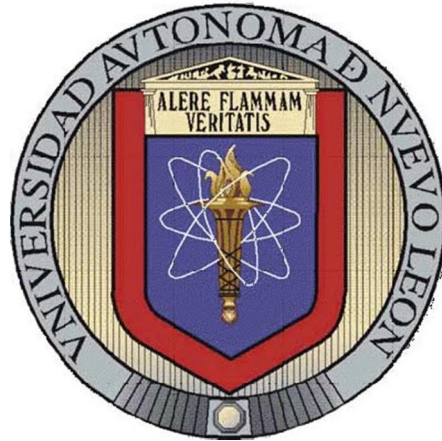


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**BIODISPONIBILIDAD COMPARADA DE TRES PREPARACIONES
FARMACÉUTICAS DE METFORMINA, DOSIS ÚNICA, TABLETAS DE
500mg, TRES PERÍODOS, TRES TRATAMIENTOS, TRES SECUENCIAS,
BAJO CONDICIONES DE AYUNO EN SUJETOS DE INVESTIGACIÓN
SANOS.**

POR:

Q.C.B. SANDRA LUCÍA MONTOYA EGUÍA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACION EN FARMACOLOGÍA Y
TOXICOLOGÍA**

JULIO 2014

DEDICATORIA.

A Dios y a mi madre:

A quiénes debo todo y me han amado más que nadie.

AGRADECIMIENTOS.

Gracias a Dios por todo.

A mis hermanos, por su cariño y apoyo a lo largo de mi vida, a Linda, que siempre la recuerdo y la extraño mucho. A mi padre, Matías Montoya, que me enseñó a ser responsable y perfeccionista en todo lo que hago. Gracias de manera especial a mi madre, María del Carmen Eguía, que me enseñó el valor de la educación, me heredó el gusto por el aprendizaje y la lectura, y sobre todo, me dejó un estándar muy alto sobre lo que debe ser el amor. Gracias a ti, mamita, sé cómo ama Dios.

A mi esposo, que me apoya siempre y es mi mejor amigo.

A mi directora de tesis, Dr. med. Lourdes Garza Ocañas, por todas sus enseñanzas y el apoyo que me ha brindado desde que ingresé al departamento como alumna de servicio social.

A mi Co-director de tesis, el Dr.C. Eduardo Tamez, por su apoyo en la realización de este trabajo y por las enseñanzas compartidas en las clases.

A la comisión de tesis, Dr.C. Teresa Zanatta, Dr.C. Christian Badillo, PhD. Marco Vinicio Gómez, por asesorarme para llevar a cabo el trabajo, por toda su ayuda, y por dejar un gran aprendizaje en mi vida.

Al M.C. Humberto Garza Ulloa, de quien he aprendido mucho a lo largo de este tiempo que he trabajado a su lado en el Área Analítica.

A la M.C. Laura Esther Martínez, porque me impulsó a elegir este departamento para realizar el servicio social, y ahí comenzó esta aventura.

A mis compañeros de posgrado: Diana Castillo, Tatiana Montaña, Jesús Triana y Pedro Sáenz. Somos hermanos de Farmacología y Toxicología, de estrés, de seminarios, de clases, y de tardes en el Sierra Madre.

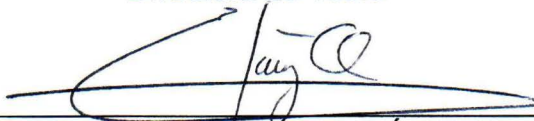
A mis compañeros y amigos: Abraham Díaz, Adriana Ibarra, Arturo Longoria, Gloria Uresti, Gustavo Alviter, Jorge Páez, Laura Escobar, Magaly Martínez, Rosy Martínez, Martha Hernández, Mónica González, René García. Gracias por hacer que estos años de trabajo y aprendizaje fueran también divertidos.

BIODISPONIBILIDAD COMPARADA DE TRES PREPARACIONES FARMACÉUTICAS DE METFORMINA, DOSIS ÚNICA, TABLETAS DE 500 mg, TRES PERÍODOS, TRES TRATAMIENTOS, TRES SECUENCIAS, BAJO CONDICIONES DE AYUNO EN SUJETOS DE INVESTIGACIÓN SANOS.

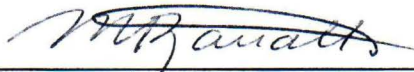
Aprobación de la Tesis:



Dr.med. LOURDES GARZA OCAÑAS
Directora de Tesis



Dr.C. EDUARDO JAVIER TAMÉZ DE LA O
Co-Director de Tesis



Dr.C. MARÍA TERESA ZANATTA CALDERÓN
Comisión de Tesis



Ph.D. MARCO VINICIO GÓMEZ MEZA
Comisión de Tesis



Dr.C. CHRISTIAN TADEO BADILLO CASTAÑEDA
Comisión de Tesis



Dr.med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

**BIODISPONIBILIDAD COMPARADA DE TRES PREPARACIONES
FARMACÉUTICAS DE METFORMINA, DOSIS ÚNICA, TABLETAS DE
500 mg, TRES PERÍODOS, TRES TRATAMIENTOS, TRES
SECUENCIAS, BAJO CONDICIONES DE AYUNO EN SUJETOS DE
INVESTIGACIÓN SANOS.**

Presentado por

Q.C.B. Sandra Lucía Montoya Eguía

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dr.med. Lourdes Garza Ocañas.



Dr.med. Lourdes Garza Ocañas

Directora de Tesis

Sandra Lucía Montoya Eguía

Fecha de Graduación: Julio 2014

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del estudio: BIODISPONIBILIDAD COMPARADA DE TRES PREPARACIONES FARMACÉUTICAS DE METFORMINA, DOSIS ÚNICA, TABLETAS DE 500 mg, TRES PERÍODOS, TRES TRATAMIENTOS, TRES SECUENCIAS, BAJO CONDICIONES DE AYUNO EN SUJETOS DE INVESTIGACIÓN SANOS.

Número de páginas: 178

En México, el consumo de medicamentos genéricos es del 84%, la mayoría de ellos se usan para tratar padecimientos crónicos, como la diabetes mellitus. En la diabetes mellitus tipo 2 la metformina es el tratamiento de primera elección y actualmente existen 34 genéricos de este fármaco en el mercado. Para salir a la venta, un genérico debe demostrar que es bioequivalente con la formulación de patente y por lo tanto intercambiable con ésta, sin embargo, la regulación actual no establece que se deban realizar estudios para comparar la bioequivalencia entre genéricos. El uso de diferentes marcas de medicamentos genéricos por el paciente diabético es común, por lo que la comparación del perfil farmacocinético entre genéricos de metformina es de gran importancia.

Objetivo. Comparar la biodisponibilidad de tres formulaciones de metformina en sujetos de investigación sanos.

Material y Métodos. Se realizó un estudio prospectivo, longitudinal, simple ciego, aleatorizado de biodisponibilidad de metformina tabletas 500 mg, dosis única, en 12 sujetos de investigación. La cuantificación de metformina se realizó por LC-MS-MS con un método previamente validado. Para el cálculo de los parámetros farmacocinéticos (ABC y $C_{m\acute{a}x}$) se utilizó el paquete computacional WinNonlin versión 6.3 y SPSS versión 13. La comparación de los parámetros se hizo mediante el intervalo de confianza clásico y las pruebas de Westlake y de Schuirmann.

Resultados. No se presentaron eventos adversos en ningún sujeto. El ABC y $C_{m\acute{a}x}$ obtenidos para las tres formulaciones evaluadas estuvieron dentro del intervalo de 80–125% establecido para demostrar bioequivalencia.

Conclusión. De acuerdo a los criterios de la NOM-177-SSA1-2013, las formulaciones estudiadas mostraron ser bioequivalentes, lo que indica que los medicamentos genéricos evaluados son intercambiables entre sí, por lo que pueden ser utilizados de manera indistinta en la terapéutica médica.

Dr.med. Lourdes Garza Ocañas

Directora de Tesis

ÍNDICE

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 Desarrollo de un fármaco.	1
1.2 Consentimiento informado	2
1.3 Fases del estudio clínico en el desarrollo de un fármaco.	3
1.4 Comercialización del medicamento nuevo.	6
1.5 Medicamentos genéricos.	6
1.6 Medicamentos de patente – medicamentos genéricos.	7
1.7 Pruebas de bioequivalencia.	8
1.8 Propósito del uso de medicamentos genéricos.	16
1.9 Diabetes mellitus.	18
1.9.1 Diabetes mellitus tipo 2.	20
1.9.2 Metformina.	21
1.10 Antecedentes directos.	23
JUSTIFICACIÓN.	26
OBJETIVO GENERAL.	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	27
2. MATERIAL Y MÉTODOS.	28
2.1 Material.	28
2.1.1 Material general.	28
2.1.2 Equipos.	28
2.1.3 Instrumentos	29
2.1.4 Material de referencia.	29
2.1.5 Reactivos.	29
2.2 Métodos.	30
2.2.1 Tipo de estudio.	30
2.2.2 Selección de sujetos de investigación.	30
2.2.2.1 Criterios de inclusión.	32
2.2.2.2 Criterios de exclusión.	32
2.2.3 Medicamentos del estudio.	34
2.2.4 Obtención de las muestras.	35
2.2.4.1 Duración del tratamiento.	35
2.2.4.2 Etapas del estudio.	35
2.2.4.3 Administración de los medicamentos.	38
2.2.4.4 Muestreo.	38

ÍNDICE

Capítulo	Página
2.2.5 Procedimiento para la determinación de metformina.	40
2.2.5.1 Técnica analítica de medición.	41
2.2.5.2 Preparación de soluciones.	43
2.2.5.3 Procesamiento de muestras.	48
2.2.5.4 Validación del método analítico.	49
2.2.5.5 Análisis de muestras biológicas.	60
2.2.5.6 Control de calidad de la corrida analítica.	60
2.2.5.7 Criterios de reanálisis de muestras biológicas.	63
2.2.6 Análisis farmacocinético y estadístico.	64
3. RESULTADOS.	68
3.1 Variables demográficas de los sujetos.	68
3.2 Signos vitales.	68
3.3 Número de muestras recolectadas.	77
3.4 Desviaciones al protocolo.	77
3.5 Efectos adversos.	77
3.6 Resultados de la validación del método analítico.	78
3.7 Resultados del control de calidad durante la validación del método analítico.	94
3.7.1 Verificación de la adecuabilidad del sistema analítico de medición.	94
3.7.2 Verificación de la curva de calibración.	103
3.8 Resultados del análisis de muestras biológicas.	108
3.9 Resultados del control de calidad durante el análisis de muestras biológicas.	121
3.9.1 Verificación de la adecuabilidad del sistema analítico de medición.	121
3.9.2 Evaluación de la curva de calibración.	127
3.9.3 Evaluación de las muestras de control de calidad.	130

ÍNDICE

Capítulo	Página
3.10 Resultados del análisis estadístico.	134
3.10.1 Estadística descriptiva para las variables demográficas.	134
3.10.2 Estadística descriptiva para las variables de concentración plasmática con respecto al tiempo.	135
3.10.3 Análisis de varianza.	137
3.10.4 Estadística descriptiva para los parámetros farmacocinéticos.	138
3.10.5 Pruebas estadísticas para establecer bioequivalencia.	143
4. DISCUSIÓN.	151
4.1 Validación.	151
4.2 Análisis de muestras biológicas.	156
5. CONCLUSIÓN.	161
6. PERSPECTIVAS	162
BIBLIOGRAFÍA.	163
GLOSARIO.	172

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Gráfica de concentración contra tiempo.

Figura 2. Estructura química de la metformina.

Figura 3. Gráfica de la T.A. Sistólica promedio durante el estudio.

Figura 4. Gráfica de la T.A. Diastólica promedio durante el estudio.

Figura 5. Gráfica del pulso promedio durante el estudio.

Figura 6. Gráfica de la temperatura promedio durante el estudio.

Figura 7. Gráfica de la frecuencia respiratoria promedio durante el estudio.

Figura 8. Carta control de exactitud a nivel bajo de concentración.

Figura 9. Carta control de exactitud a nivel medio de concentración.

