

615.7
S 2376
1976
F. ce. QQ.

62.1

087475

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

***BIODISPONIBILIDAD DEL
ESTOLATO DE ERITROMICINA***

TESIS

PRESENTADA POR

RHINA IDALIA SANTOS QUIROS

PARA OPTAR AL TITULO DE

Licenciada en Quimica y Farmacia

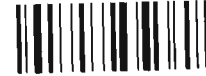
JULIO 1976



SAN SALVADOR,

EL SALVADOR,

CENTRO AMERICA.



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR DR. CARLOS ALFARO CASTILLO

SECRETARIO DR. MANUEL ATILIO HASBUN

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO DR. AMILCAR AVENDAÑO Y ORTIZ

SECRETARIO DRA. MARIA GLADIS DE NENA GUERRERO

J U R A D O D E T E S I S

DRA. ELIZABETH BANE GAS DE SALAZAR

DRA. KELLY ZALDAÑA DE LOPEZ

DR. MAURICIO ALVAREZ

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO
DE DESARROLLO FARMACEUTICO SE LOS LABORATO
RIOS SINTEX S.A, EN LA CIUDAD DE MEXICO, -
BAJO LA DIRECCIÓN DEL ING. ALFREDO GARZON -
SERRA, A QUIEN EXPRESO MI MAS SINCERO AGRA
DECIMIENTO.

A MIS PADRES CON TODO CARIÑO
Y AGRADECIMIENTO.

A G R A D E C I M I E N T O

- AL LABORATORIO SYNTEX S.A.
- AL DR. JORGE MEDINA ACEVEDO, POR SU GRAN AYUDA QUE HIZO POSIBLE LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.
- A LAS LICENCIADAS CARMEN RUTH GUTIERREZ DE RODRIGUEZ Y MARICARMEN MARTINEZ DE VENEGAS POR SU VALIOSA COLABORACIÓN,
- A TODAS LAS PERSONAS QUE SE INTERESARON POR MI TRABAJO Y QUE DE UNA U OTRA FORMA CONTRIBUYERON A QUE SE LLEVARA A CABO.

I N D I C E

Página

I.- INTRODUCCION

Objetivo 1 - 2
Generalidades 3- 16

II.- PARTE EXPERIMENTAL

A) Equipo y Material usado 18
B) Métodos in Vitro 19- 36
C) Métodos in Vivo 37- 40

III.- RESULTADOS. 41- 57

IV.- DISCUSION 58- 60

V.- CONCLUSIONES 61- 62

VI.- BIBLIOGRAFIA 63- 64

O B J E T I V O

Es conocido dentro de la Industria Farmacéutica la importancia que -- tiene el desarrollo de nuevos medicamentos que proporcionen niveles -- sanguíneos adecuados del fármaco para obtener el efecto terapéutico -- deseado. Por eso es necesario que todo fármaco cumpla con las especi-- ficaciones que los libros oficiales señalan y que la forma farmacéuti-- ca final sea desarrollada de tal manera que satisfaga los estudios de estabilidad y biodisponibilidad para asegurar que el medicamento cum-- pla su misión para lo cual ha sido elaborado.

en el presente trabajo se estudió la disposición biológica del estola-- to de eritromicina, en cápsulas, de cinco diferentes formulaciones -- que se encuentran en el mercado de México y El Salvador. Se llevó a -- cabo un estudio comparativo de los niveles sanguíneos del antibiótico y la excreción urinaria en las diferentes muestras con el propósito -- de hacer una comparación "in vivo" de la efectividad de las formulacio-- nes.

El estolato de eritromicina de las muestras en estudio se cuantificó -- en forma de eritromicina base por medio del método microbiológico de -- Difusión en placa; desarrollando primero un método de análisis "in vi-- tro" tanto en sangre como en orina que fuera preciso, exacto y reprodu-- cible para que pudiera ser aplicado posteriormente a las muestras "in -- vivo".

El estudio fue efectuado en tres sujetos en una forma alternada de ma-- nera que en cada uno de ellos fuera estudiada la disposición biológica

de las formulaciones y así tener resultados más representativos de -- los niveles sanguíneos alcanzados.

La información obtenida de los niveles sanguíneos alcanzados por el fármaco en la sangre se complementa por estimación de la cantidad de principio activo excretado, el cual se obtiene analizando la orina colectada durante el estudio.

En estudios clínicos se ha reportado que una fórmula específica de un antibiótico fue efectiva en el tratamiento de ciertas infecciones, después de tomar una determinada dosis, asumiéndose que la eficacia observada está relacionada con diferentes parámetros tales como: la máxima concentración en sangre obtenida con una dosis de antibiótico, la velocidad de absorción del fármaco y la cantidad total del antibiótico absorbido (1)

Si los niveles en sangre de las formulaciones en estudio no difieren significativamente es razonable concluir que estas son bio-equivalentes, sin embargo si las concentraciones en sangre vs. tiempo difieren significativamente no pueden asumirse una bio-equivalencia(1)

(1) Di Santo, A.R. and Chodos, D.J.
Basics of Bioavailability
The Upjohn Company
Kalamazoo, Michigan (1973)

GENERALIDADES DE BIODISPONIBILIDAD

El estudio de la efectividad biológica de un medicamento en relación con las propiedades físico-químicas del principio activo está a cargo de una rama de las ciencias farmacéuticas que se denomina "Biofarmacia" y que puede ser definida de la siguiente manera:

"Es la rama de las ciencias farmacéuticas que se encarga del estudio de las relaciones entre las propiedades físico-químicas de un fármaco en una forma de dosificación y la respuesta observada después de la administración".(2)

Para que la Biofarmacia pueda llevar a cabo sus propósitos se auxilia de la Farmacocinética que Wagner define de la siguiente manera:

"La Farmacocinética se relaciona principalmente con la cinética de absorción, distribución, metabolismo y excreción de medicamentos, ve nenos y algunas sustancias endógenas"(3).

El propósito de la Farmacocinética es estudiar el tiempo y concentraciones del fármaco y sus metabolitos en diferentes tejidos y excreciones y el construir modelos adecuados para interpretar estos datos. De aquí se introdujo el término Biodisponibilidad concepto que ha llegado a ser cada vez mas importante para los físicos, químicos, farmacólogos, médicos y farmacéuticos.

(2) Lachman, L. Lieberman H.A. and Kanig, U.L.

The Theory and Practice of Industrial Pharmacy
Lea and Febiger. Philadelphia.(1970)

(3) Wagner, J.G.- Biopharmaceutics and Relevant Pharmacokinetics. First Edition. The Hamilton Press. Hamilton, Illinois (1971)

Ya que el concepto es relativamente nuevo la definición de Biodisponibilidad no ha aparecido en diccionarios o textos médicos, sin embargo algunas definiciones han sido propuestas por varias autoridades:

"Biodisponibilidad es un término que se usa para indicar tanto la cantidad relativa del fármaco administrado que alcanza la circulación - como la velocidad a lo que esto ocurre".(4)

"Es la medida de la velocidad de absorción de un fármaco y el grado al cual este es absorbido"(5)

"Es la cantidad relativa de un fármaco que alcanza la circulación cuando se administra en una forma farmacéutica de prueba en comparación -- con la cantidad del fármaco que alcanza la circulación cuando se administra en una forma farmacéutica patrón"..

Cuando en un estudio de biodisponibilidad se comparan dos ó más formulaciones diferentes conteniendo un mismo principio activo, uno de los cuales es aceptado como estándar, el estudio se llama Bioequivalen--
cia.

La Biodisponibilidad es un concepto que está basado en la medida de paramétros específicos, usualmente concentraciones del principio activo en sangre y orina después de la administración de un fármaco que pueden ser relacionados con la eficacia clínica, como la evaluación del medicamento.

(4) Am.Pharm.Ass.Academy of Pharmaceutical Sciences Guidelines for Bio-pharmaceutical Studies in Man, Washington, D.C. Feb.(1972)

(5) The Bioavailability of Drug Products. American Pharmaceutical Association, (1975)

mento en la terapia de una enfermedad específica.(1)

La determinación de la concentración de un principio activo en sangre, plasma o suero es la mejor forma disponible de conocer los niveles alcanzados por el fármaco en el cuerpo y especialmente en el sitio de acción ya que la mayoría de los fármacos se distribuyen en los tejidos por medio de procesos físico-químicos reversibles y es razonable suponer que las concentraciones a nivel celular estén directamente relacionadas con las concentraciones en sangre, plasma o suero.

Si después de la administración de un medicamento se toma una serie de muestra de sangre y se analizan para conocer el contenido de principio activo y estos datos se grafican, se obtiene una curva de niveles de principio activo en sangre llamada curva de concentración en sangre vs. tiempo. El eje vertical característicamente representa la concentración del principio activo en sangre, suero o plasma y el eje horizontal el tiempo después de la administración del medicamento.

Tomando por ejemplo el caso de una tableta; en el momento de la administración del medicamento la concentración del principio activo en sangre es cero, el fármaco pasa al estómago o intestino en donde la forma dosificada se desintegra, y el fármaco se disuelve y es absorbido hacia la circulación. En este momento se encuentran concentraciones cada vez mayores del principio activo hasta que se obtiene una concentración máxima en sangre.

Este punto de concentración máxima es llamado el pico de una curva de concentración vs, tiempo.

Debe reconocerse que la eliminación de un principio activo realmente comienza tan pronto como este aparece en el torrente sanguíneo y conti

núa hasta que el fármaco ha sido completamente eliminado. La eliminación del fármaco resulta de la excreción urinaria y del metabolismo del mismo por el hígado y otros órganos.

La distribución del fármaco por los tejidos y fluídos extra celulares así como la absorción y eliminación afecta la forma de la curva de -- concentración en sangre vs. tiempo.

Esta curva puede ser examinada matemáticamente y derivarse un número - de parámetros farmacocinéticos tales como: tiempo de vida media, velocidad de absorción, velocidad de excreción, modelos de distribución -- etc.

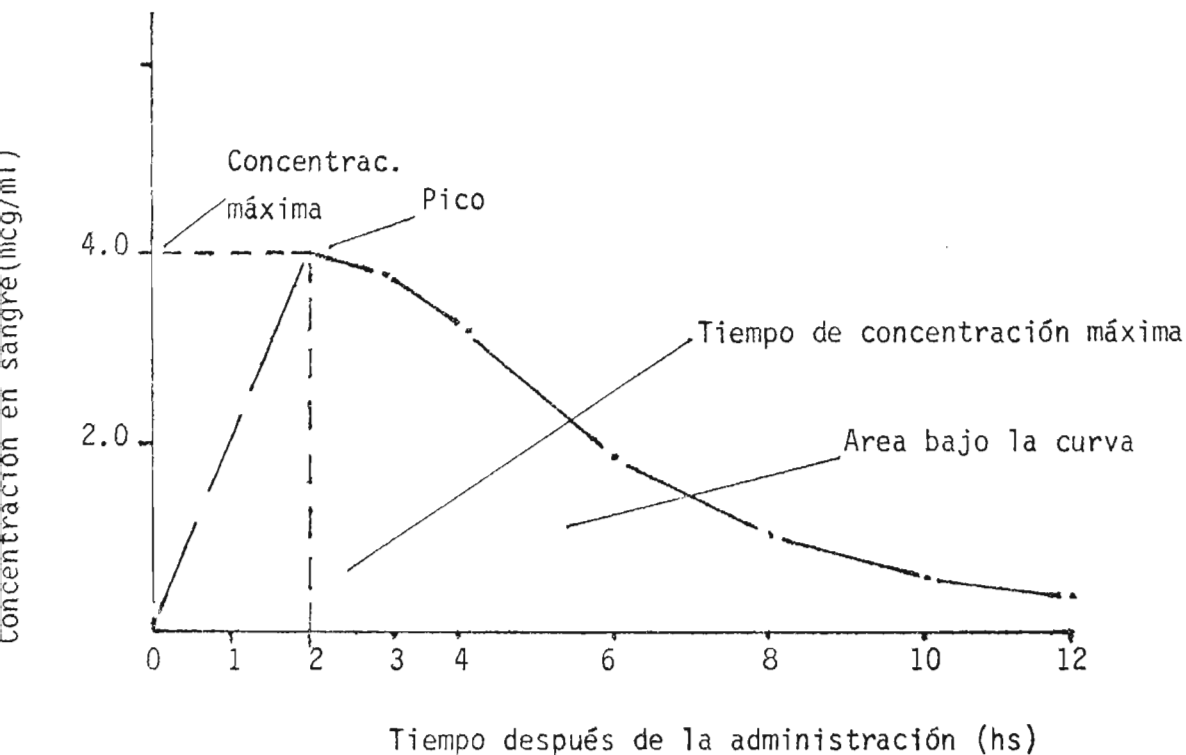
Tres parámetros se han considerado importantes para los estudios de bioequivalencia entre diferentes formulaciones, estos parámetros son:

- a.- La concentración máxima del fármaco en sangre
- b.- El tiempo al cual se alcanza la concentración máxima
- c.- El área bajo la curva concentración en sangre vs. tiempo (1)

En la figura 1 se puede observar cada uno de estos parámetros.

(1) DiSanto. A.R. and Chodos, D.J. Basics of Bioavailability
The Upjohn Company. Kalamazoo, Michigan (1973)

F I G U R A 1



a) CONCENTRACION MAXIMA DEL FARMACO EN SANGRE.-

El pico m3s alto de la curva representa la m3s alta concentraci3n obtenida en sangre despu3s de la administraci3n oral de un medicamento. Este par3metro es importante para determinar la concentraci3n m3nima efectiva (CME) y la concentraci3n t3xica (CT) en un estudio de dos o m3s formulaciones.

Los valores de CME y CT no han sido determinados para la mayor3a de los medicamentos y variar3a considerablemente de un individuo a otro. Probablemente cada individuo tiene una CME y una CT espec3fica por lo que debe considerar este concepto para la importancia de la biodisponibilidad(1)

(1) DiSanto, A.R. and Chodos, D.J. Basics of Bioavailability. The Upjohn Company. Kalamazoo, Michigan (1973)

b) TIEMPO DE CONCENTRACION MAXIMA.-

El segundo parámetro en importancia es la medida del tiempo necesario para obtener la concentración máxima después de la administración de un medicamento. Este tiempo es llamado "tiempo de concentración máxima en sangre".

Este parámetro está cercamente relacionado con la velocidad de absorción del principio activo de una formulación y es utilizado como una medida de este parámetro.(1)

c) AREA BAJO LA CURVA DE CONCENTRACION EN SANGRE CONTRA TIEMPO.

