguir para asegurar la confiabilidad de los resultados la calidad de los resultados que se derivan del análisis de muestras. Es por ello que se verificó para cada metabolito, que tanto el sistema como el método analítico, tuvieran la linealidad requerida dentro del intervalo de 10-300 $\mu\text{g/ml}$.

6.1.1. Linealidad del sistema.

En el punto 5.1.1. se presentan las tablas de concentración y relación de alturas para los dos metabolitos cuantificados en el estudio, ácido salicílico y ácido salicílico. Se puede destacar que para el ácido salicílico el C.V.% mayor es para la concentración más pequeña con un valor de 6.9 % y su C.V.% promedio en el resto de las concentraciones es menor del 6.0%. Para el ácido salicílico el C.V.% mayor fue para la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ con 6.3 %, y en las demás concentraciones se encontró un C.V.% menor de 5.8 %. Se presentan también los datos de los parámetros de regresión lineal en los cuales se puede observar que la linealidad del sistema es adecuada en el intervalo de 10-300 $\mu\text{g/ml}$. A su vez se realizó una prueba estadística de "t" a las pendientes y a las ordenadas obtenidas de las curvas de linealidad del sistema, con un nivel de significancia de 0.05, con el objeto de determinar, que no eran significativamente diferentes. Con ello se demuestra que el intervalo elegido para la cuantificación de muestras, es lineal y cae dentro de los parámetros de validación del sistema y del método.

6.1.2. Linealidad del método.

En el punto 5.1.2. se presentan las tablas de concentración y relación de alturas para los dos metabolitos cuantificados en el estudio, ácido salicílico y ácido salicílico. Se puede observar que para el ácido salicílico el C.V.% mayor es para la concentración más pequeña con un valor de 8.4 % y su C.V.% promedio en el resto de las concentraciones es menor del 5.0 %. Para el ácido salicílico el C.V.% oscila entre 8.4 y 15.2 % y se puede observar una disparidad mayor entre los valores de C.V.% que en los encontrados en el ácido salicílico. Se presentan también los datos de los parámetros de regresión lineal, en los cuales se puede observar que la linealidad del sistema y del método es adecuada en el intervalo de 10 a 300 $\mu\text{g/ml}$. A su vez se realizó una prueba estadística de "t" con las pendientes y las ordenadas obtenidas de las curvas de linealidad del método con un nivel de significancia de 0.05 con el objeto de determinar, que los valores obtenidos no son significativamente diferentes. Con ello se demuestra que el intervalo elegido para la cuantificación de los metabolitos en muestras, es lineal y cae dentro de los parámetros de validación del sistema y del método.

6.2. Pruebas de control de calidad de los productos farmacéuticos.

Las pruebas físicas como dureza y friabilidad, fueron aprobatorias para cada uno de los productos. La prueba de valoración, sí cumple la norma. Respecto a la prueba de disolución, no satisface la norma en la primera etapa, pero debido a la falta de muestra proveniente del mismo lote, no se realizaron las siguientes etapas para saber si la prueba de disolución es aprobatoria, por lo que no se puede afirmar categóricamente que la prueba de disolución no fue acreditada.

Esto se plantea porque la Farmacopea Nacional (F.E.U.M.) marca que a los 30 minutos se debe encontrar en cada una de las tabletas, una disolución correspondiente a 85 % (Q + 5%).

Y como se puede observar en el punto 5.2.4, el producto no cumple con este requerimiento y procede continuar la prueba realizando la siguiente etapa.

Con respecto a la prueba de uniformidad de dosis, debe señalarse que se tomó el método de variación de peso, en base al criterio de que los productos contienen más de 50 mg del principio activo y éste representa más del 50 % del peso total de la tableta; los parámetros establecidos marcan que el

contenido individual debe de estar entre el 85.0-115.0 % con un C.V. % \leq 6.0 %, los resultados obtenidos demuestran que ambos productos cumplen con los requerimientos.

En el estudio previo de bioequivalencia, realizado a los productos para, asegurar este control de acuerdo a las especificaciones del CFR que se efectuó en el laboratorio de Biofarmacia y en el que se analizaron las muestras con la misma metodología analítica que se practicó para las muestras en este estudio, se observó que al comparar un producto innovador con un contenido de 325 mg de AAS con el producto comercial en estudio, con un contenido de 500 mg de AAS, se obtuvieron los resultados presentados en el punto 5.3.