Figura 10. Carta control de exactitud a nivel alto de concentración.

Figura 11. Carta control de precisión a nivel bajo de concentración.

Figura 12. Carta control de precisión a nivel medio de concentración.

Figura 13. Carta control de precisión a nivel alto de concentración.

Figura 14. Perfil farmacocinético promedio de metformina \pm error estándar, en escala normal.

Figura 15. Perfil farmacocinético promedio de metformina \pm error estándar, en escala semilogarítmica.

Figura 16. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. Medicamento A, B, C – Sujeto 01.

Figura 17. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. Medicamento A, B, C – Sujeto 02.

Figura 18. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. Medicamento A, B, C – Sujeto 03.

Figura 19. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. Medicamento A, B, C – Sujeto 04.

Figura 20. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. Medicamento A, B, C – Sujeto 05.

Figura 21. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. Medicamento A, B, C – Sujeto 06.

Figura 22. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. Medicamento A, B, C – Sujeto 07.

Figura 23. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. Medicamento A, B, C – Sujeto 08.

Figura 24. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. Medicamento A, B, C – Sujeto 09.

Figura 25. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. Medicamento A, B, C – Sujeto 10.

Figura 26. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. Medicamento A, B, C – Sujeto 11.

Figura 27. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. Medicamento A, B, C – Sujeto 12.

Figura 28. Gráficos de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo para el medicamento A.

Figura 29. Gráficos de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo para el tratamiento B.

Figura 30. Gráficos de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo para el tratamiento C.

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1. Medicamentos utilizados en el estudio.

Tabla 2. Aleatorización de la secuencia de administración.

Tabla 3. Aleatorización de las butacas.

Tabla 4. Aleatorización de los tubos de ensayo en orden del muestreo.

Tabla 5. Condiciones del Cromatógrafo de Líquidos

Tabla 6. Condiciones del Espectrómetro de masas.

Tabla 7a. Soluciones de validación.

Tabla 7b. Soluciones de validación.

Tabla 8. Soluciones preparadas durante el análisis de muestras biológicas.

Tabla 9. Control de calidad de la corrida analítica.

Tabla 10a. Signos vitales tomados pre estudio en la 1ª fase.

Tabla 10b. Signos vitales tomados en la mañana en la 1ª fase del estudio.

Tabla 10c. Signos vitales tomados en la tarde en la 1ª fase del estudio.

Tabla 10d. Signos vitales tomados al egresar de la 1ª fase del estudio.

Tabla 11a. Signos vitales tomados pre estudio en la 2ª fase.

Tabla 11b. Signos vitales tomados en la mañana en la 2ª fase del estudio.

Tabla 11c. Signos vitales tomados en la tarde en la 2ª fase del estudio.

Tabla 11d. Signos vitales tomados al egresar de la 2ª fase del estudio.

Tabla 12a. Signos vitales tomados pre estudio en la 3ª fase.

Tabla 12b. Signos vitales tomados en la mañana en la 3ª fase del estudio.

Tabla 12c. Signos vitales tomados en la tarde en la 3ª fase del estudio.

Tabla 12d. Signos vitales tomados al egresar de la 3ª fase del estudio.

Tabla 13. Selectividad, datos y evaluación.

Tabla 14a. Respuestas obtenidas en blanco adicionado.

Tabla 14b. Respuestas obtenidas para metformina en solución.

Tabla 14c. Factor de matriz normalizado.

Tabla 14d. Resultado y evaluación de los datos obtenidos para el efecto de matriz para métodos por espectrometría de masas.

Tabla 15. Resultado y evaluación de los datos obtenidos para el efecto de acarreo para métodos por espectrometría de masas.

Tabla 16a. Datos obtenidos para la evaluación de repetibilidad para el límite inferior de cuantificación.

Tabla 16b. Resultados y evaluación de repetibilidad para el límite inferior de cuantificación.

Tabla 16c. Datos obtenidos para la evaluación de reproducibilidad para el límite inferior de cuantificación.

Tabla 16d. Resultados y evaluación de reproducibilidad para el límite inferior de cuantificación.

Tabla 17a. Datos obtenidos para la evaluación la curva de calibración.

Tabla 17b. Resultados y evaluación del porcentaje de recuperación para la curva de calibración.

Tabla 17c. Resultados del porcentaje de error absoluto para la curva de calibración.

Tabla 17d. Evaluación del porcentaje de error absoluto para la curva de calibración.

Tabla 17e. Evaluación respecto al porcentaje de réplicas que cumplen con el criterio de aceptación.

Tabla 18a. Datos obtenidos para la evaluación de precisión y exactitud a condiciones de repetibilidad.

Tabla 18b. Resultados y evaluación de precisión a condiciones de repetibilidad.

Tabla 18c. Resultados y evaluación de exactitud a condiciones de repetibilidad.

Tabla 19a. Datos obtenidos para la evaluación de precisión y exactitud a condiciones de reproducibilidad.

Tabla 19b. Resultados y evaluación de precisión a condiciones de reproducibilidad.

Tabla 19c. Resultados y evaluación de exactitud a condiciones reproducibilidad.

Tabla 20a. Datos obtenidos para la evaluación de la estabilidad a corto plazo.

Tabla 20b. Evaluación de exactitud para la referencia de estabilidad a corto plazo.

Tabla 20c. Evaluación de exactitud para las soluciones de prueba de estabilidad a corto plazo.

Tabla 21a. Datos obtenidos para la evaluación de la estabilidad a largo plazo (18 días).

Tabla 21b. Datos obtenidos para la evaluación de la estabilidad a largo plazo (29 días).

Tabla 21c. Evaluación de exactitud para las referencias de estabilidad a largo plazo (18 días).

Tabla 21d. Evaluación de exactitud para las soluciones de prueba de estabilidad a largo plazo (18 días).

Tabla 21e. Evaluación de exactitud para las referencias de estabilidad a largo plazo (29 días).

Tabla 21f. Evaluación de exactitud para las soluciones de prueba de estabilidad a largo plazo (29 días).

Tabla 22a. Datos obtenidos para la evaluación de la estabilidad de la muestra procesada, a las 24 y 72h.

Tabla 22b. Evaluación de exactitud para estabilidad de la muestra procesada, a las 24 y 72h.

Tabla 23a. Datos obtenidos para la evaluación de la estabilidad en el automuestreador hasta las 24h.

Tabla 23b. Evaluación de exactitud para estabilidad en el automuestreador (0h).

Tabla 23c. Evaluación de exactitud para estabilidad en el automuestreador (24h).

Tabla 24a. Datos obtenidos para la evaluación de la estabilidad en función de los ciclos de congelación y descongelación.

Tabla 24b. Evaluación de exactitud para estabilidad en función de los ciclos de congelación y descongelación (1er ciclo).

Tabla 24c. Evaluación de exactitud para estabilidad en función de los ciclos de congelación y descongelación (2º ciclo).

Tabla 24d. Evaluación de exactitud para estabilidad en función de los ciclos de congelación y descongelación (3er ciclo).

Tabla 25a. Datos obtenidos para la evaluación de la estabilidad del analito en solución (23 días).

Tabla 25b. Datos obtenidos para la evaluación de la estabilidad del analito en solución (36 días).

Tabla 25c. Evaluación de exactitud para la estabilidad del analito en solución (23 días).

Tabla 25d. Evaluación de exactitud para la estabilidad del analito en solución (36 días).

Tabla 26a. Datos obtenidos para la evaluación del límite de detección (relación señal/ruido proporcionada por el software del equipo).

Tabla 26b. Evaluación de la relación señal/ruido.

Tabla 27a. Datos obtenidos para solución de verificación de la adecuabilidad del sistema analítico de medición.

Tabla 27b. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-05-08.

Tabla 27c. Evaluación del área del día 2014-05-08.

Tabla 27d. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-05-08.

Tabla 27e. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-05-09.

Tabla 27f. Evaluación del área del día 2014-05-09.

Tabla 27g. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-05-09.

Tabla 27h. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-05-13.

Tabla 27i. Evaluación del área del día 2014-05-13.

Tabla 27j. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-05-13.

Tabla 27k. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-05-16.

Tabla 27l. Evaluación del área del día 2014-05-16.

Tabla 27m. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-05-16.

Tabla 27n. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-05-19.

Tabla 27ñ. Evaluación del área del día 2014-05-19.

Tabla 27o. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-05-19.

Tabla 27p. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-05-20.

Tabla 27q. Evaluación del área del día 2014-05-20.

Tabla 27r. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-05-20.

Tabla 27s. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-05-23.

Tabla 27t. Evaluación del área del día 2014-05-23.

Tabla 27u. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-05-23.

Tabla 27v. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-06-05.

Tabla 27w. Evaluación del área del día 2014-06-05.

Tabla 27x. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-06-05.

Tabla 27y. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-06-06.

Tabla 27z. Evaluación del área del día 2014-06-06.

Tabla 27za. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-06-06.

Tabla 28a. Evaluación de la curva de calibración 2014-05-08.

Tabla 28b. Evaluación de la curva de calibración 2014-05-09.

Tabla 28c. Evaluación de la curva de calibración 2014-05-13.

Tabla 28d. Evaluación de la curva de calibración 2014-05-16.

Tabla 28e. Evaluación de la curva de calibración 2014-05-20.

Tabla 28f. Evaluación de la curva de calibración 2014-05-23(I).

Tabla 28g. Evaluación de la curva de calibración 2014-05-23(II).

Tabla 28h. Evaluación de la curva de calibración 2014-06-05(I).

Tabla 28i. Evaluación de la curva de calibración 2014-06-05(II).

Tabla 29. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina:
Medicamento A, B, y C - Sujeto de investigación 01.

Tabla 30. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina:
Medicamento A, B, y C - Sujeto de investigación 02.

Tabla 31. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina:
Medicamento A, B, y C - Sujeto de investigación 03.

Tabla 32. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina:
Medicamento A, B, y C - Sujeto de investigación 04.

Tabla 33. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina:
Medicamento A, B, y C - Sujeto de investigación 05.

Tabla 34. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina:
Medicamento A, B, y C - Sujeto de investigación 06.

Tabla 35. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina:
Medicamento A, B, y C - Sujeto de investigación 07.

Tabla 36. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina:
Medicamento A, B, y C - Sujeto de investigación 08.

Tabla 37. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina:
Medicamento A, B, y C - Sujeto de investigación 09.

Tabla 38. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina:
Medicamento A, B, y C - Sujeto de investigación 10.

Tabla 39. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina:
Medicamento A, B, y C - Sujeto de investigación 11.

Tabla 40. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina:
Medicamento A, B, y C - Sujeto de investigación 12.

Tabla 41. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina: Medicamento A, B, y C – Promedio de concentraciones.

Tabla 42a. Datos obtenidos para solución de verificación de la adecuabilidad del sistema analítico de medición.

Tabla 42b. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-05-29.

Tabla 42c. Evaluación del área del día 2014-05-29.

Tabla 42d. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-05-29.

Tabla 42e. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-05-30.

Tabla 42f. Evaluación del área del día 2014-05-30.

Tabla 42g. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-05-30.

Tabla 42h. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-06-02.

Tabla 42i. Evaluación del área del día 2014-06-02.

Tabla 42j. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-06-02.

Tabla 42k. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-06-03.

Tabla 42l. Evaluación del área del día 2014-06-03.

Tabla 42m. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-06-03.

Tabla 42n. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-06-04.

Tabla 42ñ. Evaluación del área del día 2014-06-04.

Tabla 42o. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-06-04.

Tabla 42p. Seguimiento de la verificación de la adecuabilidad del sistema analítico de medición.

Tabla 43a. Evaluación de la curva de calibración 2014-05-29.

Tabla 43b. Evaluación de la curva de calibración 2014-05-30.

Tabla 43c. Evaluación de la curva de calibración 2014-06-02.

Tabla 43d. Evaluación de la curva de calibración 2014-06-03.

Tabla 43e. Evaluación de la curva de calibración 2014-06-04.

Tabla 43f. Seguimiento de las curvas de calibración empleadas en el análisis de muestras.

Tabla 44a. Datos obtenidos para las soluciones de control de calidad durante el análisis de muestras.