El tercer y quizá el más importante parámetro para la evaluación de la biodisponibilidad es el área bajo la curva, esta área se mide matemáticamente usualmente empleando la técnica conocida como regla trapezoidal.

Esta medida puede considerarse representativa de la cantidad de principio activo absorbido después de la administración de una dosis única de un medicamento(1)

(1) DiSanto, A.R. and Chodos, D.J. Basics of Bioavailability

The Upjohn Company

Kalamazoo, Michigan (1973)

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA VELOCIDAD DE ABSORCIÓN DEL FÁRMACO EN LA DISTRIBUCIÓN POR LOS TEJIDOS Y FLUIDOS DEL CUERPO, EN LA EXCRECIÓN Y EN OTROS PARÁMETROS FARMACÉUTICOS.

- a.- Estado físico de la sustancia pura tales como: el tamaño de partícula, superficie de la partícula, forma de cristal.
- b.- Estado químico de la sustancia pura tales como: base, ácido, sal, éster.
- c.- Influencia de sustancias inertes: excipientes, vehículos
- d.- Influencia de otros medicamentos administrados al mismo tiempo.
- e.- Forma farmacéutica empleada: soluciones, tabletas, supositorios.
- f.- Influencia de la tecnología (procedimiento de manufactura): homogenización, molido, fuerza de compresión.
- g.- Vía de administración: oral, rectal, parenteral, tópica
- h.- Sexo, edad, peso (3)

La influencia que tiene la velocidad de disolución en la velocidad de absorción de un fármaco es considerada de suma importancia, la desintegración de una tableta y la disolución del principio activo de estos granulos depende del tipo de formulación.

Si la liberación del principio activo es lenta o incompleta los niveles sanguíneos terapéuticos necesarios pueden no ser alcanzados y el efecto farmacológico no aparecerá. Esto explica que diferentes productos farma

(3) Wagner, J.G.

Biopharmaceutics and Relevant Pharmacokinetics
First Edition. The Hamilton Press.
Hamilton, Illinois (1971)

céuticos conteniendo el mismo principio activo y la misma dosis pero de diferente compañía pueden dar diferentes respuestas terapéuticas.

GENERALIDADES DE ANTIBIOTICOS .-

CLASIFICACION POR SU COMPOSICION QUIMICA.-

Las estructuras químicas de los antibióticos son muy diversas.

Se pueden distinguir sin embargo ciertas clases diferentes de compuestos, dentro de los cuales los miembros individuales muestran similitudes en su rango de actividad antimicrobiana y su toxicidad clínica.

Los antibióticos "Polipéptidos" incluyen bacitracina, polimixina y Tirotricina.

Los antibióticos "Macrólidos". eritromicina, oleandomicina.

Los antibióticos "Aminoglicósidos": gentamicina, kanamicina, neomicina y estreptomina.

Los antibióticos "Glicopéptidos": vancomicina.

Los antibióticos "Derivados de Aminoácidos": penicilina, ciclocerina y clo-ranfenicol.

Antibióticos derivados de Tetraciclinas (clorotetraciclina, oxitetraciclina y tetraciclina (6) (7)

(6) Blacow, N.W. Martindale. The Extra Pharmacopoeia
Twenty Sixth Edition. The Pharmaceutical Press. London, (1972)

(7) Bentley and Driver's. Textbook of Pharmaceutical Chemistry
Eighth Edition. Oxford University Press
New York, Toronto, (1969)

Peso Molecular:

1056.41

Descripción:

Polvo cristalino blanco, inodoro é insípido.

Solubilidad:

Soluble en alcohol, metanol, acetona y cloroformo. Practicamente -
insoluble en agua

Temperatura de fusión:

135-140°C.

Ensayos de identidad:

1.- El espectro de absorción infrarrojo en la región de 2 a 12 micras,
de una solución al 5% en cloroformo, se compara cuantitativamente
a una solución patrón tratada en forma similar.

2.- Disolver 15 mg. en 2 ml. de acetona y agregar 2 ml. de HCl conc.
Se produce un color naranja, que cambia a rojo y después a púrpu-
ra intenso; agitar con 2 ml de cloroformo; se extrae algo de co--
lor púrpura.

Ensayos de pureza:

Humedad: no más del 4% por el método de Karl Fischer

Potencia: No menos de 600 mcg de actividad de eritromicina base por -
mg. calculado en base anhidra y determinado por el método espectrofo-
tométrico.

Valoración:

Transferir 100 mg. de muestra a un matraz volumétrico de 500 ml. me-

dante 200 ml de metanol y llevar a volumen con solución amortiguadora al 0.5% de fosfato (pH 7.0). Efectuar la hidrólisis de la solución dejándola reposar toda la noche (aproximadamente 20 h) a temperatura ambiente, o bien, calentando a 60°C una alícuota de 100 ml durante 3 horas; tomar 4 alícuotas de 10 ml. y transferirlas a 4 matraces volumétricos de 25 ml. (8).

A 2 matraces añadir 1 ml. de solución 0.5 N de H_2SO_4 , agitar y dejar a temperatura ambiente durante una hora. A los otros dos matraces añadir 2 ml de reactivo alcalino (16.8 g. de fosfato sodio tribásico y 1 g. de hidróxido de sodio en 100 ml. de agua) calentar a 60°C durante 15 min. - enfriar rápidamente en un baño de hielo a la temperatura ambiente. Diluir a la marca con agua destilada y determinar la absorbancia a 236 m μ . Después de que las dos muestras tratadas con ácido han reaccionado durante una hora, añadir 1 ml. de solución 0.5 N de NaOH a cada matraz y proceder a partir del párrafo que dice: "Añadir 2 ml a cada matraz de reactivo alcalino. . ." y usar estas lecturas de absorbancia como blanco. Proceder en igual forma con 70 mg. de patrón de referencia de eritromicina. Cálculos: (Basados en la cantidad de patrón usado en 500 ml. y la cantidad de muestra usada en 500 ml)

$$(1) \frac{\text{Lectura del patrón} - \text{Lectura del blanco}}{\text{mg. de patrón usados}} \times \frac{1000}{\text{potencia del patrón}} = \text{Factor K}$$

(8) Cámara Nacional de la Industria de Laboratorios Químico-Farmacéuticos
"Fármacos"
México, D.F. México. (1973)

Potencia en mcg/mg (determinada microbiológicamente)

Potencia cuando se seca 4 h a 70°C al vacío : 980 mcg/mg

Factor K = densidad óptica actual, equivalente a 1 mg. de eritromicina base 100% cuando se diluye a 500 ml. según se señaló anteriormente.

$$(2) \frac{\text{Lectura de la muestra-blanco de la muestra}}{\text{peso de la muestra en mg.}} \times \frac{1000}{\text{factor K del patrón}}$$

= mcg de eritromicina base por mg.

Límites : No menos de 600 mcg de eritromicina base por mg

Límites en cápsulas: no menos de 90% y no más de 115% de eritromicina base (8)

Farmacodinamia:

La acción farmacológica del estolato de eritromicina es semejante a la eritromicina: el estolato es más estable a la acción de los jugos gástricos que la base libre. Tiene actividades bacteriostáticas y bactericidas, dependiendo de su concentración. Tiene un espectro de actividad parecido al de la penicilina. Presenta actividad contra la mayor parte de bacterias Grampositivas y algunas Gramnegativas (*Hemophilus*) contra las espiroquetas y algunas rickettsias y contra *Mycoplasma* y *Entamoeba*; son altamente sensibles los estreptococos hemolíticos y corinebacterias; los estafilococos (incluyendo los resistentes a la penicilina) son algo menos sensibles. Algunas bacterias, particularmente estafilo

(8) Cámara Nacional de la Industria de Laboratorios Químico-Farmacéuticos.

"Fármacos"

México, D.F. México, (1973)

cocos, rápidamente desarrollan resistencia a la eritromicina in vitro; in vivo no es problema clínico serio el desarrollo de cepas resistentes durante el curso de tratamientos cortos; es más común este problema en tratamientos largos (8)

Absorción y eliminación.-

Es absorbido fácilmente del tracto gastrointestinal administrándolo - antes o después de los alimentos apareciendo en la sangre como eritromicina base o como propionato.

Durante las primeras 6 horas después de la administración se encuentran niveles del fármaco terapéuticamente efectivos.

Es excretado por la bilis en concentraciones muy altas y por la orina - en cantidades más pequeñas generalmente del 3 al 5% de la dosis (6)

Usos:

Algunas autoridades han recomendado el uso de este antibiótico al tratamiento de infecciones debidas a cepas resistentes a la penicilina y a pacientes sensibles a la penicilina. La eritromicina se ha empleado con éxito en el tratamiento de infecciones estreptococcicas agudas, neumonía lobar y otras infecciones neumocóccicas. También es útil en el tratamiento de infecciones debidas a Haemophyus influenza. Uno de sus

(8) Cámara Nacional de la Industria de Laboratorios Químico-Farmacéuticos. "Fármacos". México, D.F. México, (1973)

(6) Blacow, N.W.

Martindale, The Extra Pharmacopoeia. Twenty sixth Edition
The Pharmaceutical Press. London (1972)

usos más importantes es en el tratamiento de enteritis estafilo-----coccicas; puede ser útil en las amebiasis (8)

Dosis Usual:

El equivalente de 1-4 g. de eritromicina base diariamente en cantidades igualmente divididas y espaciadas por lo general cada 6 horas según la naturaleza y gravedad de la infección (8)

Toxicidad:

La DL₅₀ es de 6.45 g/kg por vía oral en ratones o ratas. En dosis terapéuticas son raros los efectos tóxicos del estolato de eritromicina y por lo regular son leves; las dosis prolongadas ocasionalmente producen náuseas, vómitos y diarrea. En seguida de su administración oral se produce un marcado efecto sobre la flora del tracto gastrointestinal, pero no es tan extenso como el originado por las tetraciclinas. - En pacientes tratados con estolato de eritromicina durante más de 10 días, se han presentado algunos signos de alteración hepática, consistentes en: dolor abdominal, fiebre, dilatación del hígado, eosinofilia elevación de la bilirrubina sérica y otros cambios en las funciones hepáticas: todas estas alteraciones cesan al suspender el tratamiento. Son raros los casos de urticaria y erupciones cutáneas alérgicas (8)

(8) Cámara Nacional de la Industria Químico-Farmacéutica
"Fármacos"
México, D.F. México, (1973)

II.- P A R T E E X P E R I M E N T A L . -

A.- E Q U I P O

B.- M E T O D O S

Métodos de valoración de eritromicina en
materia prima y cápsulas.

Método de valoración de eritromicina en
sangre y orina "in vitro"

C.- Evaluación de Bioequivalencia de 5 formulaciones
conteniendo estolato de eritromicina

Protocolo para el estudio clínico

Resultados de las determinaciones efectuadas "in vivo"
en muestras de sangre y orina.

A.- MATERIAL Y REACTIVOS.-

a.- Material .-

Unidad de flujo laminar vertical CLFS-1

Estufa de 100°C a 300°C

Autoclave MCA.ELME de 40 por 91 cms.

Incubadora Theico

ultrasónico 9662-01 Varian

Medidor de zonas Fisner Lilly

Cilindros de acero inoxidable (6.0 \pm 0.1 mm. diámetro interior x 8.0 \pm 0.1 mm diámetro exterior x 10 \pm 0.1 mm longitud)

Cajas Petri (20 x 100 mm)

b.- Reactivos.-

Solución amortiguadora de fosfato pH 7.9 \pm 0.1 (9)

solución salina al 0.9% estéril

Etanol R.A.

Tubos heparinizados

Sangre

Muestras de referencia de estolato de eritromicina U.S.P.

c.- Medios de Cultivo .-

Antibiotic Medium No. 1 (Difco)

Antibiotic Medium No.11 (Difco) (10)

- (9) Kevanag, F. Analytical Microbiology. Vol. 11 Third Edition. Academic Press. New York and London, (1972)
- (10) Grove, D.C. and Randall, W.A. "Assay methods of Antibiotics" A Laboratory Manual Medical Encyclopedia, I.N.C. New York

B.- M E T O D O S.-

El primer método sobre el cuál se trabajó fue el de valoración de estolato de eritromicina como materia prima. El método oficial es el microbiológico, el cual aparece en el Code of Federal Regulations (11).

Este método se modificó y se aplicó en la valoración de estolato de eritromicina como materia prima y en el análisis de las formas farmacéuticas estudiadas. A continuación se describe de manera concisa el método desarrollado.

El método se basa en la determinación de la potencia de la eritromicina por medición de los halos de inhibición que ocasiona el antibiótico en el crecimiento de *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

P R E P A R A C I O N D E L A M U E S T R A

Pesar con exactitud una cantidad de estolato de eritromicina equivalente a 10 mg. de eritromicina base. En el caso de análisis de cápsulas obtener el peso promedio y después pesar una cantidad de polvo que contenga una cantidad de estolato de eritromicina equivalente a 10 mg. de eritromicina base.

Disolver las muestras en un matraz volumétrico de 10 ml con etanol. Tomar una alícuota de 1 ml. y transferirla a un matraz de 100 ml. - aforar con solución reguladora de fosfato pH 8. Tomar una alícuota de 0.5 ml. y transferirlo a un matraz de 10 ml. aforar con solución reguladora de fosfato pH 8 (Solución problema; concentración \pm 0.5 mcg de eritromicina base/ml)

(11) Code of Federal Regulations. Title 21 Parts 141-599
Washington, (1974)

P R E P A R A C I O N D E L M I C R O O R G A N I S M O D E P R U E B A

El microorganismo deberá mantenerse a 5°C en tubos inclinados de medio de antibiótico No.1 efectuando resiembras cada semana. Tres días antes de la prueba tomar un tubo que haya sido resembrado 18 horas antes y agregarle 3 ml. de solución estéril al 0.9% agitar hasta remover el crecimiento del agar, y con esta suspensión inocular la superficie de una botella de Roux conteniendo 250 ml. de Antibiotic Medium No.1 (12).

Incubar a 37°C durante 24 hr. Al término de este tiempo adicionar 50 ml. de solución salina estéril al 0.9%. Remover el crecimiento y guardar esta suspensión en condiciones estériles a 5°C.

Efectuar pruebas en cilindro placa para encontrar la cantidad óptima de suspensión que debe agregarse a cada 100 ml. de Antibiotic Medium No. 11 a 48-50°C, para obtener zonas de inhibición claras y definidas al efectuar la -- prueba.

P R E P A R A C I O N D E L A S C A J A S P E T R I P A R A E F E C - - T U A R L A P R U E B A .