Se observa que la única diferencia estadísticamente no significativa, se encuentra en el efecto del período, sin embargo en los demás resultados, se observan diferencias estadísticamente significativas en los demás efectos. Se puede ver también que los resultados de los intervalos de confianza clásico y Westlake, que es el más recomendado, arrojan datos que indican una bioinequivalencia de los productos, ya que los valores deben de encontrarse entre 80-120 %. Sin embargo NO se puede afirmar de una manera categórica, que los productos sean realmente bioinequivalentes y esto se debe a que no se cuenta con las bases estadísticamente confiables como para hacer tal aseveración, ya que los resultados estadísticos experimentales de los efectos deben ser no significativos, cuestión que no se logró en el estudio previo.

Los resultados obtenidos nos indican que el número óptimo de voluntarios no es el adecuado y que es conveniente replantear el diseño del estudio para evitar estas diferencias estadísticamente significativas y tener resultados estadísticamente confiables.

No obstante que solo se encontró valor estadísticamente no significativo en el efecto de período se considero conveniente realizar el estudio con influencia de los lípidos en la dieta con el diseño planteado anteriormente, pues puede servir como referencia para un estudio posterior con resultados estadísticamente confiables.

6.3. Estudio de la influencia de los lípidos en la biodisponibilidad del AAS.

El estudio de biodisponibilidad con influencia de la dieta se realizó en 6 voluntarios y el diseño que se siguió fue el planteado en la parte experimental. Se obtuvieron los resultados presentados en el punto 5.4. en los cuales se observa que existe una mayor absorción de AAS con una dieta lipídica. En la primera semana del estudio se muestra la tabla 5.4.1. como el promedio de la cantidad excretada acumulada en ayuno y su gráfica respectiva contra el tiempo (5.4.1.). Los resultados obtenidos muestran que el valor máximo de cantidad excretada acumulada promedio es de 272.9 mg.

También se observan los resultados obtenidos en la segunda semana con la dieta lipídica en la tabla No. 5.4.2. y su gráfica respectiva en la figura No.5.4.2. En los resultados obtenidos en esta semana se observa cómo el valor máximo de cantidad excretada acumulada es de 354.1 mg.

Se presenta a su vez la tabla comparativa con los resultados de las dos semanas en la tabla No. 5.4.3. y la gráfica respectiva en la figura 5.4.3.

Comparando los resultados obtenidos entre el ayuno y la dieta lipídica, se puede observar en la gráfica comparativa (figura No. 5.4.3.), que la cantidad excretada acumulada promedio es mayor cuando el producto es ingerido con una dieta lipídica, ésto nos indica que la absorción del AAS se ve favorecida por los lípidos. Al realizar el tratamiento por ANADEVA, se encontró que la base estadística con la que se cuenta en este estudio no es lo suficientemente fuerte como para afirmar que la biodisponibilidad se ve favorecida por los lípidos, sin embargo sí se puede decir que los lípidos favorecen la absorción del AAS.

Si recordamos que un fármaco se ve favorecido en su absorción al encontrarse en su forma no ionizada, y que ésto depende de cómo se encuentre su estructura en un determinado pH, es posible explicar que el AAS se ve favorecido en su absorción debido a que los lípidos retardan el vaciamiento gástrico, con lo cual el AAS permanecerá en un mayor tiempo en el estómago; al suceder ésto, se favorece la absorción tanto en el estómago como en el intestino, dado que la molécula de AAS se encuentra en su forma no ionizada por más tiempo en el estómago, y a su vez, el paso por el intestino

será más lento lo cual aumenta el tiempo de permanencia y de contacto en el intestino, favoreciendo también su absorción, además de que es liposoluble.

Debido a que existen diferencias estadísticamente significativas en los efectos, (a excepción del efecto período), este estudio solo se presenta como un estudio previo de biodisponibilidad, ya que no es posible afirmar categóricamente que la biodisponibilidad aumenta, dado que no se tiene la base estadística para corroborar esta afirmación. Con los datos obtenidos en este estudio es factible hacer el cálculo del número mínimo de voluntarios para poder obtener resultados estadísticos confiables en base a la siguiente fórmula y con los datos del propio estudio.

$$n = \frac{2 (1.65 + t_{(1-\beta/2)})^2 \sigma^2 (1 - \rho)}{\delta^2}$$

Parámetros a seguir para el cálculo de voluntarios:

- Nivel de protección al consumidor = 95 % = 1.65
- Nivel de protección al fabricante = 80% $t_{(1-\beta/2)} = 1.28$
- Rango de bioequivalencia aceptado para ABC para la formulación de referencia $\delta = 0.22$

Desviación estándar entre observaciones de diferentes sujetos, σ relativa al ABC promedio. La cuál fue de 0.295 para el estudio realizado.