Tabla 44b. Evaluación de las soluciones de control de calidad en función del número de controles utilizados en relación al número de muestras analizadas.

Tabla 44c. Evaluación de la solución de control de calidad de concentración baja en función del % de error.

Tabla 44d. Evaluación de la solución de control de calidad de concentración media en función del % de error.

Tabla 44e. Evaluación de la solución de control de calidad de concentración alta en función del % de error.

Tabla 45. Estadística descriptiva para las variables demográficas, por género y total.

Tabla 46. Estadísticas descriptivas para las concentraciones plasmáticas de metformina con respecto al tiempo para el medicamento A.

Tabla 47. Estadísticas descriptivas para las concentraciones plasmáticas de metformina con respecto al tiempo para el medicamento B.

Tabla 48. Estadísticas descriptivas para las concentraciones plasmáticas de metformina con respecto al tiempo para el medicamento C.

Tabla 49. Análisis de varianza para pruebas de F secuenciales.

Tabla 50. Análisis de varianza para pruebas de F parciales.

Tabla 51. Estadísticas descriptivas para los parámetros farmacocinéticos de metformina por medicamento (A,B,C).

Tabla 52. Parámetro $T_{m\acute{a}x}$ de metformina, para los medicamentos A y B. Diferencia, cociente y logaritmo natural del cociente.

Tabla 53. Parámetro $C_{m\acute{a}x}$ de metformina, para los medicamentos A y B. Diferencia, cociente y logaritmo natural del cociente.

Tabla 54. Parámetro ABC_{0-t} de metformina, para los medicamentos A y B. Diferencia, cociente y logaritmo natural del cociente.

Tabla 56. Parámetro $T_{m\acute{a}x}$ de metformina, para los medicamentos A y C. Diferencia, cociente y logaritmo natural del cociente.

Tabla 55. Parámetro $ABC_{0-\infty}$ de metformina para los medicamentos A y B. Diferencia, cociente y logaritmo natural del cociente.

Tabla 57. Parámetro $C_{m\acute{a}x}$ de metformina, para los medicamentos A y C.
Diferencia, cociente y logaritmo natural del cociente.

Tabla 58. Parámetro ABC_{0-t} de metformina, para los medicamentos A y C.
Diferencia, cociente y logaritmo natural del cociente.

Tabla 59. Parámetro $ABC_{0-\infty}$ de metformina para los medicamentos A y B.
Diferencia, cociente y logaritmo natural del cociente.

Tabla 60. Intervalos de confianza y pruebas límite para los parámetros farmacocinéticos de metformina transformados logarítmicamente: medicamento A contra medicamento B.

Tabla 61. Intervalos de confianza y pruebas límite para los parámetros farmacocinéticos de metformina transformados logarítmicamente: medicamento A contra medicamento C.

Tabla 62. Intervalos de confianza y pruebas límite para los parámetros farmacocinéticos de metformina transformados logarítmicamente: medicamento B contra medicamento C.

Tabla 63. Intervalos de confianza y pruebas límite para los parámetros farmacocinéticos de metformina transformados logarítmicamente: medicamento C contra medicamento B.

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius.
%	Porcentaje.
<	Menor que.
>	Mayor que.
≤	Menor o igual que.
≥	Mayor o igual que.
ABC	Área bajo la curva.
ABC_{0-∞}	Área bajo la curva desde el tiempo cero al infinito.
ABC_{0-t}	Área bajo la curva desde el tiempo cero al último tiempo de muestreo.
AgsVHB	Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.
ANADEVA	Análisis de varianza.
BIP	Blanco pool.
C_{máx}	Concentración plasmática máxima.
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.
%CV	Porcentaje de coeficiente de variación.
FMN	Factor de matriz normalizado.
h	Hora.
h/mL	Hora por mililitro.
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución.
IC	Intervalo de confianza.
ICH	International Conference on Harmonization

Ke	Constante de eliminación.
kg/m²	Kilogramo por metro cuadrado.
L	Litro.
LS-MS-MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem.
LIC	Límite inferior de cuantificación.
LSC	Límite superior de cuantificación.
MCA	Muestra control de concentración alta (SCC de concentración alta).
MCB	Muestra control de concentración baja (SCC de concentración baja).
MCM	Muestra control de concentración media (SCC de concentración media).
mL	Mililitro.
µL	Microlitro.
ng/mL	Nanogramo por litro.
s	Segundo.
Sa	Solución de analito en matriz limpia utilizada para adición de los extractos de matriz biológica.
SC	Solución de analito en matriz limpia o biológica utilizada para documentar la evaluación del control de la calidad aplicado a una metodología analítica.
SCC	Muestra control adicionada con analito, pre procesamiento.

SD	Dilución de la solución madre en el solvente apropiado.
SEAS	Soluciones en matriz limpia adicionada empleadas para evaluar la estabilidad del analito en solución y preparadas a los niveles limitantes de concentración aplicados a las SC's.
SEML	Matriz limpia sin procesar con adición de analito.
SM	Disolución directa de la sustancia de referencia en el solvente apropiado.
SPH	Matriz biológica hemolizada procesada, sin adición de analito.
SPHa	Matriz biológica hemolizada procesada, con adición de analito post procesamiento.
SPL	Matriz biológica lipémica procesada, sin adición de analito.
SPLa	Matriz biológica lipémica procesada, con adición de analito post procesamiento.
SPN	Matriz biológica normal procesada, sin adición de analito.
SPNa	Matriz biológica normal procesada, con adición de analito post procesamiento.
SPP	Solución de pool de plasma.
SSA	Matriz biológica adicionada individualmente con diversos anticoagulantes y procesada sin adición de analito.

SSF	Matriz biológica adicionada individualmente con diversos fármacos concomitantes, sin adición de analito.
SV	Solución de verificación del sistema analítico de medición
r²	Coefficiente de determinación.
rpm	Revoluciones por minuto.
t_{1/2}	Vida media plasmática.
tmáx	Tiempo máximo.
VDRL	Prueba de utilidad en el diagnóstico de sífilis.
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana.

CAPÍTULO I.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Desarrollo de un fármaco.

El desarrollo de fármacos es el proceso por el cual se traducen los descubrimientos farmacológicos en tratamientos médicos nuevos. El objetivo del desarrollo de fármacos es adquirir y refinar la información necesaria para determinar el riesgo – beneficio de utilizar un nuevo fármaco potencial a manera de tratamiento médico. [1]

El inicio del desarrollo de un medicamento comienza con un descubrimiento, que depende de la comprensión médica de la enfermedad y busca encontrar moléculas que produzcan efectos sobre un modelo preclínico, sobre un blanco enzimático o un receptor deseado. [1]

La nominación de la molécula para desarrollo ocurre en el momento en que ésta prueba tener actividad farmacológica *in vivo* e *in vitro*, cubriendo los estándares rigurosos de especificidad y potencia para el blanco deseado. Para esta molécula, ya se ha establecido la farmacocinética y farmacodinamia, así como las pruebas toxicológicas en animales. Este candidato a fármaco debe poder sintetizarse y escalarse su producción de manera adecuada a un costo razonable, además de contar con estabilidad, solubilidad y biodisponibilidad suficientes para constituirse en un agente farmacéutico. [1]

Cuando el compuesto satisface las pruebas preclínicas realizadas, la industria farmacéutica presenta ante las agencias regulatorias un expediente que describe, de manera detallada, los resultados de los estudios preclínicos. Con este documento se busca obtener la aprobación gubernamental para realizar los ensayos clínicos para el candidato a fármaco.

De ser aprobado por la agencia regulatoria correspondiente, se le asigna al “nuevo fármaco” una aplicación, que autoriza a la compañía farmacéutica, a realizar los estudios clínicos.

El término “nuevo fármaco” se utiliza en las siguientes situaciones:

- a) Cuando se trata de un fármaco que no se ha utilizado en humanos para el tratamiento de enfermedades.
- b) Combinaciones de fármacos ya aprobados.
- c) Fármacos ya aprobados pero que requieren evaluación en otro tipo de enfermedad.
- d) Para una nueva forma de dosificación de un fármaco aprobado previamente. [2]

1.2 Consentimiento informado.

Antes de que un nuevo fármaco pase a las fases de investigación en humanos, la ley establece que los sujetos o sus representantes deben

autorizar su participación en la investigación en un documento conocido como consentimiento informado. [2]

Mediante el consentimiento informado el personal de salud le informa al paciente sobre el procedimiento y el fármaco que se propone utilizar, los riesgos y beneficios que éste conlleva y las posibles alternativas. [3]

La ley señala que se debe ofrecer al participante una respuesta a todas sus preguntas, y comunicarle que tiene la libertad para consentir los estudios o abandonar su participación en cualquier momento. Éstas y otras normas de carácter ético, establecidas en documentos como el Código de Nüremberg, la declaración de Helsinki y la Conferencia Internacional de Armonización rigen actualmente la investigación clínica.[2,4,5]

1.3 Fases del estudio clínico en el desarrollo de un fármaco.

Cuando el nuevo fármaco es autorizado para su investigación en humanos, se inicia el estudio clínico a través de las fases de investigación descritas a continuación: [2]

Fase I. Los estudios son realizados en un pequeño grupo de voluntarios sanos (20-80), por investigadores capaces de evaluar datos

farmacológicos y toxicológicos. Los objetivos principales de esta fase son:

- a) Revisar la seguridad al valorar la presencia de efectos dañinos.
- b) La tolerabilidad al establecer los límites probables de valores de dosis clínicas seguras.
- c) La farmacocinética al valorar la absorción, distribución, metabolismo y excreción del fármaco en estudio.

En la fase I las pruebas no son ciegas, tanto los sujetos en estudio como los investigadores conocen el medicamento que se está administrando.[2]

Fase II. Si en la fase I se obtienen resultados confiables, por primera vez el fármaco es estudiado en pacientes con una enfermedad determinada a tratar. Los estudios de fase II en su mayoría, son estudios experimentales aleatorizados y tienen como propósito valorar la eficacia del fármaco nuevo en la enfermedad para la cual es diseñado. [1]

En esta fase, el fármaco es administrado a un número reducido de pacientes con la enfermedad (20-80). Se realiza una revisión cuidadosa por personal calificado para determinar la eficacia y seguridad del fármaco.

Los estudios de la fase I y II proveen información razonable para discontinuar o continuar con el desarrollo del nuevo fármaco. [1]

Fase III. En esta fase, los ensayos clínicos controlados son conducidos por investigadores calificados que controlan una gran población de

pacientes, con el propósito de obtener datos que sustenten o no la eficacia y la seguridad del nuevo fármaco con respecto a un fármaco de referencia. Más de 150 clínicos pueden participar y supervisarán a más de 1,000 a 3,000 pacientes. [2] Se diseñan estudios doble ciego y cruzado. Estos estudios son difíciles de organizar y extremadamente costosos, duran de 2 a 10 años.

Cuando la industria farmacéutica está convencida de que los datos obtenidos en la fase III justifican aprobar el fármaco como eficaz y seguro para el uso propuesto, solicita una aplicación del nuevo fármaco. El expediente para la aplicación contiene una compilación extensa y detallada de datos preclínicos y clínicos colectados desde el descubrimiento del nuevo fármaco. [2]

Fase IV. La responsabilidad de la industria farmacéutica y de las agencias regulatorias sobre el medicamento aprobado continúa durante todo el periodo de su uso clínico. Esta fase se refiere a la vigilancia continua de la seguridad del nuevo medicamento en las condiciones reales de uso en un gran número de pacientes. La industria farmacéutica debe informar a las agencias regulatorias los efectos colaterales, daños, reacciones alérgicas o tóxicas, y posibles fracasos que ha tenido el nuevo medicamento para ejercer su acción farmacológica esperada. Los datos que brinde la farmacovigilancia, pueden limitar el uso del nuevo medicamento a un grupo de pacientes particulares, o definitivamente retirarlo del mercado.[2]

1.4 Comercialización del medicamento nuevo.

El tiempo que transcurre entre la presentación de una solicitud de patente, y la aprobación para la venta de un medicamento nuevo puede ser hasta de 12 años, y el costo puede ascender de 500 a 1,000 millones de dólares. La patente del fármaco en la mayor parte de los países tiene una vigencia de 20 años, durante los cuales la compañía farmacéutica tiene los derechos sobre la venta del medicamento.