Adicionar 21 ml. de Antibiotic Medium No.11 a cada caja previamente estéril. Usar 12 cajas para la curva tipo y 3 para cada problema. Tapar las cajas con cubiertas de porcelana porosa y dejar solidificar el medio. Añadir a todas las cajas 4 ml. de Antibiotic No.11 inoculado a 48°C (como se indica en el párrafo antes descrito) y con movimientos circulares rápidos distribuirlos uniformemente en la superficie de la capa base.

(12) Arret, B. Johnson, D,P. and Kirshbaum, Journal of Pharmaceutical Sciences. 60. Nov. 1971

Dejar solidificar y colocar los 6 cilindros a intervalos de $\pm 60^{\circ}\text{C}$ en un radio de 2.8 cm. de la caja.

PROCEDIMIENTO GENERAL PARA EL ENSAYO .-

Preparar una solución de referencia de estolato de eritromicina tipo - - U.S.P. pesando con exactitud una cantidad equivalente a 10 mg. de eritromicina base en un matraz volumétrico de 10 ml. disolver con etanol y aforar .

Tomar 1 ml. de la solución anterior y transferir a un matraz volumétrico de 100 ml; llevar al aforo con solución reguladora pH 8. (Solución tipo: - concentración ± 10 mcg/ml), con esta solución preparar la siguiente serie de diluciones.

<u>Solución tipo (ml)</u>	<u>Solución Reguladora Fosfato pH 8 (ml)</u>	<u>Concentración de eritromicina (mcg/ml)</u>
a) 0.1	llevar a volumen de 10	0.1
b) 0.25	" " 10	0.25
c) 1.25	" " 25	0.5
d) 0.75	" " 10	0.75
e) 0.90	" " 10	0.90

Esta curva determina la relación entre la concentración de antibiótico y - el diámetro de las zonas de inhibición y sirve para interpolar los valores de los problemas y así determinar la concentración correspondiente de la muestra ensayada.

VALORACION DEL ESTOLATO DE ERITROMICINA

Preparar 4 series de 3 cajas para cada dilución (a,b,d y e) tomando como referencia la dilución (c), la cuál será incluida en todas las cajas. Utilizando una pipeta Pasteur llenar 3 cilindros intercalados en cada una de las cajas de una serie, con la dilución que se prueba y los 3 restantes con la dilución de referencia (c). Colocar las cajas en la incubadora a 37°C durante 16-18 horas. Retirar los cilindros y efectuar las lecturas del diámetro de las zonas de inhibición utilizando un medidor de zonas -- Fischer Lilly.

Promediar las 36 lecturas correspondientes a la dilución de referencia(c) en las 12 cajas; promediar por separado las 9 lecturas correspondientes a la dilución (c) de las tres cajas de una serie y también las 9 lecturas correspondientes a la dilución por probar de la curva tipo de cada serie (a,b,d,e).

Corregir los valores promediados obtenidos para cada una de las concentraciones de la curva tipo probadas en las 4 series de cajas de la siguiente manera.

Tomar el promedio de las 36 lecturas correspondientes a la dilución de referencia (c) y restarle algebraicamente el promedio de las 9 lecturas obtenidas para la misma dilución(c) en las tres cajas de la serie correspondiente a la dilución que se prueba. El valor obtenido así, sumarlo algebraicamente al promedio de las 9 lecturas correspondientes a la dilución que se prueba y este valor corregido es el que se utiliza para construir la curva tipo.

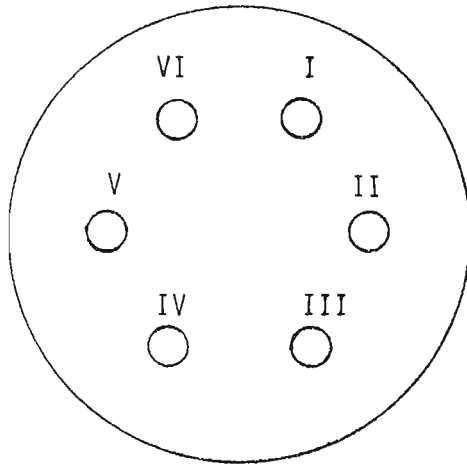
Usando papel semilogarítmico trazar la curva de la forma siguiente:

Graficar los valores correspondientes a las concentraciones en mcg/ml, en las ordenadas y los valores corregidos de las lecturas correspondientes a

cada una de las diluciones en el eje de las abscisas y trazar la recta a través de los puntos.

Utilizar series de tres cajas para cada muestra problema. Llenar tres de los seis cilindros de cada caja con la solución de referencia (c) y los tres restantes con la solución problema (p). Figura No.2

F I G U R A No.2



1-111-V = concentración de referencias (c)

11-1V-V1 = Concentración de la muestra (p)

Colocar las cajas en la incubadora a 37°C durante 16-18 horas, medir los halos de inhibición usando un medidor de zonas Fischer Lilly.

C A L C U L O S :

Promediar las lecturas correspondientes a la solución de referencia y a la solución problema, si el promedio del problema dá un valor más grande que el promedio de la solución de referencia, sumar la diferencia entre ambos, al valor que corresponde a la concentración de referencia (c) de la curva tipo.

Si el promedio del problema es más pequeño que el promedio de la solución

de referencia, restar la diferencia entre ambos, del valor que corresponde a la concentración de referencia (c) en la curva tipo.

Calcular la cantidad de eritromicina base utilizando la siguiente fórmula:

$$C \times D = \text{mg. de eritromicina base}$$

Donde:

C = concentración del antibiótico interpolado en la gráfica.

D = Factor de dilución

L I N E A R I D A D

Para determinar si la relación entre la concentración de antibiótico y el diámetro de las zonas de inhibición era lineal se prepararon soluciones de estolato de eritromicina de diferentes concentraciones y se efectuó el ensayo microbiológico.

Los resultados se encuentran a continuación.

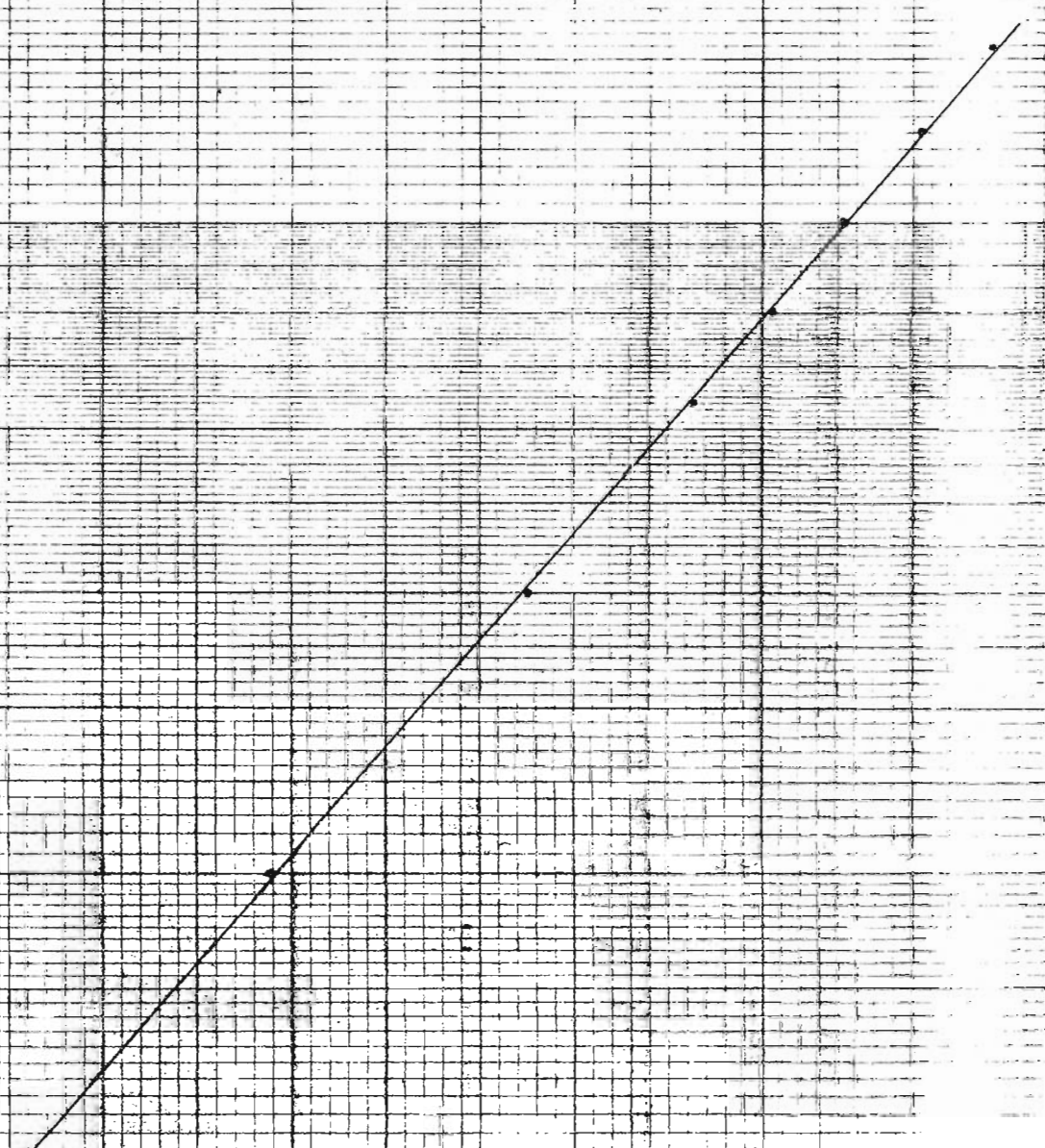
<u>Concentración de eritromicina</u> <u>mcg/ml</u>	<u>Diámetro de las zonas de</u> <u>inhibición (mm)</u>
0.10	11.20
0.20	13.79
0.40	16.59
0.64	18.30
0.80	19.10
1.00	19.84
1.25	20.62
1.56	21.40

Al graficar estos valores se obtuvo una relación lineal que se aprecia en la gráfica No.1 y además que puede observar que la sensibilidad del método es buena siendo posible cuantear cantidades muy pequeñas de antibiótico.

Gráfica 1

LINEARIDAD DE LAS DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS DE ERITROMICINA EN MUESTRAS DE BUFFER FOSFATO pH 8

CONCENTRACION DE ERITROMICINA mcg/ml



ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se realizó el análisis estadístico de los resultados al efectuar reco
bros de cantidades conocidas de eritromicina en solución reguladora
de fosfato pH 8 en orina y sangre.

Se determinó la varianza, desviación estándar así como los límites de
confianza para el 95% de probabilidad y el error estándar. (tablas 1,11 y
111)

DESVIACION ESTANDAR

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Intervalo de Confianza para el 95% de probabilidad .

$$I.C. 95\% = \frac{\sigma \times t}{\sqrt{n}}$$

LIMITES DE CONFIANZA

$$L.C. 95\% = \bar{x} \pm I.C.$$

ERROR ESTANDAR

$$E = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

T A B L A No.1

Datos de Recobros obtenidos en la determinación de Eritromicina en solución reguladora de fosfato pH 8.

<u>mg. de eritromicina agregados</u>	<u>mg. de eritromicina recuperados</u>	<u>Porcentaje de recuperación</u>
10	9.58	95.8
10	9.40	94.0
10	10.36	103.6
10	10.26	102.6
10	9.46	94.6
10	9.46	94.6
10	10.00	100.0
10	11.00	110.0
10	9.60	96.0
10	10.00	100.0
10	9.98	99.8
10	9.76	97.6
10	9.74	97.4
10	9.76	97.6
10	10.00	100.0
10	9.46	94.6
10	9.80	98.0
10	10.10	101.0
10	9.76	97.6
10	10.00	100.0
10	9.90	99.0
10	10.20	102.0
10	10.10	101.0
10	9.92	99.2

$F = 3.47$;

L.C.95% = 100.37
97.53

Error:0.694

Después de verificar la exactitud y precisión de nuestro método se --
efectuó el análisis de las formulaciones estudiadas que rotulaban --
250 mg. de eritromicina base, obteniendo los siguientes resultados:

<u>Formulación No.</u>	<u>Lote</u>	<u>Contenido de eritromicina mg/cap.</u>
1	H-5	262.5
2	2075-P298	255.5
3	247-A	276.5
4	2527 W	259.0
5	S/No.	246.0

Con estos resultados se tuvo la seguridad de que las cápsulas sometidas al estudio estaban dentro de los límites correctos de contenido de eritromicina y se procedió a efectuar el estudio de bioequivalencia.

MÉTODOS DE VALORACION DE ESTOLATO DE ERITROMICINA EN SANGRE Y ORINA.-

Basándose en el método de análisis empleado para la valoración de estolato de eritromicina en materia prima y cápsulas, se desarrollaron dos nuevos métodos para la valoración de dicho antibiótico en muestras de sangre y de orina. Para el desarrollo de dichos métodos se adicionaron cantidades conocidas de estolato de eritromicina a la sangre y orina de personas sanas que no estaban bajo ningún tratamiento médico efectuándose recobros, siguiendo el método que a continuación se resume.

PROCEDIMIENTO PARA LA VALORACION DE ERITROMICINA EN SANGRE.

Pesar con exactitud una cantidad de estolato de eritromicina equivalente a 10 mg. de eritromicina base en un matraz volumétrico de 10 ml, disolver con etanol y llevar al aforo; tomar 1 ml. de esta solución y transferirla a un matraz volumétrico de 100 ml, llevar a volumen con solución reguladora de fosfato: pH 8 (solución 1); tomar 0.5 ml. de esta solución en matraces volumétricos de 10 ml. adicionarles 1 ml de sangre y llevar a volumen con solución reguladora de fosfato pH 8. (Concentración \pm 0.5 mcg/ml). Colocar los matraces en un baño Ultrasónico de 15-30 min. hasta que la solución tenga un color rojo transparente.

Para la curva tipo se prepara de la misma solución 1, (concentración \pm 10 mcg/ml) .

LINEARIDAD DEL METODO PARA DETERMINAR ERITROMICINA EN SANGRE .-

Para determinar la relación entre la concentración de antibióticos y diámetro de las zonas de inhibición se prepararon soluciones de esto lato de eritromicina de diferentes concentraciones y se efectúa el ensayo microbiológico.