Sustituyendo los valores en la ecuación citada se obtiene que el número natural no fraccionario de voluntarios es de 16 con una desviación de 0.295 obtenida de los valores del propio estudio. Los valores mencionados se obtuvieron del curso sobre estudios de bioequivalencia en la industria farmacéutica, impartido por Syntex el 14 y 15 de abril de 1994.

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

- Tanto el producto comercial como el innovador que contienen AAS cumplieron con las normas oficiales farmacopéicas de control de calidad, a excepción de la disolución, la cual no pudo continuarse por falta de muestra.
- El intervalo utilizado de 10-300 $\mu\text{g/ml}$ para el análisis de las muestras es lineal y cae dentro de los parámetros de validación del sistema y del método presentados en la tesis (punto 5.1.)
- No se logró comprobar la bioequivalencia o bioinequivalencia de los productos farmacéuticos utilizados, dado que los resultados estadísticos no fueron lo suficientemente confiable como para afirmar alguna de las dos aseveraciones.
- Se observa que existe una mayor absorción de AAS con la ingestión de lípidos en la dieta, sin embargo no se puede afirmar categóricamente que la biodisponibilidad aumente, debido a que el número de voluntarios fue insuficiente estadísticamente.
- El número mínimo de voluntarios totales para que el estudio de biodisponibilidad (con la influencia de los lípidos en la dieta), sea estadísticamente confiable en un diseño cruzado es de 16 con $s=0.295$

CAPITULO VIII

BIBLIOGRAFÍA

1. - Celdric. M, Smith M, Farmacología, Panamericana, Buenos Aires, 1993, p. 411.
2. - Bowman. W, Farmacología, 2a. Ed. Interamericana, México, 1984, p. 16.16.
3. - Bevan. J, Fundamentos de farmacología, 2a. Ed. Harla, México, 1982, p. 294.
4. - Levy G. And Hayes B.; *New England J. Med.*; 262-1053 (1960)
5. - Levy G. And Hayes B.; *J. Pharmaceutical Sci.*; 50-388 81961)
6. - Goodman y Gilman, *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 8a. Ed. Medica Panamericana, México, 1993, pp. 626-627, 630, 634-636.
7. - Shen. J, Novel direct high performance liquid chromatographic method for determination of salicylate glucuronide conjugates in human urine, *J. Chrom.* (1991), No. 565, pp. 309-320.
8. - O'Kruk. J, Rapid and sensitive determination of acetylsalicylic acid and its metabolites using reverse phase high performance liquid chromatography, *J. Chrom.* (1984), No. 310, pp. 343-352.
9. - Rumble. R, Determination of Aspirin and its major metabolites in plasma by high performance liquid chromatography without solvent extraction, *J. Chrom.* (1981), No. 225, pp. 252-260.
- 10.- Harrison. L, Funk. M, High pressure liquid chromatographic determination of salicylsalicylic acid, Aspirin, and salicylic acid in human plasma and urine, *J. Chrom.* (1980), Vol. 69, No. 11, pp. 1268-1270
- 11.- Glazko A., Kinkel A. And Holmes e., *Clin Pharmacol. Ther.* 9-472 (1968)
- 12.- Carminetsky S.; *Can. Med. Assoc. J.*; 90-978 (1964)
- 13.- Meyers. F, Jawetz. E, *Review of medical pharmacology*, Lange Medical Publications, Los Altos California, 1980, p. 281.
- 14.- Manson. W, Kinetics of Aspirin, salicylic acid, and salicylic acid following oral administration of Aspirin as a tablet and two buffered solutions, *J. Pharm. Sci.* (1981), vol. 70, No. 3, pp. 262-265.
- 15.- AHFS Drug information 90, American Society of hospital Pharmacists 843-847 U.S.A. 1990.
- 16.- Koch. P, Influence of food and fluid ingestion on Aspirin bioavailability, *J. Pharm. Sci.* (1978), Vol. 67, No. 11, pp.1533-1535.
- 17.- Litter. M, *Compendio de Farmacología*, 4a. Ed. El Ateneo, Argentina, 1988, p. 619.