Además de los costos de la investigación, la industria farmacéutica invierte en campañas de comercialización, dando a sus nuevos medicamentos nombres comerciales que se recuerden con facilidad, y apuesta al impacto *postmarketing* que deja el nombre comercial del fármaco en los médicos y consumidores. [2]

1.5 Medicamentos genéricos.

Al expirar la patente del medicamento nuevo, otras compañías que no han invertido en el costo de la investigación son libres para manufacturar el fármaco y venderlo como producto genérico sin pagar regalías al propietario original de la patente. [2]

Los laboratorios productores de medicamentos genéricos solicitan a las agencias regulatorias la aprobación de sus productos para colocarlos en el mercado. Uno de los requisitos para que las agencias regulatorias aprueben la venta de dichos productos, es cumplir con pruebas de bioequivalencia. [2]

1.6 Medicamentos de patente – medicamentos genéricos.

Diferentes publicaciones señalan al medicamento genérico como si fuera una “copia” del medicamento de patente que se vende a menor costo. [10] Sin embargo, sólo los medicamentos que demuestren bioequivalencia, pueden ser considerados equivalentes terapéuticos. [1]

Los medicamentos genéricos contienen el mismo principio activo que los medicamentos de patente, la misma vía de administración, y la misma concentración. Sin embargo, pueden diferir en los excipientes empleados en la elaboración, así como en el tipo de sal del principio activo. [9]

Las farmacopeas de diferentes países establecen que la cantidad de fármaco en una forma farmacéutica disponible para ser absorbida depende de varios factores, entre los que destacan:

- a) Tamaño y forma de las partículas
- b) Método de fabricación
- c) Excipientes usados en la elaboración [9,11]

De igual modo, un mismo medicamento puede presentar variaciones entre sí, ya que la regulación admite variaciones de $\pm 5\%$ de contenido del principio activo en un mismo lote. [9]

Las circunstancias anteriormente citadas pueden ser causa de que se presenten diferencias en la equivalencia de un medicamento genérico con su contraparte de patente.

La acción de los factores que producen variabilidad queda desechada si se demuestra la bioequivalencia entre los medicamentos.

1.7 Pruebas de bioequivalencia.

Las instancias regulatorias en materia de medicamentos solicitan pruebas de bioequivalencia para asegurar la equivalencia terapéutica entre un medicamento de prueba y el medicamento utilizado como referencia. [6]

Se requiere cumplir con pruebas de bioequivalencia para medicamentos de liberación inmediata administrados por vía oral que presenten acción sistémica. Entre los criterios más significativos encontramos los siguientes:

- Medicamentos con índice terapéutico estrecho.
- Propiedades fisicoquímicas desfavorables.
- Medicamentos de liberación sostenida o modificada diseñados para actuar de manera sistémica.
- Mezclas de medicamentos administrados por vía oral diseñados para actuar de manera sistémica. [6]

Diseño de un estudio de bioequivalencia. El diseño básico de un estudio de bioequivalencia está determinado por lo siguiente:

- La pregunta que el investigador busca responder.

- La naturaleza del medicamento de referencia y la forma farmacéutica que se va a probar.
- Disponibilidad de métodos analíticos para la determinación.
- La razón riesgo – beneficio en lo que respecta a las pruebas en seres humanos. [6]

Por lo general, si se busca comparar dos formulaciones, se realiza un diseño cruzado de dos períodos, dos secuencias, con dos fases separadas por un período de lavado adecuado, [6] aproximadamente lo equivalente a siete vidas medias del fármaco que se va a monitorear. [7]

Otras alternativas incluyen el diseño de estudios en paralelo para sustancias con vidas medias demasiado largas o con alta variabilidad.

Criterios de selección de sujetos. Para minimizar las variaciones *inter* en *intra* sujeto, se debe de contar con criterios estandarizados. Los estudios de bioequivalencia se deben realizar, de manera preferente, en adultos sanos, hombres y/o mujeres, dependiendo de los requerimientos del medicamento y los criterios de seguridad. [6]

Condiciones del estudio. Es importante estandarizar y controlar la dieta, la ingesta de fluidos, la postura después de recibir la dosis, ejercicio y tiempos de muestreo, entre otras cosas. [6,7]

Selección de los tiempos de muestreo. El muestreo debe incluir por lo menos tres muestras durante la fase de absorción, tres a cuatro cercanos a la concentración máxima, así como cuatro durante la fase de eliminación. [6]

Parámetros farmacocinéticos. En las pruebas de bioequivalencia se comparan los parámetros farmacocinéticos área bajo la curva, concentración máxima y tiempo máximo de un medicamento genérico, llamado “medicamento de prueba”, contra los parámetros de un medicamento de patente seleccionado y establecido por las instancias regulatorias, al cual se le conoce como “medicamento de referencia”.

Para realizar la comparación, se requiere obtener muestras de un fluido biológico (generalmente sangre) de cada sujeto que participe en la investigación a diferentes tiempos. Las muestras se analizan utilizando un método analítico validado para obtener la concentración del fármaco o metabolito, y así establecer los parámetros farmacocinéticos resultantes de los perfiles de concentración – tiempo (figura 1). [7]

Área bajo la curva. Se obtiene al analizar la biodisponibilidad, que es la proporción de fármaco que se absorbe a la circulación general después de la administración de un medicamento y el tiempo que requiere para hacerlo. [7] Se representa con las gráficas de concentración contra tiempo.

Concentración máxima. Es la concentración máxima de un fármaco que se alcanza en un fluido biológico. [1, 7]

Tiempo máximo. Corresponde al tiempo en que se alcanza la concentración máxima de un fármaco en un fluido biológico. [1, 7]

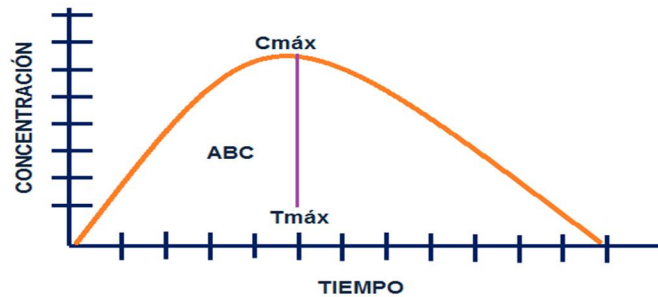


Figura 1. Gráfica de concentración contra tiempo. [1]

Estos parámetros farmacocinéticos deben analizarse mediante procedimientos estadísticos para determinar si el medicamento de prueba y el medicamento de referencia generan resultados estadísticamente equivalentes. [6]

Pruebas estadísticas. Se ha adoptado un esquema para determinar, a partir de los parámetros farmacocinéticos medidos después de la administración de los medicamentos de prueba y de referencia, si las medias poblacionales son similares. Este procedimiento implica el cálculo del intervalo de confianza (IC) para el cociente (o diferencia) de los promedios de las variables farmacocinéticas entre los medicamentos de prueba y de referencia. Los límites del IC para

las medias poblaciones, así como el nivel de confianza, se establecen para determinar la bioequivalencia. [7]

La comparación de interés primaria en estudios de equivalencia es el cociente entre los parámetros promedio del medicamento de referencia y del medicamento de prueba. Utilizando la transformación logarítmica, el modelo estadístico lineal general, en el análisis de datos de equivalencia, es posible realizar una inferencia entre las diferencias de dos medias en escala logarítmica, la cual, cuando es retransformada, se aplica al cociente de los promedios (media o mediana) de la escala original. La transformación logarítmica permite comparar de manera general el cociente en lugar de las diferencias. La distribución de los datos plasmáticos, incluyendo las variables obtenidas (ABC y $C_{m\acute{a}x}$), tienden a ser asimétricas y sus varianzas tienden a incrementarse con el valor de la media. La transformación logarítmica permite corregir ambas situaciones y da lugar a que las varianzas sean independientes de la media, y a que la asimetría desaparezca. Es indistinto el uso de logaritmo natural (base e) o logaritmo base 10, siempre y cuando sea homogéneo en todo el análisis. [7]

Prueba t doble unilateral. Llamada “prueba de Schuirmann”. Se lleva a cabo con los datos obtenidos de la transformación logarítmica de ABC y $C_{m\acute{a}x}$, mediante la construcción de un IC al 90% para el cociente entre los promedios de los medicamentos de prueba y de referencia. [7]

La prueba de Schuirmann señala que dos grupos se consideran equivalentes en una determinada variable si la diferencia entre sus medias se encuentra dentro de los límites de confianza establecidos. Esto significa que cualquier diferencia comprendida entre esos límites se considerará lo bastante pequeña como para que, a efectos prácticos, los grupos sean indistinguibles en la variable analizada.

Schuirmann demostró que es posible llegar a la conclusión de que dos grupos son equivalentes mediante el contraste simultáneo de estas dos hipótesis: [8]

$$\begin{aligned} H_{0(1)}: \mu_{Y1} - \mu_{Y2} \geq \Delta; \quad H_{1(1)}: \mu_{Y1} - \mu_{Y2} < \Delta & \quad (\text{Con } \Delta > 0) \\ H_{0(2)}: \mu_{Y1} - \mu_{Y2} \leq -\Delta; \quad H_{1(2)}: \mu_{Y1} - \mu_{Y2} > -\Delta & \end{aligned}$$

Ambos contrastes son unilaterales y en ambos se utiliza el mismo nivel de significancia α . Estas dos hipótesis están planteadas de tal manera que el rechazo de $H_{0(1)}$ permite afirmar que la diferencia entre las dos medias poblacionales es menor que la cantidad positiva; el rechazo de $H_{0(2)}$ permite afirmar que la diferencia entre las dos medias poblacionales es mayor que la cantidad negativa. [8]

Intervalo de confianza de Westlake. El método consiste en calcular el intervalo de confianza para la diferencia entre las medias poblacionales ($\mu_{Y1} - \mu_{Y2}$) utilizando un nivel de confianza de $1 - 2\alpha$: [8]

$$IC_{\mu_{Y1} - \mu_{Y2}} = \bar{Y}_1 - \bar{Y}_2 \pm t_{gl, 1-2\alpha} \sigma_{\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2} \longrightarrow \begin{cases} L_s = \bar{Y}_1 - \bar{Y}_2 + t_{gl, 1-2\alpha} \sigma_{\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2} \\ L_i = \bar{Y}_1 - \bar{Y}_2 - t_{gl, 1-2\alpha} \sigma_{\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2} \end{cases}$$

Se considera que dos grupos son equivalentes cuando los límites de este intervalo de confianza quedan incluidos dentro de los límites de equivalencia. [8]

Análisis de varianza (ANADEVA). En el ANADEVA deben evaluarse todos los factores que pudieran afectar la conclusión del estudio. [7]

Las fuentes de variación que se deben incluir son:

- a) La secuencia.
- b) El sujeto anidado a la secuencia.
- c) El fármaco.
- d) El período
- e) El error experimental. [7]

En los estudios de bioequivalencia, los valores extremos se definen como aquellos sujetos que presentan valores discordantes en uno o más parámetros farmacocinéticos cuando éstos se comparan con el resto. Los valores extremos más importantes en los parámetros farmacocinéticos son los valores de influencia, donde uno o varios sujetos no sólo

difieren del resto, sino que afectan la conclusión final del estudio. Se pueden aplicar pruebas estadísticas que estén científicamente sustentadas para la detección de valores extremos; la mayoría de ellas parten de calcular el valor absoluto de los residuales estudentizados. [7] Por lo general el criterio utilizado para considerar valores extremos debe ser ± 2 residuales estudentizados, los residuales estudentizados ya sean internos o externos de preferencia deben ser calculados, a partir del modelo estadístico utilizado en el ANADEVVA.