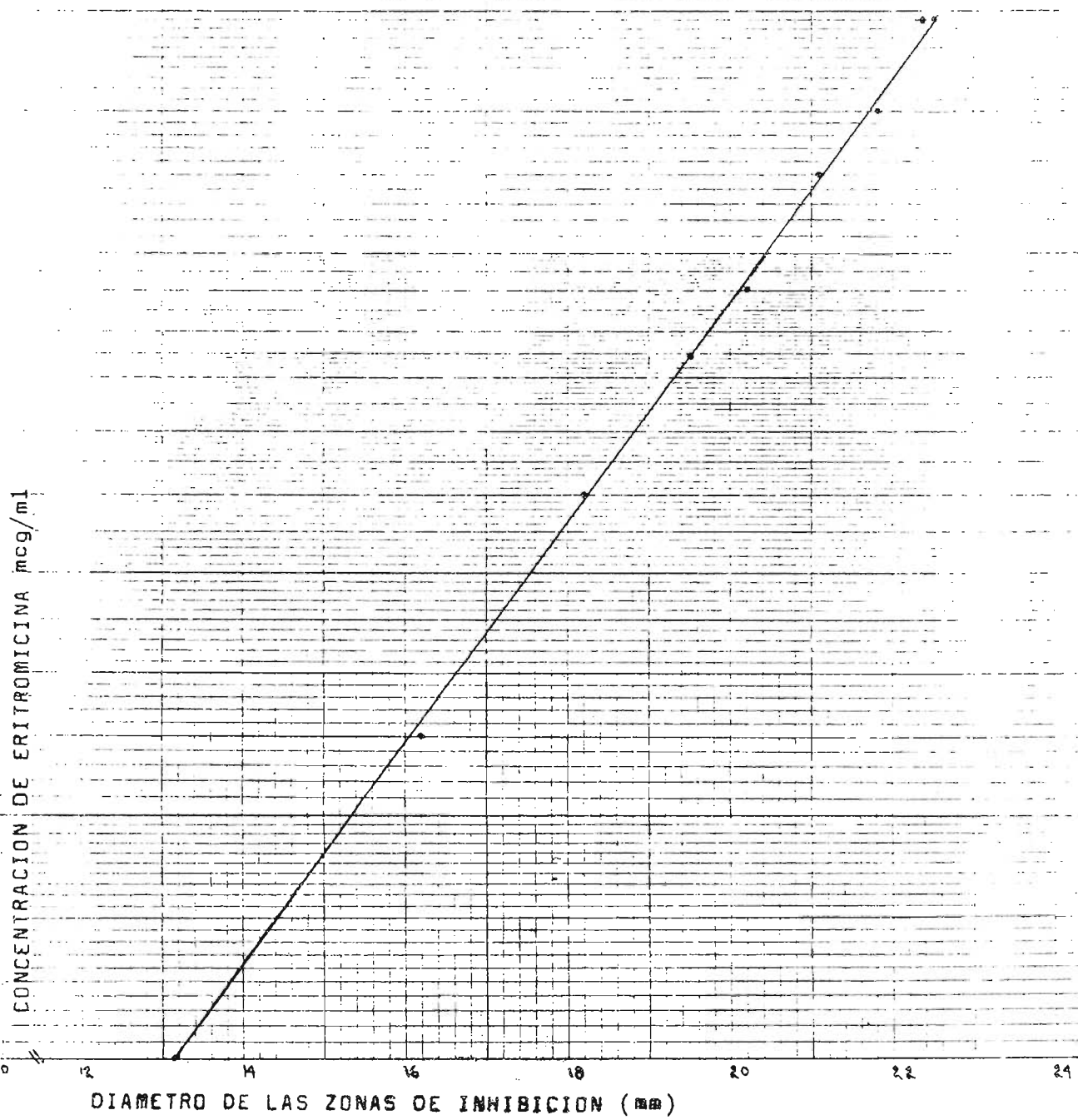
Los resultados obtenidos se encuentran a continuación.

<u>Concentración de eritromicina (mcg/ml)</u>	<u>Diámetro de las zonas de inhibición (mm)</u>
0.10	13.13
0.25	16.22
0.5	18.20
0.75	19.53
0.90	20.20
1.25	21.08
1.50	21.84
1.90	22.37

Los resultados fueron graficados en papel similogarítmico obteniéndose una relación lineal. Gráfica II.

LINEARIDAD DE LAS DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS

DE ERITROMICINA EN SANGRE (IN VITRO)



T A B L A II

DATOS OBTENIDOS EN LA DETERMINACION DE ERITROMICINA EN SANGRE .-

<u>MG. DE ERITROMICINA</u> <u>ADICIONADOS</u>	<u>MG. DE ERITROMICINA</u> <u>RECUPERADOS</u>	<u>PORCIENTO DE RE</u> <u>CUPERACION</u>
10	9.98	99.80
10	9.70	97.00
10	9.88	98.80
10	9.70	97.00
10	10.80	108.00
10	9.62	96.20
10	10.00	100.00
10	9.80	98.00
10	9.60	96.00
10	9.85	98.50
10	10.40	104.00
10	9.40	94.00
10	10.40	104.00
10	9.78	97.80
10	9.60	96.00
10	9.80	98.00
10	9.70	97.00
10	9.80	98.00
10	10.10	101.00
10	9.60	96.00
10	10.20	102.00
10	9.50	95.00
10	9.40	94.00
10	10.20	102.00
10	9.50	95.00

$\sigma = 3.43$; L.C. 95% = 99.93 ; Error = 0.686
97.11

METODO DE VALORACION DE ERITROMICINA EN ORINA

Procedimiento.

Pesar con exactitud una cantidad de estolato de eritromicina equivalente a 10 mg. de eritromicina base en un matraz volumétrico de 10 ml; disolver con etanol y llevar al aforo, tomar 1 ml de esta solución y transferirla en un matraz volumétrico de 100 ml; llevar a volumen con solución reguladora de fosfato pH 8 (solución 1), tomar 0.5 ml. de esta solución y transferirla a un matraz volumétrico de 10 ml adicionar 1 ml de orina y llevar a volumen con solución reguladora de fosfato pH 8, (concentración \pm 0.5 mcg/ml).

Para la curva tipo se prepara de la misma solución 1. (concentración \pm 10 mcg/ml).

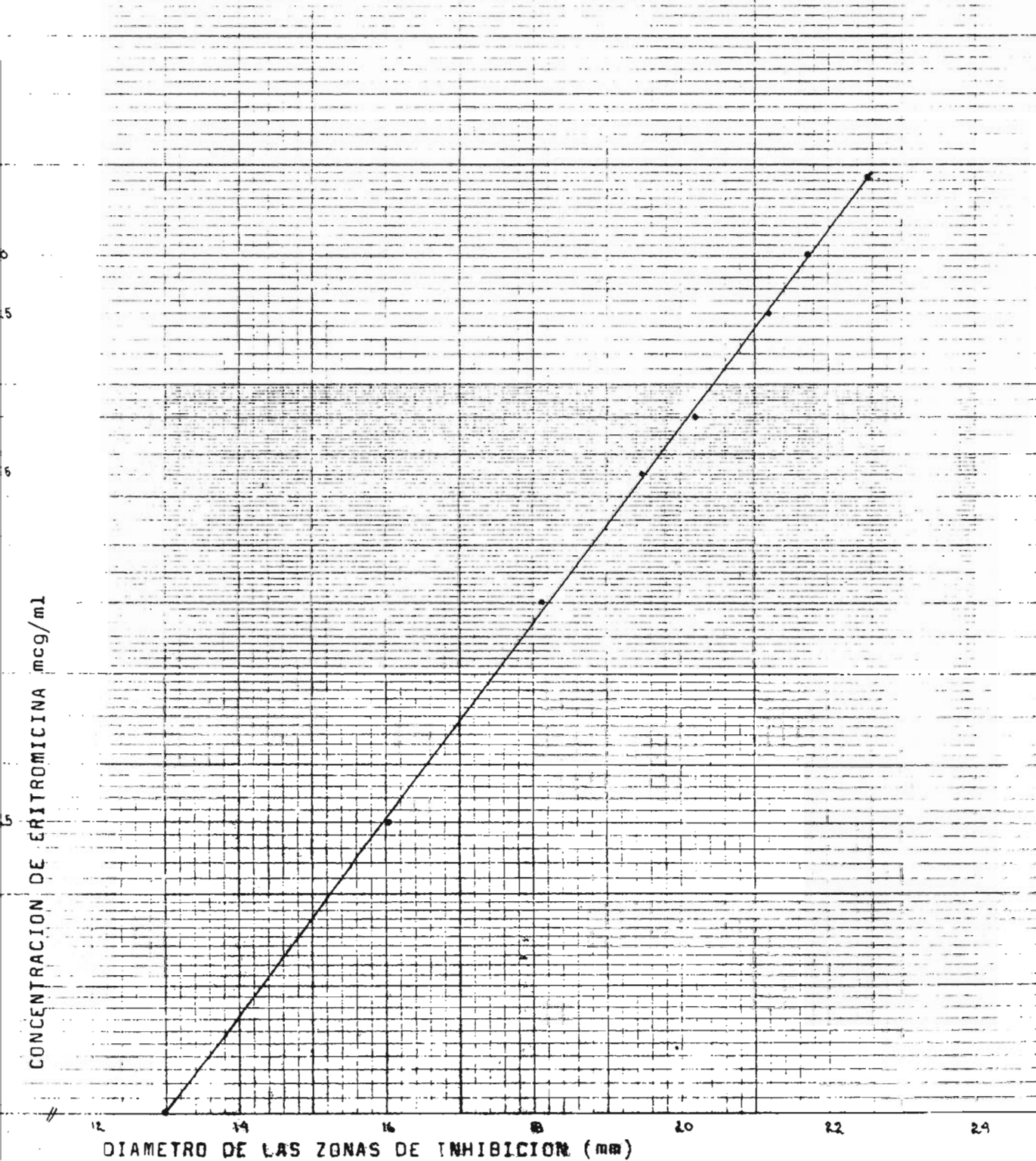
LINEARIDAD DEL METODO PARA DETERMINAR ERITROMICINA EN ORINA.

Para determinar la relación entre la concentración de antibiótico y -- diámetro de las zonas de inhibición se prepararon soluciones de eritromicina de diferentes concentraciones y se efectuó el ensayo microbiológico.

Los resultados se muestran a continuación

<u>Concentración de eritromicina mcg/ml</u>	<u>Diámetro de las zonas de inhibición (mm)</u>
0.10	13.00
0.25	16.00
0.50	18.10
0.75	19.45
0.90	20.20
1.25	21.20
1.50	21.76
1.90	22.50

LINEARIDAD DE LAS DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS
DE ERITROMICINA EN MUESTRAS DE ORINA
(in vitro)



T A B L A III

DATOS DE RECOBROS OBTENIDOS EN LA DETERMINACION DE ERITROMICINA

EN ORINA.-

<u>mg. de eritromicina adicionados</u>	<u>Mg. de eritromicina recuperados</u>	<u>Porciento de recuperación</u>
10	9.60	96.00
10	10.80	108.00
10	10.16	101.60
10	9.76	97.60
10	10.40	104.00
10	9.64	96.40
10	10.02	100.20
10	9.53	95.30
10	9.60	96.00
10	9.90	99.00
10	10.00	100.00
10	10.00	100.00
10	10.30	103.00
10	9.40	94.00
10	10.70	107.00
10	9.92	99.20
10	10.20	102.00
10	9.80	98.00
10	9.40	94.00
10	10.20	102.00
10	9.84	98.40
10	9.60	96.00
10	9.70	97.00
10	9.80	98.00
10	9.80	98.00

$\sigma = 3.66$

L.C. 95% : 100.73 ; Error = 0.732

97.71

C) EVALUACION DE LA BIOEQUIVALENCIA DE CINCO MEDICAMENTOS CONTENIENDO ESTOLATO DE ERITROMICINA.-

Protocolo para el estudio Clínico.

Este trabajo fue realizado con la colaboración del Hospital General de México, S.S.A.

Pabellón 404-B

Unidad Metabólica.

OBJETIVO.-

Comparar los niveles sanguíneos y la excreción urinaria de estolato de eritromicina en cápsulas administradas por vía oral.

SELECCION DE PACIENTES.-

Se seleccionaron tres sujetos, voluntarios del sexo masculino, mayores de 18 años, cuya historia clínica, valoración de funciones hepáticas y renal, metabolismo y hematología muestren normalidad, que no hayan tomado ningún medicamento las dos semanas anteriores al estudio. Después de informar a cada voluntario de la naturaleza y riesgos del estudio, se les pidió que firmaran una carta otorgando su autorización para participar en la investigación.

MATERIAL.-

Estolato de eritromicina con un equivalente de 250 mg. de eritromicina base de las siguientes formulaciones de diferentes laboratorios:

<u>Formulación</u>	<u>Lote No.</u>
1	H-5
2	2075-P-298
3	247-A
4	2527W Sec.A
5	s/número

DISEÑO EXPERIMENTAL.

El diseño de este estudio fue simple ciego cruzado en que cada sujeto recibió las cinco formulaciones en diferente secuencia, a cada sujeto se le asignó un número del 1 al 3 al azar y recibieron el medicamento de acuerdo con el siguiente esquema:

<u>Sujeto</u>	<u>Día del Estudio</u>					
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
1	1	2	3	4	5	3
2	2	3	4	5	1	4
3	3	4	5	1	2	5

INSTRUCCIONES A LA ENFERMERA

1.- Signos Vitales: Pulso, Tensión Arterial, Temperatura y Respiraciones cada 3 horas, iniciado a las 18.00 horas del día de ingreso.

2.- Colección de las Muestras Biológicas:

a) Sangre:

NIVELES SANGUINEOS DE ERITROMICINA.-

Los días 1, 2, 3, 4, 5 y 6 del estudio, se tomarán 5 ml. de sangre con un vacutainer heparinizado (tapón verde) a las 0 hs, (08:00hs). Antes de la administración del medicamento , 1 hr. (09:00 hs), 2 hs. (10.00 hs),

3 hs. (11:00 hs), 4hs. (12:00 hs) y 6 hs (14.00 hs), después de la administración del medicamento.

Las muestras de sangre obtenidas y etiquetadas con número y nombre del sujeto, fecha, día de estudio y hora, se refrigeraron hasta su envío - al laboratorio antes de 24 horas para su análisis.

b) ORINA

EXCRECION URINARIA DE ERITROMICINA

Los días 1, 2, 3, 4, 5 y 6 del estudio, se hicieron colecciones de orina de las 08:00 a las 09:00 hs. de 09:00 a 10:00, de 10:00 a 11:00, de 11:00 a 12:00, de 12:00 a 14:00 y de 14:00 a 08:00 hs. del día siguiente.