- 18.- Lippincott's, illustrated Reviews Pharmacology, Harwey, Philadelphia, New York, 1992, pp. 362-364, 367- 368.
- 19.- Westlake W.J.; *Biometrics* 35; 273-280 (1979)
- 20.- Westlake W. J.; Bioavailability and Bioequivalence of Pharmaceutical Formulations In K.E. Pace (de), *Pharmaceutical Static for Drug Development*, Marcel Dekker, NY (1988).
- 21.- Westlake W. J.; *J. Pharm. Sci.* 62; 1579-1589.
- 22.- *The Merck Index encyclopedia of chemical drugs and biological*, Published by Merck Co. Inc. Eleventh edition, Rahway U.S.A., 1989, pp 930, 1324.
- 23.- Mays, D, Sharp, C, Improved method for the determination of Aspirin and its metabolites in biological fluids by high performance liquid chromatography applications to human and animal studies, *J. Chrom.* (1984), Vol. 311, pp. 301-309.
- 24.- Clarke's, *Isolation and identification of drugs*, 2a. Ed. The Pharmaceutical Press London, 1986, p. 96.
- 25.- Exfeld, H, Nelson, J, Salicylate determined with a microcentrifugal analyzer and compared with Du Pont, Trinder and liquid chromatographics method, *Clin. Chem.* (1983), Vol. 29, No. 5, pp. 839-841.
- 26.- Geoffrey, W, Simple and rapid high Pressure liquid chromatographic simultaneous determination of Aspirin, salicylic acid, and salicylic acid in plasma, *J. Pharm. Scie.* (1978), vol. 67, No. 5, pp. 710-712.
- 27.- Morris, H, Christian, E, Gas-liquid chromatography of salicylate metabolites, *J. Pharm. Sci.* (1970), Vol. 59, No. 2, pp. 270-271.
- 28.- Seeger, A, Interations of Aspirin with Acetaminophen and Caffeine in rat stomach. pharmacokinetics of absorption on accumulation in gastric mucosa, *J. Pharm. Sci.* (1980), Vol. 69, No. 8, pp. 832-836.
- 29.- Buskin, N, Robert, A, Improved liquid chromatography of Aspirin, salicylate and salicylic acid in plasma with a modification for determining Aspirin metabolites in urine, *Clin. Chem.* (1982), pp. 1200-1203.
- 30.- Winthrop, E, Fluorometric determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in blood, *J. Pharm. Sci.* (1966), Vol. 55, No. 4, pp. 380-389.
- 31.- Kanter, L, Williams, R; Direct measurements of Aspirin, *J. Pharm. Sci.* (1971), Vol. 60, No. 12, pp. 1898-1900.

- 32.- Chamberlain, J, *Analysis of drugs in biological fluids*, Ed. library of congress cataloging in publication data, EEUU, 1987.
- 33.- F.E.U.M. 6a edición, México 1996.
- 34.- Tesis: "desarrollo y Validación de un método analítico para determinar metabolitos de AAS, ácido salicílico y ácido salicílico en orina, por CLAR"; Canseco Ruiz Guadalupe; F.E.S. Cuautitlan, Edo. Mex. 1996.

APÉNDICE I
HOJA DE CONSENTIMIENTO
PARA EL ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA DIETA EN LA
BIODISPONIBILIDAD DEL AAS

NOMBRE: _____ EDAD: _____

DIRECCIÓN: _____

ESTATURA: _____ SEXO: _____

TELÉFONO: _____ PESO: _____

En forma voluntaria y en pleno uso de mis facultades mentales, hago constar que he sido informado sobre los riesgos en que puedo incurrir al participar en este estudio de biodisponibilidad con influencia de una dieta lipídica, para un producto comercial de ácido acetil salicílico.

Declaro que me han informado que mi participación en el estudio es totalmente voluntaria y que estoy en libertad de retirarme en cualquier momento si juzgo que mi dignidad o mi integridad personal está siendo transgredida.

ACEPTO PARTICIPAR

FECHA: _____

NOMBRE Y FIRMA

APENDICE 2
CANTIDAD EXCRETADA ACUMULADA POR VOLUNTARIO DURANTE LA SEMANA EN AYUNO
DATOS URINARIOS

Intervalo de Tiempo	Voluntario I	Voluntario 2	Voluntario 3	Voluntario 4	Voluntario 5	Voluntario 6	Promedio Voluntarios	Desviación Estándar
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0-0.5	3.3532	0	0	0	5.7373	10.2169	3.2179	4.1573
0.5-1	14.5032	0	3.9151	5.3394	20.1481	18.7614	10.4445	8.4568
1-1.5	30.9090	31.6667	28.8373	9.3710	42.2567	31.1940	29.0391	10.7390
1.5-2	48.0761	76.4418	49.9477	21.4759	61.0114	42.6992	49.9420	18.3904
2-2.5	66.3276	81.2853	75.1313	29.7684	77.1847	42.6992	62.0661	21.0001
2.5-3	88.7920	81.2853	92.9736	41.9634	92.4523	48.7218	74.3647	22.9647
3-4	114.3824	90.3693	111.1444	59.5538	129.0277	62.6557	94.5222	28.6948
4-6	137.4078	120.8861	129.9770	92.6545	164.0830	119.9678	127.4960	23.4832
6-8	145.3934	141.0828	150.7629	96.5673	226.0646	234.1357	165.6678	53.5690
8-12	179.2934	161.3586	199.2291	191.1262	313.2567	329.5689	228.9722	72.9111
12-24	188.2402	275.4182	232.1653	191.1260	362.2867	354.7939	267.3384	77.4996
24-30	184.2402	280.6375	244.1638	194.0528	374.3552	360.0828	272.9220	81.0642