El ANADEVVA debe llevarse a cabo con la transformación logarítmica de las variables farmacocinéticas ABC y $C_{m\acute{a}x}$ o variables equivalentes.[7]

Criterios de equivalencia. Cuando se utiliza el análisis ABC y $C_{m\acute{a}x}$ como criterio de equivalencia, con un IC de 90% para el cociente entre los promedios de los medicamentos de prueba y de referencia, se usa un intervalo de 80 a 125%. [7] Si el ABC y el $C_{m\acute{a}x}$ de dos formulaciones orales se encuentran dentro de estos límites establecidos, se considera que son bioequivalentes. [1]

1.8 Propósito del uso de medicamentos genéricos.

Los medicamentos genéricos son formulaciones que salen al mercado cuando ha expirado la patente de los medicamentos innovadores. El propósito principal de las formulaciones genéricas es reducir el precio de mercado.

A fin de disminuir costos, muchos gobiernos han establecido el uso de medicamentos genéricos en sus programas de salud pública. En consecuencia, las autoridades regulatorias de diversos países, entre ellas la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América (FDA), la Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales (EMA), y la Organización Mundial de la Salud (OMS), han establecido los términos y condiciones bajo los cuáles un medicamento genérico puede ser reconocido como equivalente con su contraparte de patente. [10]

Como estrategia para ampliar la cobertura de protección en materia de salud a la población, el gobierno de México creó el Programa Nacional de Medicamentos Genéricos, con la finalidad primordial de proveer a la población de medicamentos con la misma calidad farmacopéica, seguridad y eficacia que los de patente, pero a menores precios. El cumplimiento de las normas NOM-059-SSA1-2013, NOM-164-SSA1-2013, NOM-177-SSA1-2013, NOM-072-SSA1-2012, NOM-073-SSA1-

2005, garantiza que el medicamento genérico satisface los mismos estándares que el medicamento de referencia. [11]

Para salir al mercado, una formulación genérica debe ser equivalente con la formulación de patente, sin embargo, no se realizan pruebas que aseguren dicha equivalencia *postmarketing* [9,10,12]. Además, la regulación actual no indica si un medicamento genérico puede utilizarse en sustitución de otro genérico, aun cuando ambos hayan mostrado ser bioequivalentes con el medicamento de patente [6].

Demostrar que la biodisponibilidad de diferentes formulaciones genéricas es comparable es de gran importancia, ya que por su menor costo, su uso por la población general se ha incrementado, y en el caso de padecimientos que requieren tratamiento por tiempo prolongado, por ejemplo la diabetes, el uso de diferentes formulaciones de medicamentos genéricos es común.

En México, en el período de 2011 a 2014, el consumo de medicamentos genéricos aumentó del 54 al 84%, de los cuales la mayoría son empleados para tratar padecimientos crónicos, como la *diabetes mellitus*. [13]

1.9 Diabetes mellitus.

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica compleja que requiere tratamiento continuo, así como estrategias de reducción de factores de riesgo. [14]

La Organización Mundial de la Salud señala que existen 371 millones de personas con diabetes en el mundo, cifra que se multiplicará al doble en el año 2030. [15]

Durante las últimas décadas el número de personas que padecen diabetes en México se ha incrementado y actualmente figura entre las primeras causas de muerte en el país, superando al cáncer y problemas cardiovasculares [16]. Los estados con la prevalencia más alta son el Distrito Federal, Nuevo León, Veracruz, Tamaulipas, Durango y San Luis Potosí. [15]

La diabetes se clasifica en cuatro categorías clínicas:

- **Diabetes tipo 1.** Se presenta a causa de la destrucción de las células β del páncreas, y causa deficiencia absoluta de insulina.
- **Diabetes tipo 2.** Se presenta cuando el organismo muestra resistencia a la insulina, que a su vez causa defectos en la secreción de esta hormona conforme avanza la enfermedad.
- **Diabetes gestacional.** Ocurre en el embarazo, y puede llegar a solucionarse después de que éste termine.

- **Otros tipos específicos de diabetes debidos a otras causas**, entre ellas defectos genéticos de función del organismo, defectos genéticos en la molécula de insulina o en su acción, enfermedades del páncreas exocrino, como la fibrosis quística, diabetes secundaria a tratamientos, o diabetes inducida químicamente. [14]

Tratamiento. El tratamiento de la diabetes mellitus tiene como objetivos el aliviar los síntomas relacionados con la hiperglucemia y prevenir o reducir las complicaciones agudas y crónicas. [17]

El tratamiento se divide en farmacológico (que emplea medicamentos) y no farmacológico (basado en la modificación de la dieta y estilo de vida).[17]

Dentro del tratamiento farmacológico, se pueden emplear los siguientes tipos de medicamentos:

- Insulina y sus análogos.
- Secretagogos de insulina e hipoglucemiantes orales.
- Activadores de AMPK y PPAR γ
- Tiazolidinedionas
- Fármacos basados en GLP-1
- Inhibidores de la glucosidasa α
- Inhibidores de DPP-4 [17]

1.9.1 Diabetes mellitus tipo 2.

Es el tipo de diabetes en la que se presenta resistencia a la insulina y en forma concomitante una deficiencia en su producción, puede ser absoluta o relativa. Los pacientes suelen ser mayores de 30 años cuando se hace el diagnóstico, son obesos y presentan relativamente pocos síntomas clásicos. [18]

El presente trabajo se enfocó en la diabetes mellitus tipo 2, debido a que es la forma más común de la diabetes, presente en el 90 – 95% de las personas con este padecimiento. [19]

Tratamiento. El manejo inicial de pacientes con diabetes tipo 2 se hará mediante medidas no farmacológicas, mismas que se deberán mantener durante todo el curso del tratamiento. [19]

Generalmente se agrega el tratamiento farmacológico por vía oral cuando los cambios de estilo de vida han fallado en el control de la glicemia. La primera opción de tratamiento en la diabetes mellitus tipo 2 es la metformina como monoterapia, ya que puede prevenir complicaciones vasculares y reducir la mortalidad, vía el control glucémico, cambios en el peso corporal, en los lípidos, reducción de insulinemia, y de presión arterial diastólica. [20]

1.9.2 Metformina.

Características. La metformina es el único miembro de la clase de las biguanidas disponible hoy en día. El nombre designado por la IPAC para esta molécula es N,N-Diamida Dimetilimidodicarbonimídica. Tiene un peso molecular de 129.2 g/mol, con fórmula molecular $C_4H_{11}N_5$ y número CAS – 657-24-9. Es un polvo blanco altamente higroscópico. Su estructura le confiere alta polaridad, por lo que es muy soluble en agua (1:2) y metanol (1:100). No es soluble en solventes orgánicos. Presenta un pKa de 2.8. [17, 21]

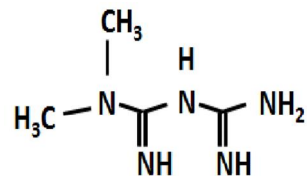


Figura 2. Estructura química de la metformina.

Farmacocinética.

- Absorción. La metformina se absorbe principalmente en el intestino delgado. Es estable, no se une a proteínas plasmáticas.
- Distribución. Tiene una semivida en la circulación de casi 2h. El transporte de metformina en las células es mediado por transportadores de cationes orgánicos.
- Metabolismo y eliminación. La metformina no se metaboliza, y se excreta sin cambio en la orina. [17]

Mecanismo de acción. La metformina se encarga de incrementar la actividad de la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK). Cuando AMPK es activada, estimula la oxidación de ácidos grasos, la captación de glucosa y el metabolismo no oxidativo y reduce la lipogénesis y la gluconeogénesis. El resultado neto de esas acciones es el incremento en el almacenamiento de glucógeno hepático. [17]

Usos terapéuticos y dosificación. La monoterapia con metformina es el tratamiento de elección para iniciar en casos de diabetes mellitus tipo 2.[20]

La metformina se encuentra disponible como producto de liberación inmediata y de liberación sostenida. Existen presentaciones de 500, 850, y 1,000 miligramos. La dosis recomendada es de 500 – 1,000mg cada 12 horas, con una dosis máxima de 2,250mg. Las presentaciones de liberación sostenida se administran una vez al día, con una dosis máxima de 2,000 miligramos. [17]

Reacciones adversas. La mayor parte de las reacciones adversas causadas por metformina son gastrointestinales, como náusea, vómito, distensión abdominal, diarrea y flatulencia. También pueden presentarse, en menor grado, dolor de pecho, palpitaciones, debilidad muscular, cefalea, mareo, escalofríos, erupción cutánea, hipoglicemia. [22]

Genéricos de metformina. Existen en el mercado diversas presentaciones de metformina, ya sea como monofármaco, o combinada con otros medicamentos para el tratamiento de la diabetes mellitus. Tan sólo en el período de 2001 a 2013, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios aprobó 34 genéricos de metformina como monofármaco para el tratamiento de la diabetes mellitus. [13]

Debido a factores como el precio y la disponibilidad, los usuarios de este medicamento utilizan sin distinción el medicamento de patente, un genérico u otro, cambiando constantemente. [9] Como antes se ha mencionado, la regulación en materia de medicamentos establece que para que un genérico salga al mercado debe ser bioequivalente con el medicamento de referencia, sin embargo, no se cuenta información sobre si un medicamento genérico puede utilizarse en sustitución de otro genérico, aun cuando ambos hayan mostrado ser bioequivalentes con el medicamento de patente. [12]

1.10 Antecedentes directos.

La controversia en cuanto si los medicamentos genéricos son intercambiables entre sí ha llevado al interés de la comunidad científica alrededor del mundo y existen varios reportes relacionados con la comparación de la biodisponibilidad de varios medicamentos genéricos.

Gogtay y colaboradores [23] evaluaron diferentes formulaciones de fenitoína sódica en voluntarios sanos en la India, y obtuvieron como resultado que eran bioequivalentes entre ellas, por lo que recomendaron no realizar cambios de un medicamento de patente por un genérico, ni de un genérico por otro, una vez que se ha comenzado el tratamiento con un medicamento específico.

Del Tacca y colaboradores [10] demostraron la falta de equivalencia entre tres formulaciones de amoxicilina presentes en el mercado italiano, en un estudio realizado en voluntarios sanos para probar medicamentos postmarketing.

En un estudio realizado en Egipto por El-Sayed y colaboradores [24] se evaluó la calidad de diferentes formulaciones de omeprazol comercializadas en dicho país. Se obtuvo como resultado diferencias entre los medicamentos probados, así como cambios en la apariencia de las cápsulas debido al almacenamiento.

Parvez y colaboradores [25] compararon la biodisponibilidad de tres formulaciones orales de teofilina de liberación prolongada, en voluntarios sanos de la India. Este trabajo demostró que los genéricos probados no eran equivalentes con el medicamento de patente.

Por lo anterior y considerando que existen 34 genéricos de metformina para el tratamiento de la diabetes mellitus y que los pacientes suelen cambiar uno por otro en su tratamiento se planteó el siguiente trabajo.

JUSTIFICACIÓN.

La monoterapia con metformina es el tratamiento de primera elección en la diabetes mellitus tipo 2.

Dado el bajo costo y la disponibilidad en el mercado de diferentes formulaciones genéricas, la sustitución de metformina de patente por genéricos es un suceso común. El cambio de un genérico por otro es también una práctica frecuente entre los pacientes.

Un medicamento genérico es intercambiable con el de patente, sin embargo, no existe información relacionada con la intercambiabilidad de un genérico por otro.

El uso de medicamentos genéricos no bioequivalentes entre sí puede llevar a alteración en el control de los niveles de glucosa del paciente, por lo tanto, la comparación del perfil farmacocinético entre genéricos de metformina es de gran importancia.

OBJETIVO GENERAL.

Comparar la biodisponibilidad de tres formulaciones de metformina en sujetos de investigación sanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Validar el procedimiento analítico para la cuantificación de metformina.
2. Cuantificar la metformina en muestras sanguíneas obtenidas de sujetos de investigación sanos que recibieron los medicamentos.
3. Obtener y comparar el perfil farmacocinético (ABC y $C_{m\acute{a}x}$) de las formulaciones de metformina evaluadas.

CAPÍTULO II.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Material general.