De cada colección de orina se preparó una alícuota de 100 ml con 0.5 ml de tolueno como preservativo, la que etiquetada con número y nombre del sujeto, fecha, día de estudio y período de la colección, se mantuvo en refrigeración hasta su envío al laboratorio para su análisis.

INSTRUCCIONES DIETETICAS.-

Dieta.-

Libre balanceada de acuerdo con las necesidades del sujeto con el siguiente horario: desayuno (400 calorías) a las 7 hs.; comida a las 15 hs. y cena a las 20:00 hs.

INSTRUCCIONES AL MEDICO INVESTIGADOR.-

Medicamento:

La administración del medicamento se efectuó por el médico, quien a las 08:00 dio una cápsula de 250 mg. de eritromicina por vía oral con 100 ml. de agua, los días 1, 2, 3, 4, 5 y 6 del estudio de acuerdo con el esque

ma del diseño experimental, el número del sujeto y el día de estudio

Motivos para suspender el estudio .-

El estudio se suspenderá si se presentan signos y síntomas significativos, por voluntad del sujeto ó por falta de cooperación.

III.- R E S U L T A D O S

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la determinación microbiológica de eritromicina en sangre en las ordenadas y tiempo en horas en las abscisas correspondiendo a las curvas de absorción para cada formulación.

Para obtener las curvas de excreción en orina se graficaron mg. de eritromicina acumulada en las ordenadas y tiempo en horas en las abscisas.

Las áreas bajo la curva fueron determinadas en planímetro y usando una computadora. Los resultados obtenidos por los dos métodos fueron semejantes.

C A L C O L O S

Las áreas por el método del planímetro fueron determinadas en unidades de pulgada² pero para los fines del estudio se requerían unidades de mcg/ml.hs y la conversión se efectuó con la siguiente fórmula:

$$A \text{ (mcg/ml.hs.)} = A_p \times 6.45 \times E_c \times E_t$$

Donde:

A_p = Area obtenida con el planímetro en pulg²

6.45 = equivalente de cm² / pulg²

E_c = escala en el eje de las ordenadas

E_t = escala en el eje de las abscisas

Para conocer la cantidad de eritromicina acumulada se aplicaron las siguientes fórmulas:

$$\text{1a. hora} = (C \times V)_1 = \text{mg de eritromicina}$$

$$2a. \text{ hora} = (C \times V)_1 + (C \times V)_2 = \text{mg de eritromicina}$$

$$3a. \text{ hora} = (C \times V)_1 + (C \times V)_2 + (C \times V)_3 \text{ mg de eritromicina}$$

etc.

Donde: C = Concentración de eritromicina base en orina

V = Volumen de orina excretado

CONCENTRACION DE ERITROMICINA EN SANGRE

SUJETO No. 1

C O N C E N T R A C I O N mcg/ml

<u>Tiempo</u>	<u>Formulación</u>	<u>Formulación</u>	<u>Formulación</u>	<u>Formulación</u>	<u>Formulación</u>	
hs	No.1	No.2	No.3	No.3	No.4	No.5
0	-	-	-	-	-	-
1	0.71	0.28	0.12	0.15	0.09	1.26
2	1.53	0.89	0.22	0.27	1.56	1.62
3	1.43	0.90	0.93	0.61	1.70	1.42
4	1.01	1.24	1.14	1.07	1.38	0.93
6	0.54	0.76	0.95	0.94	0.78	0.48
24	0.10	0.10	0.32	0.24	0.17	0.02

SUJETO No. 2

<u>hs</u>	<u>Formulación</u>	<u>Formulación</u>	<u>Formulación</u>	<u>Formulación</u>	<u>Formulación</u>	<u>Formulación</u>
hs	No.1	No.2	No.3	No.4	No.4	No.5
0	-	-	-	-	-	-
1	0.61	0.59	1.53	0.09	0.19	1.04
2	1.90	1.57	1.62	0.25	0.62	2.40
3	1.63	2.0	1.00	0.68	0.64	2.17
4	1.50	1.44	0.73	0.78	0.75	1.62
6	0.79	0.74	0.43	1.17	1.62	0.86
24	0.22	0.09	0.04	0.19	0.12	0.31

CURVAS DE ABSORCION

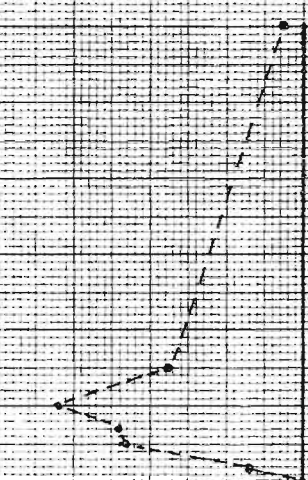
Sujeto No. 1

FORMULACION No. 2

ERITROMICINA EN SANGRE (mcg/ml)

1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2

2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
Tiempo (hrs.)

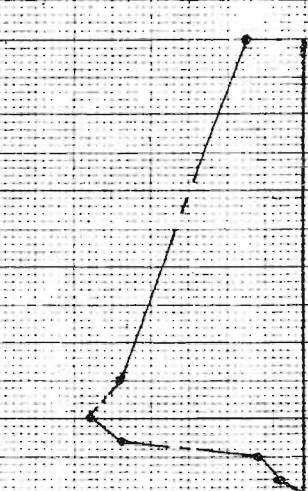


FORMULACION No. 3

ERITROMICINA EN SANGRE (mcg/ml)

1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2

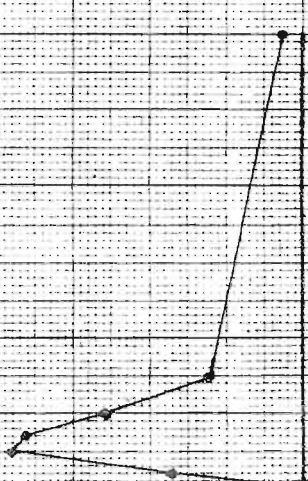
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
Tiempo (hrs.)



FORMULACION No. 1

1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2

2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
Tiempo (hrs.)

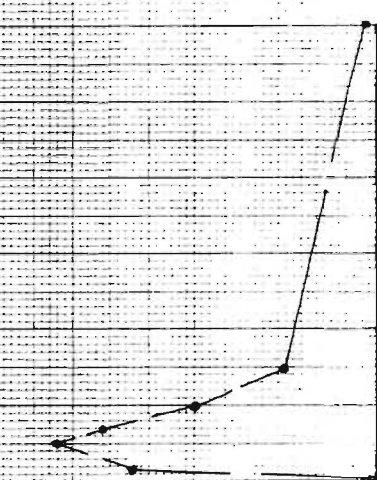


FORMULACION No. 5

ERITROMICINA EN SANGRE (mcg/ml)

1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2

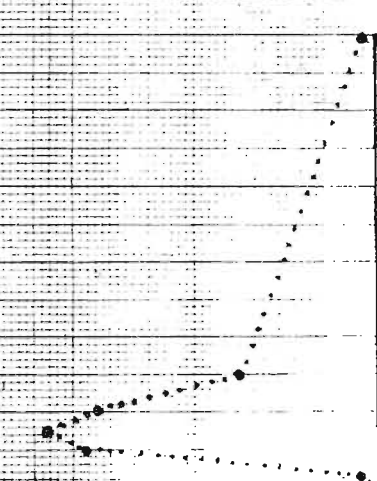
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
Tiempo (hrs.)



FORMULACION No. 4

1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2

2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
Tiempo (hrs.)

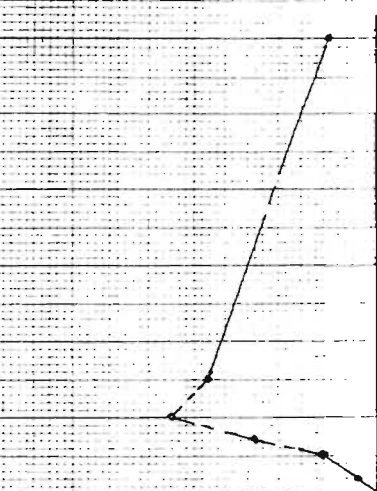


FORMULACION No. 3

ERITROMICINA EN SANGRE (mcg/ml)

1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2

2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
Tiempo (hrs.)

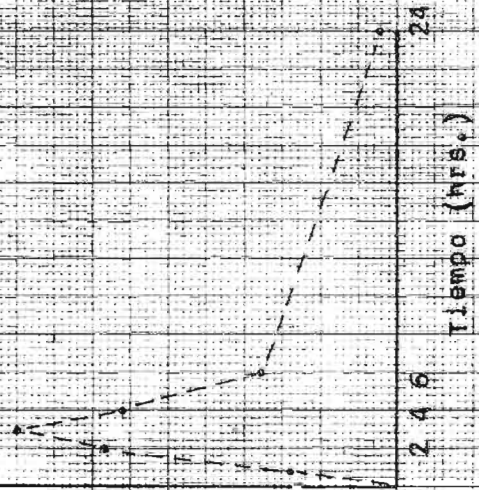


CURVAS DE ABSORCION

Sujeto No. 2
FORMULACION No. 2

ERITROMICINA EN SANGRE (mcg/ml)

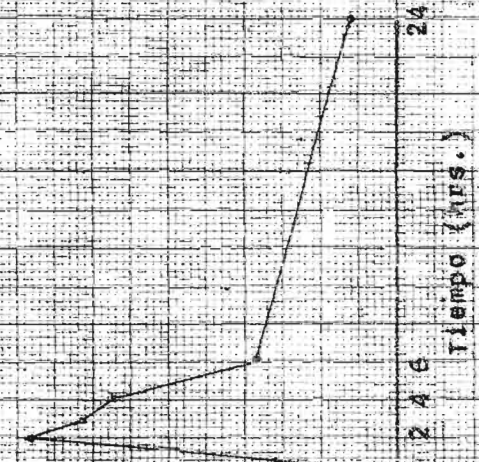
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2



24

FORMULACION No. 1

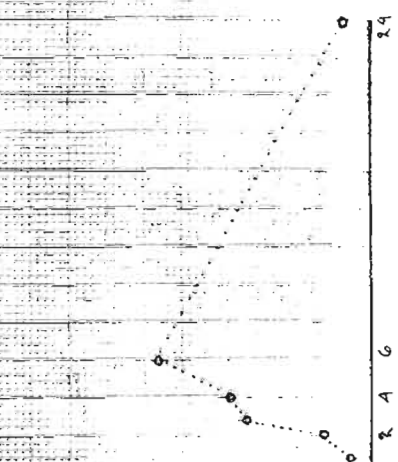
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.8
0.6
0.4
0.2



24

FORMULACION No. 4

0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.8
0.6
0.4
0.2

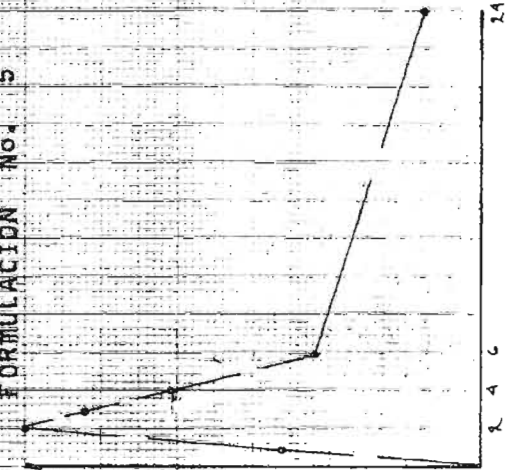


24

FORMULACION No. 5

ERITROMICINA EN SANGRE (mcg/ml)

2.4
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2

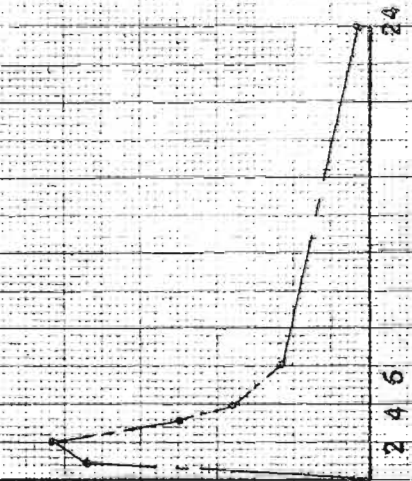


24

FORMULACION No. 3

ERITROMICINA EN SANGRE (mcg/ml)

1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2

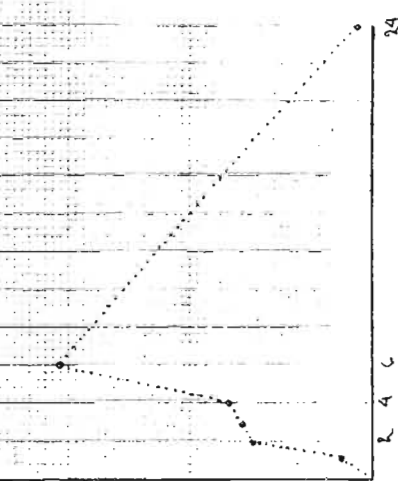


24

FORMULACION No. 4

ERITROMICINA EN SANGRE (mcg/ml)

1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2



24

CONCENTRACION DE ERITROMICINA EN SANGRE

S U J E T O No.3

C O N C E N T R A C I O N mcg/ml

<u>Tiempo</u>	<u>Formulación</u>	<u>Formulación</u>	<u>Formulación</u>	<u>Formulación</u>	<u>Formulación</u>
hs	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
0	-	-	-	-	-
1	1.20	0.07	-	0.15	-
2	1.42	0.95	0.19	0.46	-
3	0.99	1.17	0.43	1.08	0.34
4	0.82	0.75	0.62	1.06	0.49
6	0.37	0.39	0.75	0.69	0.40
24	-	-	0.06	-	-