DATOS PRESENTADOS EN mg

APENDICE 3
CANTIDAD EXCRETADA ACUMULADA POR VOLUNTARIO DURANTE LA SEMANA CON DIETA LIPIDICA
DATOS URINARIOS

Intervalo de Tiempo	Voluntario 1	Voluntario 2	Voluntario 3	Voluntario 4	Voluntario 5	Voluntario 61	Promedio de Voluntarios	Desviación Estándar
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0-0.5	0	0	0	4.8975	2.1365	0	1.1723	2.01514
0.5-1	8.0644	3.8115	0.3405	6.3910	9.7438	19.2367	7.9313	6.45105
1-1.5	15.4236	25.5847	2.7914	16.7358	14.2834	19.2367	15.6759	7.48332
1.5-2	30.5734	62.5730	6.5166	29.7612	14.2834	19.2367	27.1573	19.63279
2-2.5	69.1303	103.3417	14.7687	41.3324	18.5053	19.2367	44.3858	35.43123
2.5-3	110.1302	131.7345	19.9484	64.1160	18.5053	71.1261	69.2600	46.06746
3-4	162.9693	228.3318	48.6275	74.6107	18.5053	71.1261	100.6951	78.98117
4-6	210.3876	309.5961	115.6736	129.6614	53.7087	186.7762	167.6340	88.84628
6-8	254.2136	365.6786	178.2803	176.2181	79.2632	444.7340	249.7313	134.95087
8-12	288.9270	401.4072	275.3158	203.0694	111.8018	444.7340	287.5425	123.16348
12-24	288.9270	401.4072	363.8274	238.0090	321.5149	450.4880	344.0289	77.20247
24-30	288.9270	407.2514	372.7818	238.0090	367.0740	450.4880	354.0885	77.92008

Datos Presentados en mg

APENDICE 4

PERFIL DE DISOLUCIÓN DEL PRODUCTO INNOVADOR TABLETAS DE AAS DE 325 mg

Tiempo	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Vaso 6	Promedio	D.S
5	0	49.1688	41.7340	63.5397	0	0	51.4808	11.0852
10	36.7971	58.1116	71.0895	71.2697	61.0406	40.4922	56.4668	14.8233
20	47.9069	74.6915	84.1126	81.2012	71.3322	54.5807	68.9708	14.6145
30	80.2629	80.4855	83.8244	81.8210	84.9373	75.5885	81.1533	3.2895
45	66.0562	85.3033	76.4540	83.3122	79.1088	79.1088	78.2239	6.7640
60	79.0622	86.0981	82.5802	85.8782	79.5020	81.4808	82.4336	3.0392
90	81.5827	85.7431	83.3345	84.2103	77.2034	77.2034	81.5462	3.6230

% Disuelto con el tiempo

PERFIL DE DISOLUCIÓN DEL PRODUCTO COMERCIAL TABLETAS DE AAS DE 500 mg

Tiempo	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Vaso 6	Promedio	D.S
5	10.6254	0	14.2499	18.1396	23.6500	25.9779	15.4405	9.4734
10	28.6925	38.5341	36.4837	44.8022	35.2243	37.3332	36.8450	5.2083
15	47.6761	48.9960	58.8947	50.8884	66.7554	66.7554	56.6610	8.7360
20	68.0862	57.0920	69.2437	59.2604	58.2477	73.0055	64.1556	6.7593
30	77.7362	78.8866	77.5924	81.3312	81.1874	84.6386	80.2287	2.7035
45	86.4050	82.4033	87.9770	88.1199	86.6908	85.8333	86.2382	2.0817
60	87.3296	85.1947	86.4756	88.1835	88.0412	85.4793	86.7840	1.2775
90	88.9088	88.9088	85.5141	85.9385	87.3529	87.7772	87.4001	1.4415

% Disuelto con el tiempo