- Puntillas para pipetas automáticas de 1000 μ L, Corning
- Tubos de 2mL, Eppendorf
- Viales de vidrio ámbar de 2mL con tapas de rosca, Agilent
- Insertos de vidrio de fondo plano de 400 μ L, Agilent
- Septas de hule/teflón, Agilent
- Membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno) con tamaño de poro de 0.45 μ m, Millipore
- Columna ZORBAX HILIC Plus Rapid Resolution, 4.6 x 100mm, 3.5 μ m, Agilent

2.1.2 Equipos.

- Sistema de filtración, Millipore
- Vórtex, IKA
- Centrífuga, Beckman
- Microcentrífuga, Eppendorf
- Refrigerador, General Electric
- Turbo Vap LV, Zymark

- Ultracongelador, Revco
- Agitador multitubos VX-2500, VWR

2.1.3 Instrumentos.

- Balanza analítica, Mettler Toledo AB204
- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución acoplado con Espectrometría de Masas, Agilent 1100, LC/MS/MS (3Q)
- Pipetas automáticas 1000µL, Eppendorf

2.1.4 Material de referencia.

- Clorhidrato de metformina, estándar primario, USP, lote J0L465

2.1.5 Reactivos

- Agua bidestilada, Laboratorios Monterrey
- Acetonitrilo grado HPLC, Tedia
- Ácido fórmico, Fermont
- Metanol grado HPLC, Fermont

2.2. Métodos.

2.2.1 Tipo de estudio.

El estudio fue prospectivo, longitudinal, simple ciego, aleatorizado de biodisponibilidad de metformina tabletas, de dosis única de 500 mg, con tres tratamientos, tres períodos, tres secuencias, cruzado, bajo condiciones de ayuno, con un período de eliminación del fármaco (lavado) de 7 días y con un número de 12 sujetos de investigación de ambos géneros.

2.2.2 Selección de sujetos de investigación.

Se seleccionaron 12 sujetos de investigación sanos de ambos géneros, de acuerdo a los criterios establecidos por la NOM-177-SSA1-2013.

Se invitó a la población en general y a estudiantes de la Universidad Autónoma de Nuevo León a participar como sujetos de investigación. Los candidatos fueron inscritos en una lista con domicilios y teléfonos.

Los sujetos preseleccionados fueron citados de manera individual para explicarles las características y objetivos del estudio de biodisponibilidad de metformina y de la toma de muestra, así como los posibles efectos adversos del medicamento y se les solicitó firmar el consentimiento informado.

Después de la información y de la firma del consentimiento informado, se les realizó una historia clínica y se les tomaron muestras de sangre y orina para exámenes de laboratorio. [7]

Los estudios de laboratorio y gabinete que se efectuaron para la inclusión o exclusión de los sujetos de investigación fueron los siguientes:

- Hematología (hemoglobina, hematocrito, cuenta total de glóbulos blancos con diferencial y cuenta de plaquetas).
- Química sanguínea de 24 elementos.
- Marcadores para hepatitis B.
- Marcadores para hepatitis C.
- Detección de VIH.
- Prueba VDRL.
- Examen general de orina.
- Pruebas de abuso de drogas (cocaína, marihuana y anfetaminas).
- Prueba de embarazo.
- Radiografía de tórax.
- Electrocardiograma.

Los límites de variación permitidos dentro de la normalidad para los valores de laboratorio fueron de +/- 10% el intervalo de lo normal.

2.2.2.1 Criterios de inclusión.

Los criterios de inclusión, estipulados en la NOM-177-SSA1-2013, fueron los siguientes:

- Sujetos sanos, de ambos géneros, con edades entre 18 y 40 años.
- Sujetos sin antecedentes alérgicos a cualquier sustancia.
- Sujetos cuyo índice de masa corporal (IMC) sea de 18.0 a 27.0 kg/m², inclusive. El IMC se calcula del peso en kg dividido entre el cuadrado de la medición de la estatura en metros.
- Sujetos con un buen estado de salud determinado por los resultados de una historia clínica completa, electrocardiograma y radiografía de tórax y la integración de los resultados de los análisis clínicos, realizados en un laboratorio clínico certificado.
- Sujetos con resultados de las pruebas inmunológicas (Anti-VIH, Anti-hepatitis B, Anti-hepatitis C, VDRL, de embarazo, en caso de mujeres, y de drogas de abuso) negativos.

2.2.2.1 Criterios de exclusión.

Los criterios de exclusión, estipulados en la NOM-177-SSA1-2013, fueron los siguientes:

- Sujetos con alguna alteración en los signos vitales registrados durante la selección.
- Sujetos que no cumplieron los criterios de inclusión propuestos.

- Sujetos con antecedentes de hepatitis.
- Sujetos con enfermedad concurrente o intercurrente.
- Sujetos que hayan estado expuestos a fármacos conocidos como inductores o inhibidores enzimáticos hepáticos o que hayan tomado medicamentos potencialmente tóxicos dentro de los 30 días previos al inicio del estudio.
- Sujetos que hayan recibido cualquier medicamento durante 7 días previos al inicio del estudio.
- Sujetos que hayan sido hospitalizados por cualquier problema durante los tres meses previos al inicio del estudio.
- Sujetos que hayan recibido fármacos en investigación dentro de los 60 días previos al estudio.
- Sujetos alérgicos a cualquier medicamento.
- Sujetos que hayan ingerido alcohol o bebidas que contengan xantinas, o que hayan ingerido alimentos asados al carbón o jugo de toronja, dentro de las 48 horas previas al inicio del período de internamiento, o sujetos que hayan fumado tabaco dentro de las 48 horas previas al inicio del estudio.
- Sujetos que hayan donado o perdido 450mL o más de sangre dentro de los 60 días previos al inicio del estudio.
- Sujetos con antecedentes de abuso de drogas y alcoholismo.
- Sujetos con resultados positivos a la prueba de abuso de drogas.
- Mujeres con resultados positivos para la prueba de embarazo.

Después de la firma del consentimiento informado y de la evaluación clínica, así como de pruebas de laboratorio y de gabinete con resultados satisfactorios, se seleccionaron 12 sujetos sanos, 7 eran del sexo femenino y 5 del sexo masculino. La edad promedio de los sujetos de investigación fue de 24 años, con peso promedio de 62 kg, talla promedio de 1.65 m, y un índice de masa corporal con media de 23 kg/m².

A todos los sujetos se les citó con antelación para la entrega de indicaciones previas por escrito. El estudio se inició con 12 sujetos de investigación y todos concluyeron todos los períodos.

2.2.3 Medicamentos del estudio.

Los medicamentos utilizados en este estudio se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Medicamentos utilizados en el estudio.

MEDICAMENTO A	MEDICAMENTO B	MEDICAMENTO C
Fabricante: Merck, S.A. de C.V.	Fabricante: Laboratorios Silanes, S.A. de C.V.	Fabricante: Siegfried Rhein, S.A. de C.V.
Denominación común internacional: Metformina	Denominación común internacional: Metformina	Denominación común internacional: Metformina
Nombre comercial: Dabex®	Nombre comercial: Pre-Dial®	Nombre comercial: Dimefor®
Forma farmacéutica: Tableta	Forma farmacéutica: Tableta	Forma farmacéutica: Tableta
Cada tableta contiene el Fórmula: equivalente a 500 mg de metformina	Cada tableta contiene el Fórmula: equivalente a 500 mg de metformina	Cada tableta contiene el Fórmula: equivalente a 500 mg de metformina
Dosis: 500 mg	Dosis: 500 mg	Dosis: 500 mg
Lote: M33801	Lote: 13LI07VI	Lote: 310507
Fecha de caducidad: Junio de 2017	Fecha de caducidad: Noviembre de 2015	Fecha de caducidad: Septiembre de 2015

2.2.4 Obtención de las muestras.

Para la obtención de muestras, se realizó un protocolo para la realizar las pruebas de biodisponibilidad comparada de tres preparaciones farmacéuticas de metformina a dosis única de 500 mg, tres períodos, tres tratamientos, tres secuencias, bajo condiciones de ayuno en sujetos de investigación sanos, y se sometió a la aprobación del Comité de Ética Institucional.

2.2.4.1 Duración del tratamiento.

Se llevaron a cabo tres períodos de estudio, en los cuales se administró a los sujetos de investigación la formulación correspondiente a la dosis establecida de acuerdo a la distribución al azar para cada período, y se colocó en vasos previamente etiquetados.

El tratamiento consistió en una dosis única de 500 mg por vía oral en cada período, con una semana de lavado para la eliminación de dosis anteriores.

2.2.4.2 Etapas del estudio.

Etapas pre experimental. En esta etapa se llevó a cabo la aleatorización de los sujetos de investigación, a fin de formar tres grupos o secuencias

de administración de medicamentos A, B, y C, así como la de asignación a las unidades experimentales (butacas) y las de los tubos de ensayo por orden de muestreo, como se muestra en las tablas 2, 3 y 4.

Tabla 2. Aleatorización de la secuencia de administración.

SECUENCIA	SUJETO DE INVESTIGACIÓN
ACB	01
BAC	02
BAC	03
ACB	04
ACB	05
CBA	06
CBA	07
ACB	08
CBA	09
BAC	10
BAC	11
CBA	12

Tabla 3. Aleatorización de las butacas.

BUTACA	SUJETO DE INVESTIGACIÓN
10	01
04	02
05	03
08	04
09	05
07	06
06	07
03	08
02	09
12	10
11	11
01	12

Tabla 4. Aleatorización de los tubos de ensayo en orden del muestreo.

ORDEN DE MUESTREO	TUBO DE ENSAYO
01	04
02	03
03	11
04	08
05	01
06	15
07	12
08	14
09	02
10	09
11	05
12	10
13	07
14	13
15	06

Una vez que los sujetos fueron seleccionados, enlistados y asignados aleatoriamente, se les asignó una clave para formar la base de datos del análisis estadístico. Esta clave constó de la letra inicial de la palabra sujeto (S), seguida de dos dígitos, los cuales comprendieron el número progresivo previamente asignado a cada sujeto en el área de reclutamiento, enseguida de las letras A, B o C, según el orden de administración de medicamentos.

Cada tubo de ensayo contó con una clave única, conformada con la clave del sujeto para cada período, más el número que le correspondiente según el sorteo de los tubos de ensayo para la toma de muestras.

Etapla experimental. Primer período: Por lo menos 72 horas antes de la fecha del estudio, el sujeto de investigación recibió por escrito la citatoria correspondiente, donde se estableció el lugar, día y hora del inicio del estudio; así como las indicaciones para las 48 horas previas al estudio:

- No fumar (de manera pasiva, ya que no eran fumadores).
- No consumir bebidas alcohólicas, ni bebidas con xantinas.
- No consumir jugo natural de toronja.
- No consumir alimentos preparados al carbón.
- No usar ningún otro medicamento.

Los sujetos de investigación fueron recibidos en la Unidad Clínica del Departamento de Farmacología y Toxicología, y se les realizó un interrogatorio sobre el cumplimiento de las indicaciones recibidas 72 horas antes. La información fue registrada.

Posteriormente se obtuvieron muestras de orina de cada sujeto, a las que se les realizaron exámenes antidoping y prueba de embarazo (en el caso de mujeres).

Para la toma de muestras de sangre venosa de los voluntarios se les colocó un catéter (infracat®) calibre 20, en una vena de la flexura del codo.

2.2.4.3 Administración de los medicamentos.

Después de haber obtenido la muestra (5mL) del tiempo cero (predosis), se administró por vía oral la metformina (A, B o C, según la aleatorización previa) a dosis de 500 mg. En todos los casos el medicamento se administró con 250mL de solución glucosada 20% v/v. Los sujetos contaban con 10 horas de ayuno previo a la administración del fármaco.[26]

2.2.4.4 Muestreo.

Además de la muestra obtenida del tiempo cero (predosis) se tomaron 14 muestras más a los siguientes tiempos: 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 6, 8, 12, y 16 horas. Las muestras se recolectaron en tubos de vidrio con citrato de sodio como anticoagulante. [27-29]

A partir de cuatro horas después de la administración de metformina, a los sujetos de investigación se les proporcionó el desayuno, a las seis horas se les proporcionó la comida, y a las doce horas la cena.

Se tomaron los signos vitales al ingreso del sujeto de investigación (día previo al estudio) y en tres ocasiones más: antes de la administración de metformina, a la mitad del estudio y previo a su egreso.