CURVAS DE ABSORCION

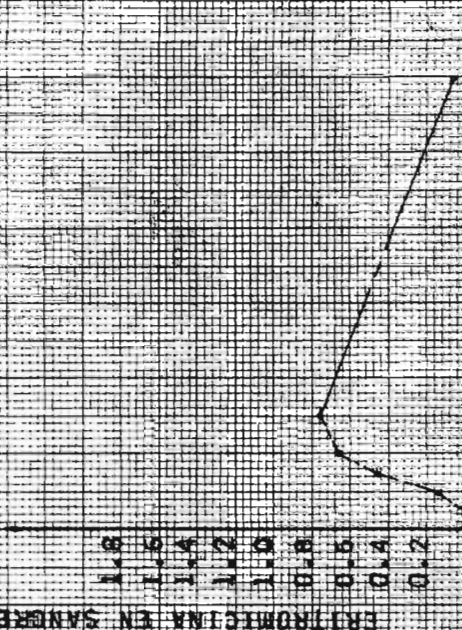
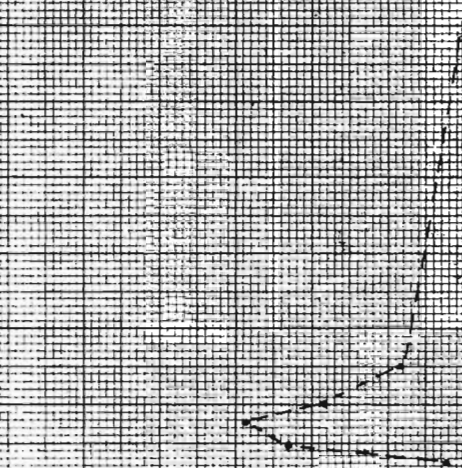
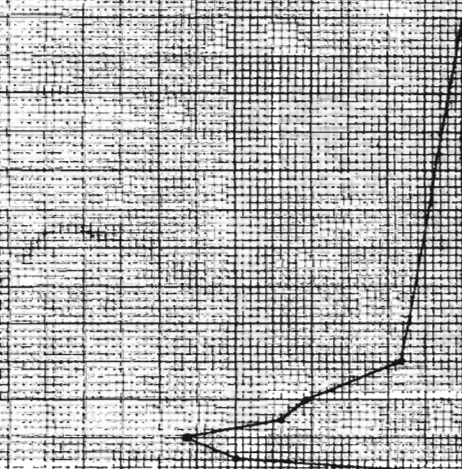
Sujeto No. 3

FORMULACION No. 1

FORMULACION No. 2

FORMULACION No. 3

ERITROMICINA EN SANGRE (mcg/ml)
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2



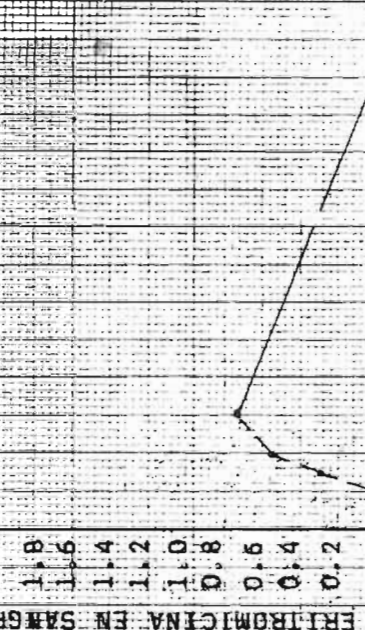
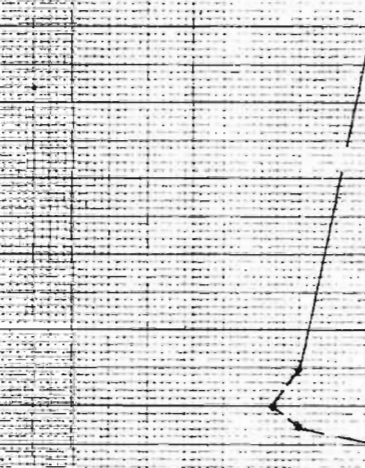
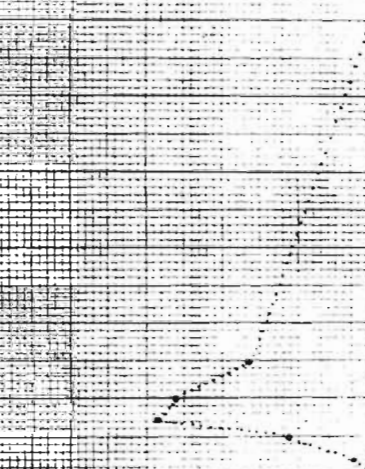
ERITROMICINA EN SANGRE (mcg/ml)

1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2

FORMULACION No. 4

FORMULACION No. 5

FORMULACION No. 5



(tiempo hrs.)

(tiempo hrs.)

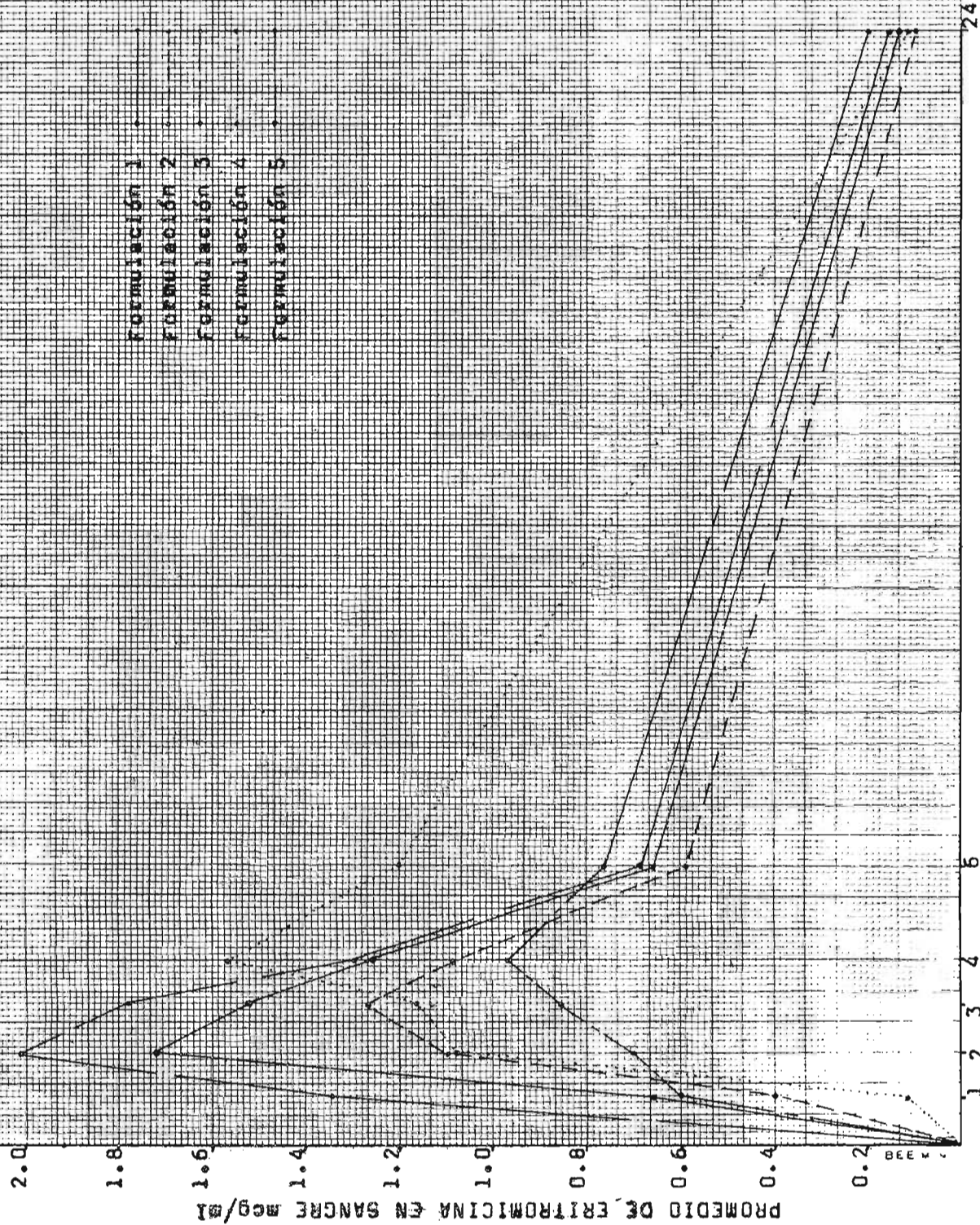
(tiempo hrs.)

CONCENTRACION PROMEDIO DE ERITROMICINA EN SANGRE

C O N C E N T R A C I O N mcg/ml

<u>Tiempo</u>	<u>Formulación</u> No.1	<u>Formulación</u> No.2	<u>Formulación</u> No.3	<u>Formulación</u> No.4	<u>Formulación</u> No.5
hs					
0	-	-	-	-	-
1	0.66	0.40	0.60	0.14	1.15
2	1.72	1.10	0.70	1.09	2.01
3	1.53	1.27	0.85	1.17	1.79
4	1.26	1.09	0.98	1.57	1.28
6	0.66	0.59	0.77	1.20	0.67
24	0.16	0.10	0.20	0.14	0.17

CURVAS PROMEDIO DE ABSORCIÓN



- Formulación 1
- Formulación 2
- Formulación 3
- Formulación 4
- Formulación 5

0.2 mg/ml x 1 cm.
2h = 1 cm.

PROMEDIO DE ERITROMICINA EN SANGRE mg/dl

Tiempo (hrs.)

24

6

4

3

2

1

AREAS BAJO LAS CURVAS DE ABSORCION PROMEDIO USANDO DIFERENTES METODOS Y

PORCENTAJE RELATIVO DE AREA

<u>Formulación</u> <u>No.</u>	<u>Método empleado</u>		<u>% Relativo de</u> <u>área</u>	<u>% Relativo de concentración</u> <u>máxima en la sangre</u>
	<u>Plánímetro</u> <u>mcg/ml.hs</u>	<u>Computadora</u> <u>mcg/ml.hs</u>		
1	13.83	13.82	76.82	85.70
2	11.17	11.16	62.03	63.50
3	13.11	13.14	73.04	49.10
4	17.89	17.99	100.00	78.30
5	15.09	15.03	83.85	100.00

CANTIDAD DE ERIPIROMICINA ACUMULADA EN ORINA DE 24 HORAS

S U J E T O No.1

C O N C E N T R A C I O N mg

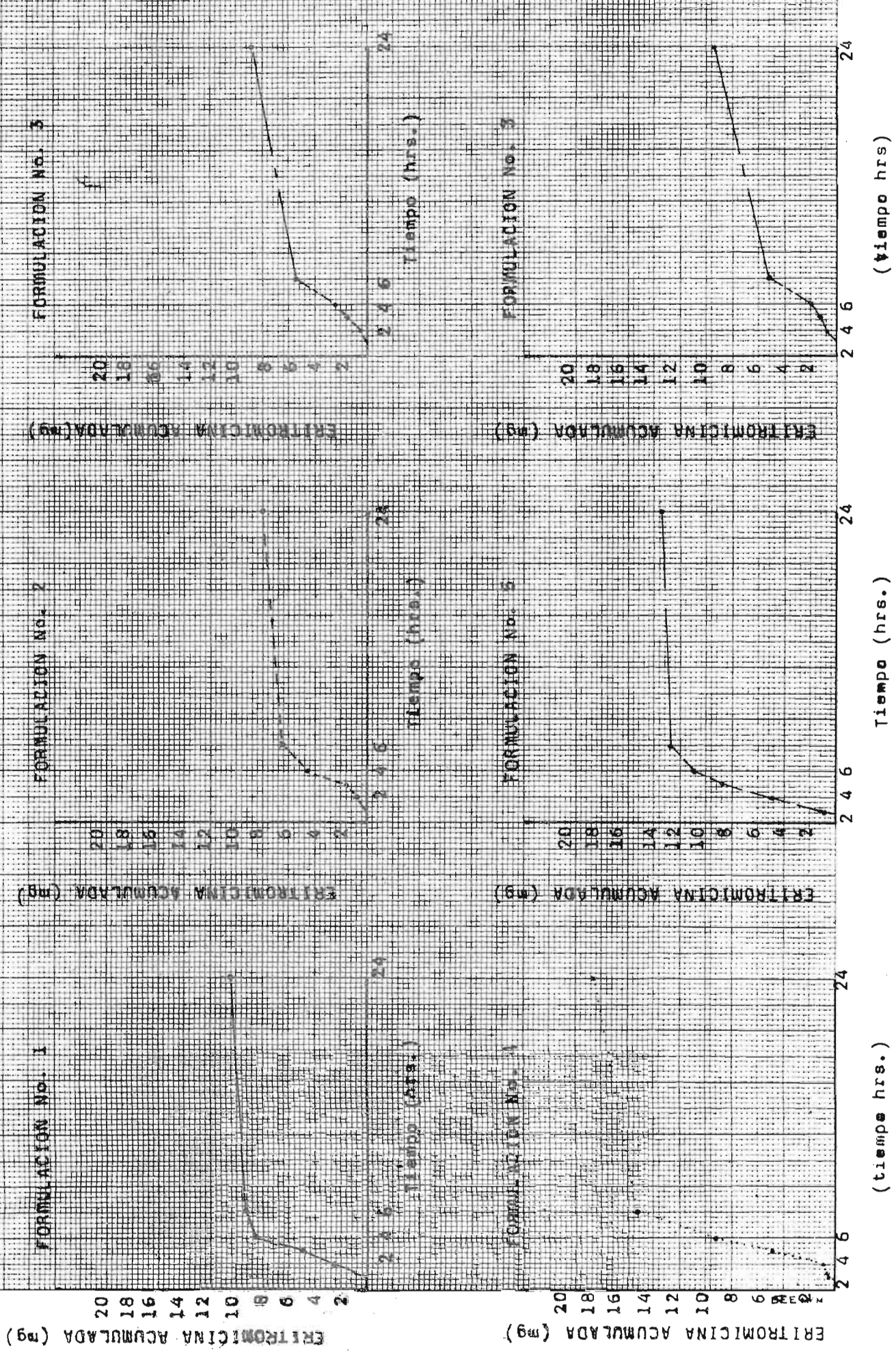
Tiempo hs	<u>Formulación</u>					
	No.1	No.2	No.3	No.3	No.4	No.5
0	-	-	-	-	-	-
1	0.04	0.01	0.01	0.05	0.05	0.75
2	2.21	1.32	0.13	0.24	0.98	5.5b
3	4.88	1.82	0.65	0.54	4.6b	9.05
4	8.38	4.87	2.38	1.93	9.07	10.97
6	9.49	6.27	5.99	4.98	15.12	12.29
24	11.36	8.00	9.77	9.70	18.63	13.58

S U J E T O No.2

hs	<u>Formulación</u>					
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.4	No.5
0	-	-	-	-	-	-
1	0.064	0.02	0.07	0.03	0.19	0.07
2	2.30	0.78	2.03	0.21	0.69	2.38
3	6.46	2.73	4.56	1.04	1.97	6.95
4	9.53	4.89	6.96	2.46	3.55	11.32
6	12.18	7.37	9.41	6.36	8.59	14.45
24	15.72	7.41	11.04	10.11	12.85	16.81

CURVAS DE ELIMINACION

Sujeto No. 1



ERITROMICINA ACUMULADA (mg)

ERITROMICINA ACUMULADA (mg)

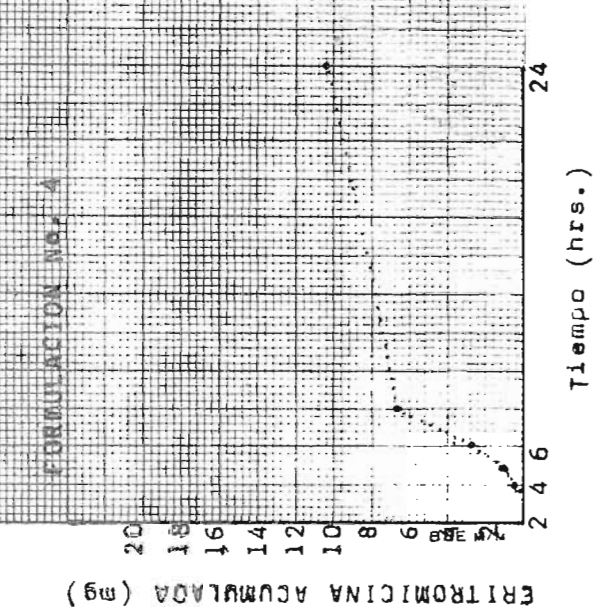
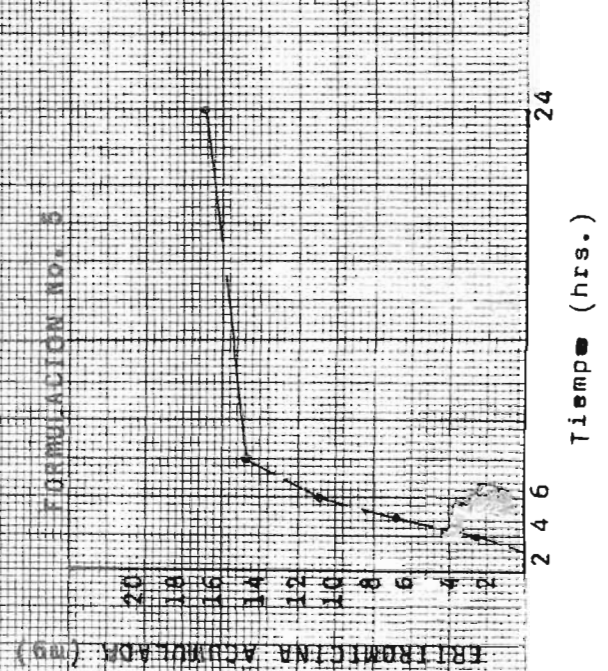
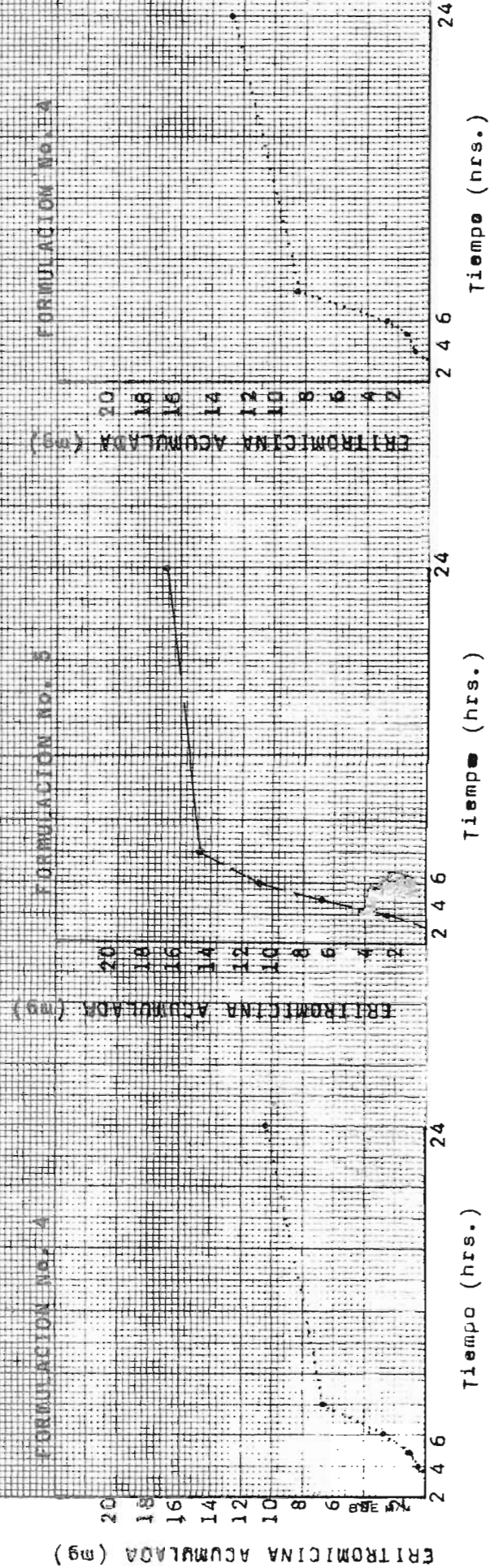
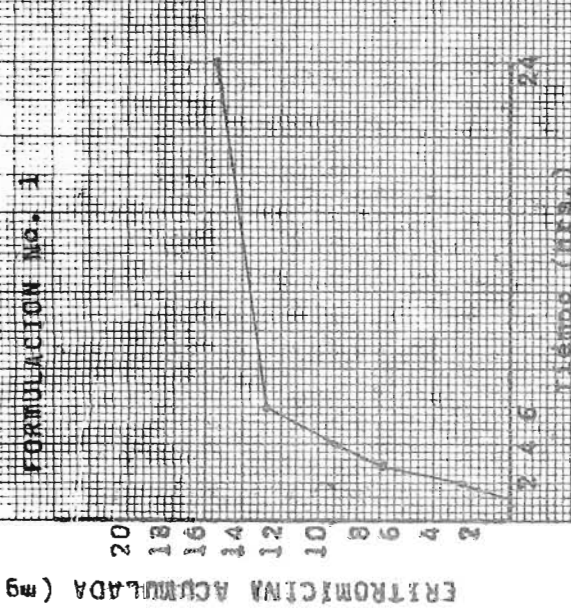
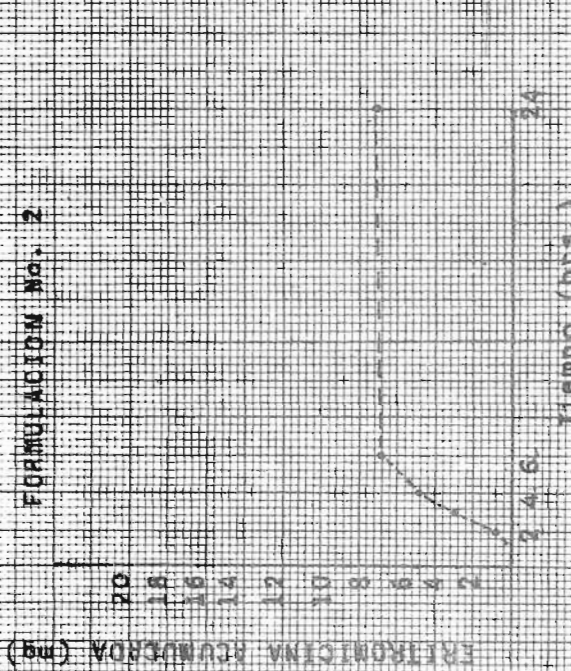
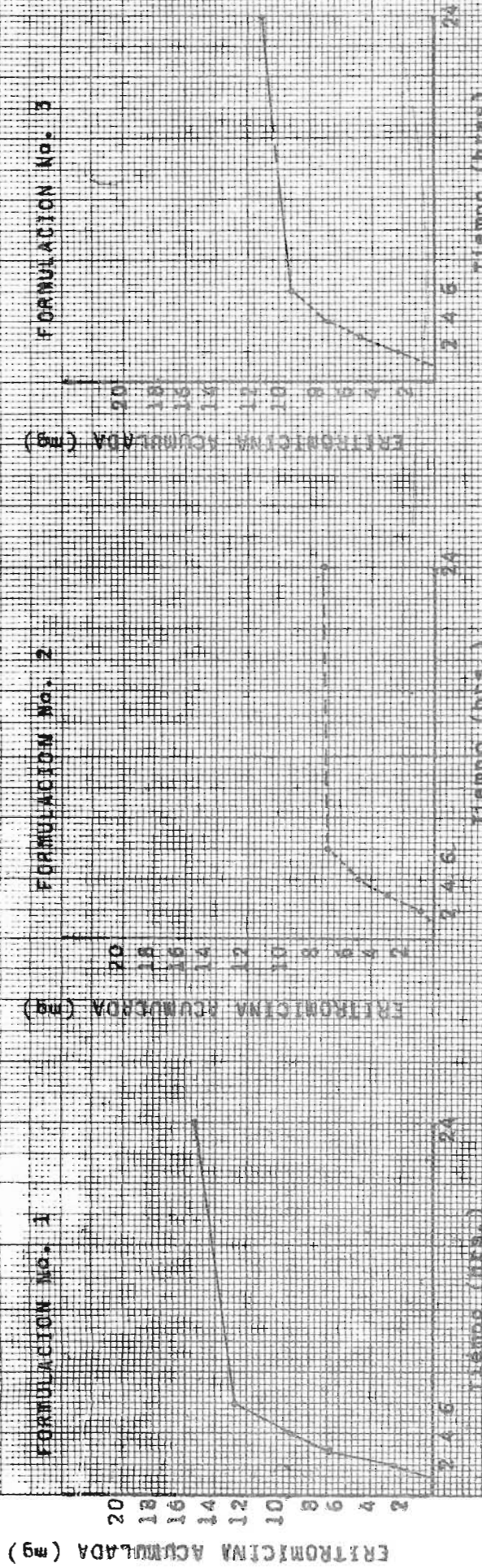
(tiempo hrs.)

Tiempo (hrs.)

(Tiempo hrs)

CURVAS DE ELIMINACION

Sujeto No. 2



CANTIDAD DE ERITROMICINA ACUMULADA EN ORINA

S U J E T O No.3

C O N C E N T R A C I O N mg

<u>Tiempo</u>	<u>Formulación</u>	<u>No.1</u>	<u>No.2</u>	<u>No.3</u>	<u>No.4</u>	<u>No.5</u>	<u>No.5</u>	<u>Formulación</u>
hs	-	-	-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	0.08	0.02	0.01	-	-	0.03	-	-
2	1.82	0.75	0.04	0.02	-	0.24	-	-
3	5.45	3.81	0.36	0.61	-	0.62	-	0.11
4	7.29	6.12	1.05	3.08	-	1.67	-	0.79
6	9.01	7.58	3.12	7.16	-	3.26	-	1.15
24	10.50	9.10	5.62	7.76	-	3.80	-	2.54

CURVAS DE ELIMINACION

Sujeto No. 3

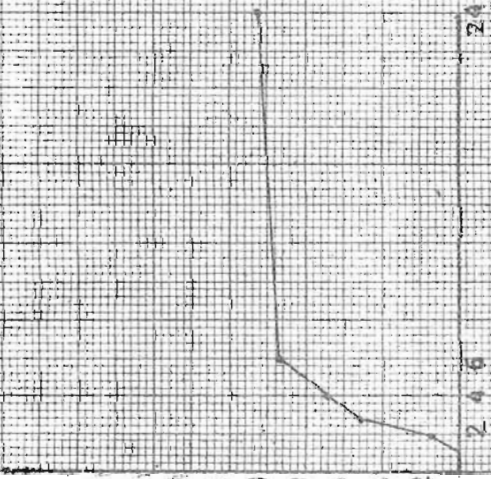
FORMULACION No. 1

FORMULACION No. 2

FORMULACION No. 5

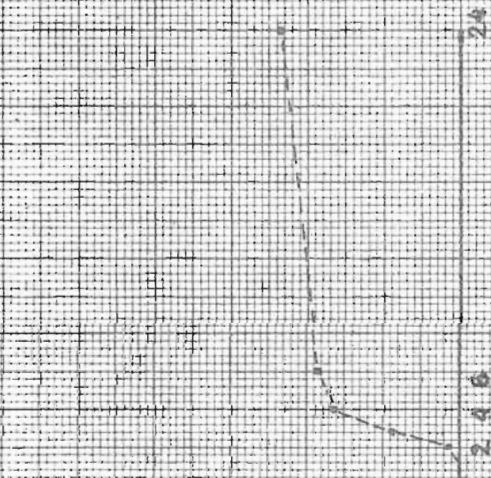
ERITROMICINA ACUMULADA (mg)

18
16
14
12
10
8
6
4
2



ERITROMICINA ACUMULADA (mg)

18
16
14
12
10
8
6
4
2

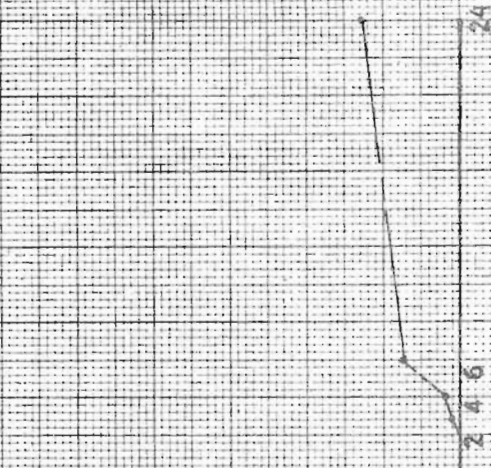


Tiempo (hrs.)

24

ERITROMICINA ACUMULADA (mg)

18
16
14
12
10
8
6
4
2



Tiempo (hrs.)