El primer período se dio por terminado una hora después de la última toma de sangre (17 horas después de la administración de metformina).

El segundo y tercer período se llevaron a cabo siguiendo el mismo procedimiento y condiciones del primer período, tomando en cuenta la secuencia obtenida en la aleatorización.

Etapas post experimentales. Todos los sujetos fueron entrevistados una semana después de cada período. En estas entrevistas se interrogó al sujeto de investigación sobre posibles efectos colaterales de aparición tardía. La información recabada se registró en sus respectivos expedientes.

Almacenamiento de las muestras obtenidas. Las muestras se almacenaron a una temperatura menor a -20°C en un ultracongelador, durante un período no mayor al tiempo de estabilidad criogénica definido durante la validación del método analítico, con el fin de preservar inalterado los compuestos a analizar durante el almacenamiento previo al período de análisis.

Durante el período de recepción de muestras y registro de las mismas, se depositaron en hielo seco a una temperatura menor a -20°C . La temperatura fue monitoreada diariamente durante todo el período de

almacenamiento de muestras, y se registró en una bitácora especial para ello.

Destrucción de las muestras no utilizadas. Todas las muestras biológicas que no fueron requeridas para otros procedimientos analíticos transcurrido el tiempo de análisis, se almacenaron en una trampa colectora para su manejo adecuado por una empresa especializada contratada para este fin.

2.2.5 Procedimiento para la determinación de metformina.

La determinación de metformina en plasma humano se realizó para establecer la biodisponibilidad de cada una de las formulaciones con las que se trabajó en el presente estudio.

El método analítico para la cuantificación plasmática de metformina está basado en los métodos publicados por Kandhwal K. *et al.* [30] y Harahap Y. *et al.* [31], con modificaciones realizadas en el Departamento de Farmacología y Toxicología. La técnica de tratamiento de muestra se basa en la precipitación de proteínas con acetonitrilo, y una posterior separación por Cromatografía Líquida (HPLC) de interacciones hidrofóbicas con detección por espectrometría de masas (LC-MS-MS).

2.2.5.1 Técnica analítica de medición.

Cromatografía. La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos que facilitan la separación, identificación y determinación de componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas. [32]

En todas las separaciones cromatográficas la muestra se disuelve con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido, o un fluido súper crítico; la cual se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible fija en una columna o una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen en grados distintos entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven con mucha lentitud con el flujo de la fase móvil. En cambio, los componentes unidos de manera débil a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de las distintas velocidades de migración, los componentes de la muestra se separan, y se pueden analizar en forma cualitativa y cuantitativa. [32]

Se pueden enlistar tres categorías generales de cromatografía:

- Cromatografía de líquidos.
- Cromatografía de gases.
- Cromatografía de fluidos súper críticos.

En el presente trabajo se llevó a cabo la determinación de metformina a través de cromatografía de líquidos, ya que presenta una sensibilidad adecuada, puede ser automatizada, y cuenta con capacidad para separar compuestos no volátiles o termolábiles. [32]

Se trabajó con espectrometría de masas en tándem con ionización por electroaspersión como sistema de detección (sistema cuadrupolar triple), ya que permite un análisis cuantitativo exacto, mayor sensibilidad y especificidad respecto a otros detectores, así como la obtención de cromatogramas en tiempo real. [32]

En las siguientes tablas se muestran las condiciones instrumentales de trabajo establecidas.

Tabla 5. Condiciones del Cromatógrafo de líquidos.

CONDICIONES DEL CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS
Columna: ZORBAX HILIC Plus Rapid Resolution, 4.6 x 100 mm, 3.5 μ m
Temperatura de columna: 25°C
Temperatura de automuestreador: 15°C
Volumen de inyección: 1 μ L
Fase móvil: acetonitrilo / ácido fórmico 0.1% (40/60 % v/v)
Flujo: 0.8 mL/minuto
Tiempo de análisis: 3.0 minutos

Tabla 6. Condiciones del Espectrómetro de masas.

CONDICIONES DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS	
CONDICIONES DE ADQUISICIÓN	CONDICIONES DE LA FUENTE
Ión precursor: 130.2 m/z Ión producto: 60.1 m/z Dwell: 200 Energía de fragmentación: 100 V Energía de colisión: 10 V Polaridad: Positiva	Modo de ionización: ESI Temperatura del gas secante: 300°C Flujo del gas secante: 13L/minuto Presión del nebulizador: 40 psi Voltaje del capilar positivo: 4,000 V Voltaje del capilar negativo: 4,000 V

2.2.5.2 Preparación de soluciones.

A partir del clorhidrato de metformina (material de referencia) se preparó la solución madre en metanol, y a partir de ella las soluciones de calidad, tanto en matriz biológica (pool de plasma) como no biológica (fase móvil).

Fase móvil. La composición de la fase móvil (acetonitrilo - ácido fórmico 0.1% v/v) utilizada durante el análisis cromatográfico se preparó automáticamente por el HPLC, a partir de sus componentes individuales. Para preparar el ácido fórmico al 0.1% v/v, se tomó 1mL de ácido fórmico con pipeta automática, se mezcló con 200mL de agua bidestilada, y posteriormente, se aforó a 1L, se filtró a través de una membrana de PVDF de 0.45µm de tamaño de poro, se transfirió la solución a un frasco y éste se colocó en la charola para solventes del HPLC. El acetonitrilo se transfirió directamente de su envase comercial a un frasco, y éste se colocó en la charola para solventes del HPLC.

Soluciones en pool de plasma. Se utilizó la solución de pool de plasma humano (SPP) como diluyente. La SPP se obtuvo al mezclar 6 bolsas de plasma procedentes del Banco de Sangre del Hospital Universitario de la U.A.N.L., a solicitud del Departamento de Farmacología y Toxicología. Las bolsas se mantuvieron en congelación a una temperatura menor a -40°C en el ultracongelador hasta su uso.

En las siguientes tablas se describen el tipo y composición de las soluciones de calidad aplicadas en la validación del método analítico y durante el análisis de muestras biológicas.

Tabla 7a. Soluciones de validación.

IDENTIFICACIÓN	CONCENTRACIÓN DE METFORMINA (ng/mL)	PREPARACIÓN
SPP	Sin adición	Mezclar 6 bolsas de plasma
SM	500,000.00	12.5mg de clorhidrato de metformina en 25mL de metanol
SD1	50,000.00	1mL de SM + 9mL de metanol
SCD2	5,048.51	820 μ L SM + 80 mL SPP
SCD1	3,786.38	20mL SCD2 + 20mL SC6
SC6	2,524.25	40mL SCD2 + 40mL SPP
SC5	1,262.13	30mL SC6 + 30mL SPP
SC4	631.06	30mL SC5 + 30mL SPP
SC3	315.53	30mL SC4 + 30mL SPP
SC2	157.77	30mL SC3 + 30mL SPP
SC1	78.88	30mL SC2 + 30mL SPP
SC	39.44	30mL SC1 + 30mL SPP
SC0	19.72	30mL SC + 30mL SPP
SCC3	1,893.19	10mL SC6 + 10mL SC5
SCC2	473.30	10mL SC4 + 10mL SC3
SCC1	236.65	10mL SC3 + 10mL SC2

Tabla 7b. Soluciones de validación.

IDENTIFICACIÓN	CONCENTRACIÓN DE METFORMINA (ng/mL)	PREPARACIÓN
SSPN	Sin adición	Cada uno de los 6 componentes del pool de plasma
SSPL	Sin adición	Plasma lipémico
SSPH	Sin adición	Plasma hemolizado
SSF	Sin adición	30µL SMF + 10mL SPP (2524.25 ng/mL de clu de los fármacos concomitantes)
SSA	Sin adición	Plasma con anticoagulantes (citrate de sodio, heparina de sodio)
SEML3	946.13 (1,892.26)*	390µL SD1 + 20mL Fase Móvil
SV	236.53 (473.07)*	2.5mL SEML3 + 7.5mL Fase Móvil
SEML1	118.32 (236.65)*	5mL SV + 5mL Fase Móvil
Sa3	19,878.49 (39,756.98)*	410µL SM + 10mL Fase móvil
Sa1	2,484.72 (4,969.44)*	50µL SM + 10mL Fase móvil
SPNa3	946.59 (1,893.19)*	50µL SM + 1mL de SSPN
SPNa1	118.32 (236.65)*	50µL SM + 1mL de SSPN
SPLa3	946.59 (1,893.19)*	50µL SM + 1mL de SSPL
SPLa1	118.32 (236.65)*	50µL SM + 1mL de SSPL
SPHa3	946.59 (1,893.19)*	50µL SM + 1mL de SSPH
SPHa1	118.32 (236.65)*	50µL SM + 1mL de SSPH
SEAS LSC	2,524.00	51µL SM + 10mL Fase móvil
SEAS LIC	78.26	320µL SEAS LSC + 10mL Fase móvil

Concentración Real: Concentración obtenida x (Metformina: 0.799)
 Los estándares secundarios se pesan con una precisión a la décima de miligramo.
 SMF: Solución Madre de Fármacos concomitantes (1,000,000 ng/mL de clu).
 Se preparan con una dilución 2 veces menos concentrada como homologación del procesamiento de muestras (dilución de 200 a 400µL).

Tabla 8. Soluciones preparadas durante el análisis de muestras biológicas.

IDENTIFICACIÓN	CONCENTRACIÓN DE METFORMINA (ng/mL)	PREPARACIÓN
SPP	Sin adición	Mezclar 6 bolsas de plasma
SM	500,000.00	12.5mg de clorhidrato de metformina en 25 mL de metanol
SCD2	5,048.51	820µL SM + 80 mL SPP
SCD1	3,786.38	10mL SCD2 + 10mL SC6
SC6	2,524.26	50mL SCD2 + 50 mL SPP
SC5	1,262.13	30mL SC6 + 30mL SPP
SC4	631.06	30mL SC5 + 30mL SPP
SC3	315.53	30mL SC4 + 30mL SPP
SC2	157.77	30mL SC3 + 30mL SPP
SC1	78.88	30mL SC2 + 30mL SPP
SEML3	946.13 (1,892.26)*	390 µL SD1 + 20mL Fase Móvil
SCC3	1,893.19	10mL SC6 + 10mL SC5
SCC2	473.30	10mL SC4 + 10mL SC3
SCC1	236.65	10mL SC3 + 10mL SC2
SV	236.53 (473.07)*	2.5mL SEML3 + 7.5mL Fase móvil
<p>Concentración Real: Concentración obtenida x (Metformina: 0.799) Los estándares secundarios se pesan con una precisión a la décima de miligramo. SMF: Solución Madre de Fármacos concomitantes (1,000,000 ng/mL de c/u). Se preparan con una dilución 2 veces menos concentrada como homologación del procesamiento de muestras (dilución de 200 a 400µL).</p>		

2.2.5.3 Procesamiento de muestras.

Las muestras para la determinación de metformina y para la validación del método analítico se trabajaron en alícuotas de 200 μ L. Se añadió 1mL de acetonitrilo para precipitar las proteínas. Posteriormente, se agitaron en vórtex por 5 segundos para luego agitar en conjunto en vórtex multitubo durante 5 minutos. Se centrifugaron a 12,500 rpm durante 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de evaporación de vidrio de 13x100 mm, y se evaporaron a sequedad a 60°C, bajo corriente de nitrógeno. Se recuperó el residuo en 400 μ L de fase móvil, se tapó el tubo y se agitó en vórtex durante 10 segundos, posteriormente, se agitaron en conjunto en el vórtex multitubo por 2 minutos. Se transfirió el resuspendido de cada alícuota a un tubo eppendorf de 1.5mL, y centrifugaron en microcentrífuga a 12,500 rpm durante 4 minutos. Se transfirió el sobrenadante de cada tubo a un microvial ámbar con inserto de fondo plano, para su inyección en el cromatógrafo por medio de un inyector automático. Para la separación cromatográfica se utilizó una columna ZORBAX HILIC Plus Rapid Resolution, y como eluyente una mezcla (40/60% volumen/volumen) de acetonitrilo y ácido fórmico al 0.1% a un flujo de 0.8mL/minuto. Para la medición se utilizó una fuente de Ionización por Electro Spray a Presión Atmosférica (ESI) modo Positivo, con monitoreo de los iones 130.2 \rightarrow 60.1 m/z.