24

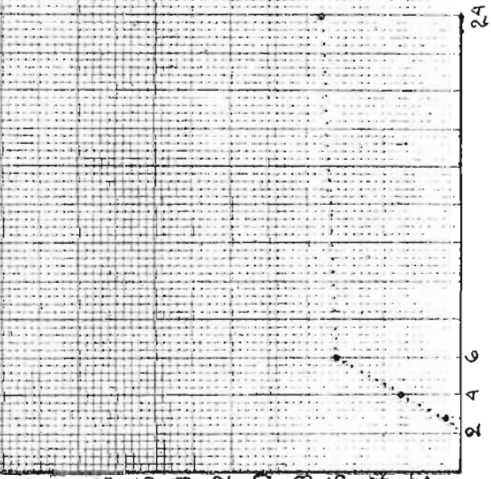
FORMULACION No. 4

FORMULACION No. 5

FORMULACION No. 5

ERITROMICINA ACUMULADA (mg)

18
16
14
12
10
8
6
4
2

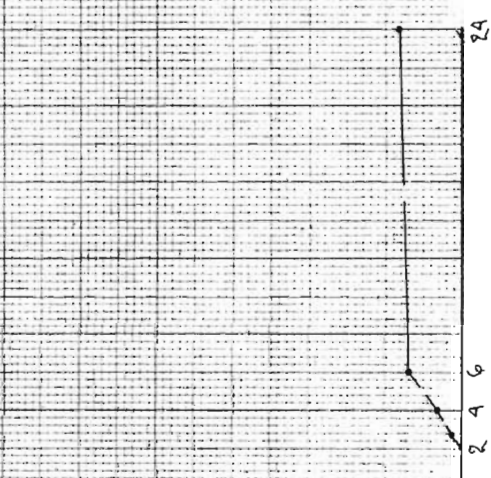


Tiempo (hrs.)

24

ERITROMICINA ACUMULADA (mg)

18
16
14
12
10
8
6
4
2

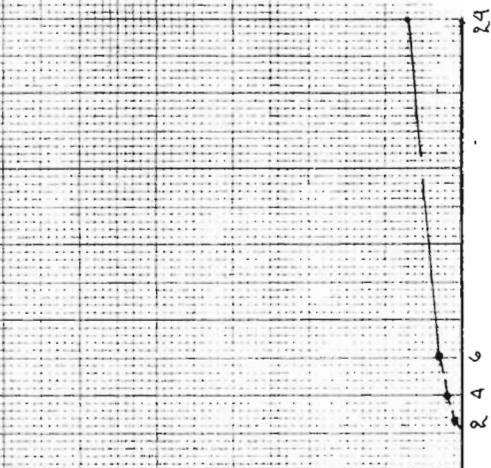


Tiempo (hrs.)

24

ERITROMICINA ACUMULADA (mg)

18
16
14
12
10
8
6
4
2



Tiempo (hrs.)

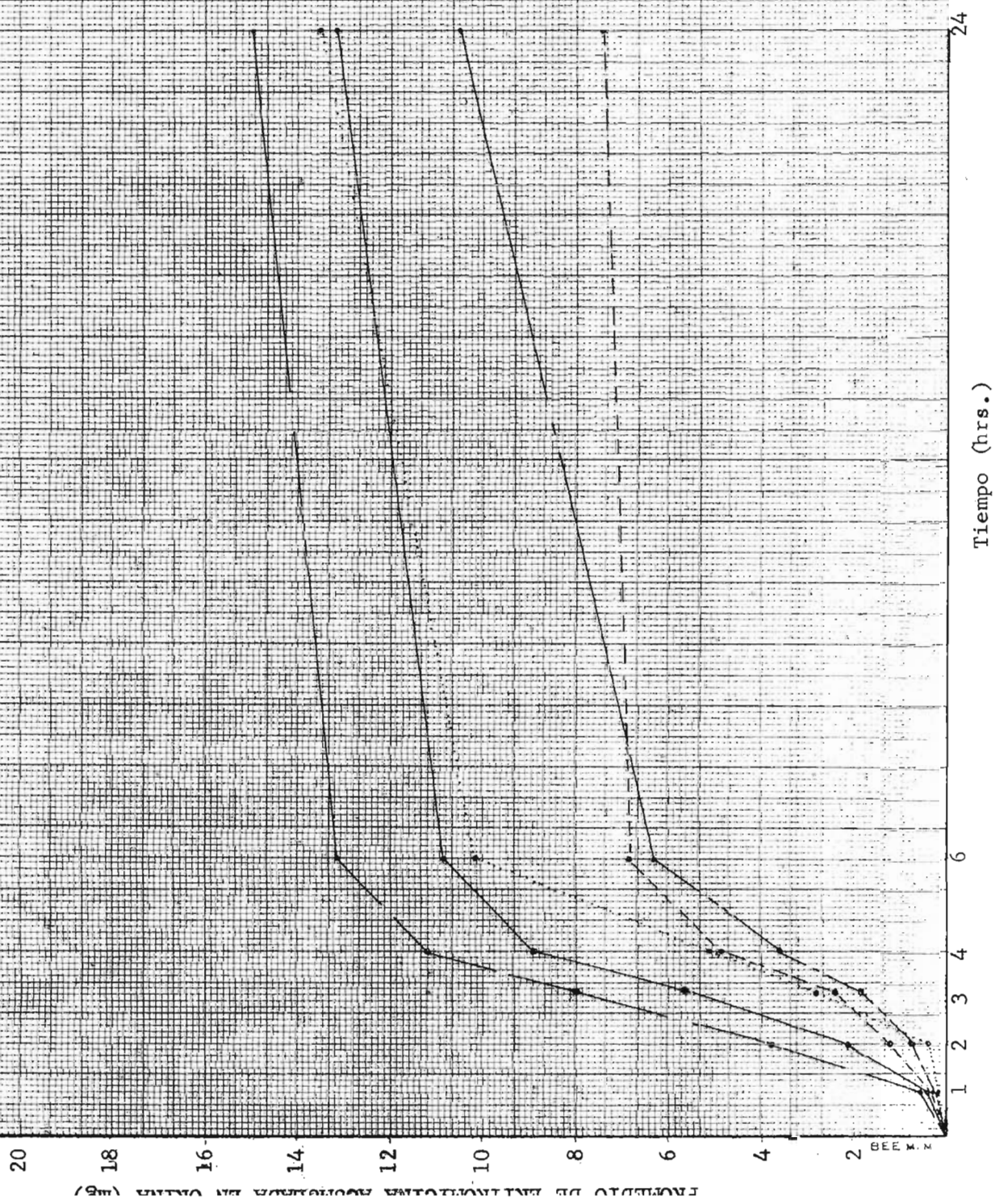
24

CANTIDAD DE ERITROMICINA PROMEDIO ACUMULADA EN ORINA

C O N C E N T R A C I O N mg

<u>Tiempo</u>	<u>Formulación</u>	<u>Formulación</u>	<u>Formulación</u>	<u>Formulación</u>	<u>Formulación</u>
hs.	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
0	-	-	-	-	-
1	0.05	0.02	0.05	0.09	0.41
2	2.26	1.05	0.89	0.63	3.97
3	5.67	2.27	1.92	2.55	8.00
4	8.96	4.88	3.76	5.02	11.15
6	10.83	6.83	6.79	10.02	13.37
24	13.54	7.70	10.17	13.86	15.20

CURVAS PROMEDIO DE EXCRECIÓN



- Formulación 1
- Formulación 2
- Formulación 3
- Formulación 4
- Formulación 5

D I S C U S I O N

Por los resultados obtenidos nos podemos dar cuenta de la diferente --
disposición biológica que tiene cada formulación en determinado sujeto.
Las concentraciones de eritromicina base en sangre en cada una de las
formulaciones estudiadas y la cantidad de antibiótico excretada están --
correlacionadas en la mayoría de las formulaciones.

Los sujetos No. 1 y 2 fueron tomados en cuenta para obtener un valor --
promedio de las diferentes concentraciones de antibióticos encontradas
en sangre y orina.

El sujeto No.3 no fue tomado en cuenta debido a que su capacidad de ab
sorción fue muy baja comparada con los otros dos.

Esto es totalmente válido aún cuando estemos trabajando con tres sujetos
ya que en este tipo de estudios se está considerando al sujeto como "un
reactivo biológico" y en este tipo de reacción el reactivo deberá dar --
respuestas constantes para que sirva como tal.

En este caso el problema no fue únicamente que el sujeto absorbiera menos
que los otros dos, sino que además no se mantenía la relación entre las
diferentes formulaciones y las concentraciones de sangre y orina, es de-
cir, para una formulación que proporcionaba los niveles mas altos en san
gre en las otras dos personas, en la tercera producía las concentracio--
nes más bajas. Analizando las curvas promedio de eritromicina absorbida
y excretada vemos que la formulación No.5 es la que alcanza mayor concen-
tración del antibiótico en sangre. Sin embargo la formulación No.4 es la -
que tiene mayor área bajo la curva de absorción ya que es la que mantiene
niveles mas altos en sangre durante mayor tiempo.

El área obtenida de la absorción de un fármaco teóricamente está directamente relacionada con la cantidad de principio activo acumulado en la orina, esto se demostró en el estudio excepto en la formulación No.4 que fue la que obtuvo la mayor área del antibiótico absorbido y ocupó el 2o. lugar en la mayor cantidad del fármaco excretado, esto puede deberse a factores como:

- a.- Presencia de sustancias con carácter ácido entre los excipientes que retardan la eliminación del antibiótico.
- b.- Errores personales de manipulación.

Dos o más formulaciones pueden considerarse bioequivalentes, si sus curvas de niveles sanguíneos o de excreción urinaria son iguales. El grado de absorción se puede evaluar en términos de área bajo la curva. Si las áreas son iguales aunque las formas de las mismas sean diferentes, los productos son equivalentes en lo que se refiere a la cantidad absorbida a diferentes velocidades. Las velocidades de absorción de varias formulaciones se pueden comparar por la altura de los picos de las curvas de concentración en sangre contra tiempo y el tiempo al cual estos picos aparecen. Si el pico aparece más tarde y es menor, el producto se absorbe más lentamente que el producto de comparación aunque esto no es indicación de si el fármaco se absorbió completamente o no.

Como norma general (aunque varía mucho dependiendo del fármaco que se trate) se considera un límite de 20 a 25% en las diferencias en el área bajo la curva y altura del pico para considerar a dos o más formulaciones equivalentes. Este dato de 20 a 25% no tiene sentido cuando lo aplicamos al tiempo al cual aparece el pico; ya que fácilmente se obtienen

diferencias de 100% o más (por ejemplo 30 min. y h) sin que afecte la bioequivalencia, desde luego y como se mencionó anteriormente depende rá del medicamento de que se trate. En nuestro caso el tiempo al cual aparece el pico máximo no tiene gran importancia.

Por lo anteriormente expuesto podemos decir lo siguiente:

Se puede considerar que las formulaciones estudiadas (1,4 y 5) son -- equivalentes mientras que las otras dos (2 y 3) no cumplen con este - requisito.

La formulación No.4 es la que presenta una mayor área bajo la curva y probablemente sea la que tenga una duración de acción más prolongada a pesar de que el pico es mas bajo y aparece más tarde.

C O N C L U S I O N E S

- 1.- Se desarrollaron métodos sencillos para la determinación de eritromicina en sangre y orina.
- 2.- Se llevaron a cabo los análisis estadísticos adecuados para determinar la precisión y exactitud del método desarrollado en diferentes etapas: materia prima y líquidos biológicos.
- 3.- Se determinó la linealidad del método para asegurarnos que tendríamos resultados confiables aún cuando las concentraciones en sangre fueran muy pequeñas.
- 4.- De acuerdo al análisis efectuado a las cápsulas como producto terminado, las cinco formulaciones cumplen con las normas de calidad establecidas.
- 5.- Por los resultados obtenidos en el estudio de bioequivalencia podemos decir que tres de las formulaciones son bioequivalentes mientras que las otras dos no lo son, usando como límite una diferencia de 20 a 25% en los parámetros medidos .
- 6.- Las formulaciones equivalentes muestran diferencias en la altura del pico, en el tiempo al cual este aparece y en el área bajo la curva. Estas diferencias son debidas probablemente a uno o varios de los siguientes factores:
 - a.- estado físico del estolato de eritromicina
 - b.- excipientes usados en la fabricación de las cápsulas
 - c.- método de fabricación empleado

Desde luego en las formulaciones que no fueron equivalentes estos factores juegan un papel mas importante y se puede decir que se trata de

formulaciones mal desarrolladas.

- 7.- Tal vez hubiera sido conveniente efectuar el estudio con un número mayor de sujetos, sin embargo en este tipo de estudios si se controlan adecuadamente las condiciones del estudio se pueden obtener conclusiones valederas con un número muy reducido de sujetos.
- 8.- No hubo mayor diferencia entre los valores de área determinada por el planímetro y la computadora.
- 9.- Como conclusión final podemos decir que en este momento en que existen en el mercado un gran número de formulaciones diferentes con el mismo principio activo, fabricados por varios laboratorios, se hace necesario el efectuar este tipo de estudios para asegurarnos de que el enfermo tome un medicamento que le proporcionará niveles sanguíneos adecuados durante un determinado tiempo con el propósito de que el principio activo actúe lo más eficientemente posible y que el medicamento cumpla la función para lo cual ha sido creado; curar, -- prevenir, atenuar o diagnosticar una enfermedad.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- DiSanto, A.R. and Chodos, D.J
Basics of Bioavailability.
The Upjohn Company
Kalamazoo, Michigan (1973) ✓ 1975.
L.C.
- 2.- Lachman L. Lieberman H.A. and Kanig. U.L.
The Theory and Practice of Industrial Pharmacy
Lea and Febiger
Philadelphia (1970)
- 3.- Wagner, J.G.
Biopharmaceutics and Relevant Pharmacokinetics
First Edition
The Hamilton Press
Hamilton, Illinois (1971)
- 4.- Am.Pharm. Ass. Academy of Pharmaceutical Sciences
Guidelines for Biopharmaceutical Studies in Man,
Washington, D.C. Feb. (1972)
- 5.- The Bioavailability of Drug Products
American Pharmaceutical Association, (1975)
- 6.- Blacow, N.W.
Martindale. The Extra Pharmacopeia
Twenty sixth Edition
The Pharmaceutical Press
London, (1972)
- 7.- Bentley and Driver's
Textbook of Pharmaceutical Chemistry
Eight Edition
Oxford University Press
New York, Toronto, (1969)
- 8.- Cámara Nacional de la Industria de Laboratorios
Químico-Farmacéuticos
"Fármacos" México. D.F. México, (1973)

- 9.- Kavanag, F.
Analytical microbiology
vol II Third Edition
Academic Press
New York and London, (1972)
- 10.- Grove, D.C. and Randall, W.A.
"Assay Methods of Antibiotics" A Laboratory Manual
Medical Encyclopedia, Inc.
New York
- 11.- Code of Federal Regulations
Title 21 parts 141-599
Washington, (1974)
- 12.- Arret, B. Johnson, D.P. and Kirshbaum, :Journal of
Pharmaceutical Sciences, 60, Nov. 1971