2.2.5.4 Validación del método analítico.

Las características de desempeño que se validaron son las establecidas por la NOM-177-SSA1-2013:

- Selectividad.
- Efecto de matriz para métodos por espectrometría de masas.
- Efecto de acarreo para métodos por espectrometría de masas.
- Límite inferior de cuantificación.
- Curva de calibración.
- Precisión y exactitud a condiciones de repetibilidad.
- Precisión y exactitud a condiciones de reproducibilidad.
- Estabilidad de la muestra a corto plazo.
- Estabilidad de la muestra a largo plazo.
- Estabilidad de la muestra procesada.
- Estabilidad del analito en solución.
- Estabilidad de la muestra en el automuestreador.
- Estabilidad de la muestra en función de los ciclos de congelación y descongelación.
- Límite de detección.

Selectividad. Con esta prueba se buscó demostrar la no interferencia de compuestos endógenos de la matriz biológica, mediante la evaluación individual de seis diferentes unidades de plasma humano obtenidas del banco de sangre del Hospital Universitario de la UANL, identificados como SSPN y su número de bolsa (1404235, 1404236, 1404237, 1404238, 1404239, 1404240), en conjunto con una de plasma lipémico (SSPL) y una unidad de plasma hemolizado (SSPH).

Adicionalmente se evaluaron otras siete muestras de plasma humano adicionado con un fármaco a un nivel de concentración similar al límite superior de cuantificación (ácido acetilsalicílico, diclofenaco, paracetamol, naproxeno, ibuprofeno, loratadina y cafeína), identificadas como SSF y la primera letra del nombre del fármaco. También se analizaron dos muestras de plasma humano recolectadas en tubos con diferentes anticoagulantes, una de ellas en citrato de sodio y la otra en heparina sódica, identificadas como SSA y la primera letra del nombre del anticoagulante.

El criterio de aceptación fue que la respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debía ser menor al 20% del límite inferior de cuantificación de metformina. [7]

Efecto de matriz para métodos por espectrometría de masas. Se procesaron ocho muestras de seis diferentes unidades de plasma humano obtenidas del banco de sangre del Hospital Universitario de la UANL, identificadas como SPNa, en conjunto con una muestra de plasma lipémico (SPLa), y una muestra de plasma hemolizado (SPHa). Los extractos obtenidos de cada una de las seis diferentes unidades de plasma humano, los de plasma lipémico y los de plasma hemolizado, son depositados en 8 tubos de ensayo de recolección de extracto, y se les adicionó metformina a dos niveles de concentración. Se identificaron como: SPNa1 SPNa3, SPLa1, SPLa3, SPHa1, SPHa3, siendo el “3” una concentración alta (946.59 ng/mL) y “1” una concentración baja (118.32 ng/mL). Para evaluar este criterio de desempeño también se analizaron las soluciones en matriz limpia identificadas como SEML3 y SEML1.

Para cada unidad se obtuvo un Factor de Matriz Normalizado por el conforme a la siguiente fórmula:

$$FMN = \frac{\text{Respuesta del analito en la matriz}}{\text{Respuesta del analito en solución}}$$

El criterio de aceptación fue que el FMN calculado de cada una de las 6 unidades de la matriz SPNa y de cada unidad de matrices SPLa y SPHa no debía ser mayor que el 15%. [7]

Esta determinación se realizó a 2 niveles de concentración, equivalentes a las SCC3 de concentración alta y de la SCC1 de concentración baja.

Efecto de acarreo para métodos por espectrometría de masas. Se realizó un mínimo de 3 inyecciones de blanco de pool de plasma (BIP), una antes y dos después de una inyección del límite superior de cuantificación (LSC, 2,524.25 ng/mL). Los resultados se compararon con la respuesta del límite inferior de cuantificación (LIC 78.88 ng/mL).

El criterio de aceptación fue que la respuesta de las interferencias próximas al tiempo de retención de la metformina (1.77 minutos) debían ser menores al 20% del límite inferior de cuantificación. [7]

Límite inferior de cuantificación. Se analizó bajo condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad, y en cada caso se evaluó la precisión y exactitud.

Repetibilidad. Se procesaron por quintuplicado, en un mismo día, muestras identificadas como LIC a las condiciones estipuladas en el procesamiento de muestras, y se analizaron en acuerdo a las condiciones instrumentales establecidas. Se calcularon las concentraciones mediante la interpolación su respuesta analítica en la curva de calibración aplicable.

Reproducibilidad. Se procesaron en tres diferentes días, por quintuplicado, muestras identificadas como LIC a las condiciones estipuladas en el procesamiento de muestras, y se analizaron en acuerdo a las condiciones instrumentales establecidas. Se calcularon las

concentraciones mediante la interpolación su respuesta analítica en la curva de calibración aplicable.

El criterio de aceptación para la precisión fue que el porcentaje del coeficiente de variación (%CV) del valor promedio de las concentraciones no debía ser mayor al 20%. [7]

En cuanto a la exactitud, se tomó como criterio que el valor promedio del porcentaje de desviación debía ser menor o igual al 20% resultante de emplear la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Desviación} = \left[\frac{(\text{Concentración adicionada} \times \text{concentración obtenida})}{\text{Concentración adicionada}} \right] \times 100$$

Curva de calibración. Se analizaron cuatro curvas de calibración constituidas con seis niveles de concentración (78.88, 157.77, 315.53, 631.06, 1,262.13, 2,524.25 ng/mL) y el blanco pool. Se procesan en un mismo día a las condiciones estipuladas en el procesamiento de muestras y se analizaron en acuerdo a las condiciones instrumentales antes señaladas.

Se estableció un modelo matemático que describe adecuadamente la relación entre la concentración y la respuesta, la cual debía ser continua y reproducible en el intervalo de trabajo, y se determinaron las

concentraciones para cada nivel de cada curva de calibración a partir de los valores obtenidos.

Cuando un punto de la curva de calibración no cumplió con el criterio de aceptación, se rechazó y la curva de calibración fue recalculada sin modificar el modelo matemático.

El criterio de aceptación estipulado fue que los datos de la concentración recuperada de la curva de calibración debían estar dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, excepto para el LIC, para el que se aceptó hasta un 20%. Además, al menos el 75% de las concentraciones de la curva de calibración con un mínimo de seis puntos debían cumplir este criterio. [7]

Del total de las curvas evaluadas, al menos el 50% de cada nivel de concentración debía cumplir con el criterio del 15% de la concentración nominal y 20% para el LIC. [7]

Precisión y exactitud a condiciones de repetibilidad. Se procesaron en un mismo día por quintuplicado, 4 tipos de muestras identificadas como SCC1 (236.65 ng/mL), SCC2 (473.30 ng/mL), SCC3 (1,893.19 ng/mL) y SCD1 (3,786.38 ng/mL) a las condiciones estipuladas en el procesamiento de muestras, y se analizaron en acuerdo a las condiciones instrumentales establecidas. Se calculó la concentración interpolando la respuesta analítica en la curva de calibración aplicable. Previo al

procesamiento, la SCD1 se diluyó 1:1 con la misma matriz biológica exenta del fármaco (SPP).

El criterio de aceptación establecido para la precisión fue: el %CV del valor promedio de las concentraciones no debía exceder el 15%. [7]

En cuanto a la exactitud, el valor promedio del porcentaje de desviación debía ser menor o igual al 15%. [7]

Precisión y exactitud a condiciones de reproducibilidad. Se procesaron en tres días diferentes, por quintuplicado, 3 tipos de muestras identificadas como SCC1 (236.65 ng/mL), SCC2 (473.30 ng/mL), y SCC3 (1,893.19 ng/mL), a las condiciones estipuladas en el procesamiento de muestras, y se analizaron en acuerdo a las condiciones instrumentales establecidas. Se calculó la concentración interpolando la respuesta analítica en la curva de calibración aplicable.

El criterio de aceptación establecido para la precisión fue que el %CV del valor promedio de las concentraciones no debía exceder el 15%. [7]

En cuanto a la exactitud, el valor promedio del porcentaje de desviación debía ser menor o igual al 15%. [7]

Estabilidad de la muestra a corto plazo. Se mantuvieron sin procesar y a temperatura ambiente, por el tiempo equivalente al consumido al aplicar el procedimiento en el procesamiento de muestras, muestras de SCC1 y

SCC3 por triplicado. Transcurrido el tiempo correspondiente, se procesaron las muestras junto con muestras de SCC1 y SCC3 recién descongeladas, que se tomaron como la referencia, y se analizaron a las condiciones instrumentales establecidas.

El criterio de aceptación establecido fue que la concentración promedio de cada nivel debía encontrarse dentro del 15% de la concentración nominal.[7]

Estabilidad de la muestra a largo plazo. Se evaluó la estabilidad de muestras sin procesar, mantenidas a temperatura menor a -40°C durante el tiempo equivalente al almacenamiento de las muestras del estudio desde su obtención hasta su análisis. Las muestras correspondieron a SCC1 y SCC3. Se almacenaron un mínimo de 9 réplicas de cada muestra, y se analizaron 3 réplicas de cada una a diferentes tiempos de almacenaje. En cada tiempo, se procesaron las muestras junto con muestras de SCC1 y SCC3 preparadas un día antes y que contaban con un ciclo de congelación-descongelación, que se tomaron como la referencia. Las muestras fueron analizadas a las condiciones instrumentales establecidas.

El criterio de aceptación establecido fue que la concentración promedio de cada nivel debía encontrarse dentro del 15% de la concentración nominal.[7]

Estabilidad de la muestra procesada. Se evaluó la estabilidad de la muestra procesada mantenida tanto a temperatura ambiente como en refrigeración sin analizarla el mismo día de su procesamiento.

Se procesaron 9 réplicas de SCC1 y SCC3. Tres muestras de cada concentración se almacenaron a temperatura ambiente, mientras que las restantes se almacenaron a una temperatura inferior a 5°C. Transcurridas 24 horas, las muestras mantenidas a temperatura ambiente y 3 réplicas de las almacenadas a 5°C se analizaron bajo las condiciones instrumentales establecidas, en conjunto con muestras recién procesadas. Posteriormente, transcurridas 72 horas del día en que se procesaron, las tres réplicas restantes mantenidas a 5°C se analizaron bajo las condiciones instrumentales antes descritas en conjunto con muestras recién procesadas empleadas como referencia.

El criterio de aceptación establecido fue que la concentración promedio de cada nivel debía encontrarse dentro del 15% de la concentración nominal.[7]

Estabilidad en el automuestreador. Se procesaron por triplicado muestras SCC1 y SCC3. Se trasvasaron los extractos a tres viales para su análisis inmediato, cada ocho horas, durante 24 horas, en las que se mantuvieron en el automuestreador.

El criterio de aceptación establecido fue que la concentración promedio de cada nivel debía encontrarse dentro del 15% de la concentración nominal.[7]

Estabilidad en función de los ciclos de congelación y descongelación. En el primer día, se descongelaron tres réplicas de SCC1 y SCC3 que estuvieron congeladas por al menos 24 horas, se les identificó como SCC1III y SCC3III. En el segundo día, se vuelven a descongelar las tres réplicas del primer día más otras tres réplicas (identificadas como SCC1II y SCC3II). En el último día, se descongelan las tres réplicas del primer día, las tres réplicas del segundo día, y tres nuevas réplicas de SCC1 y SCC3, que se identificaron como SCC1 I y SCC3 I. Posteriormente, se procesaron de acuerdo a lo descrito en el procesamiento de muestras, y se analizaron de acuerdo a lo establecido en las condiciones del análisis instrumental.

El criterio de aceptación establecido fue que la concentración promedio de cada nivel debía encontrarse dentro del 15% de la concentración nominal.[7]

Estabilidad del analito en solución. Se evaluó la estabilidad de la solución madre de metformina (a través de soluciones identificadas como SEA LIC, de 78.88 ng/mL, y SEA LSC, de 2,524.25 ng/mL) en diferentes

fechas desde su preparación hasta el tiempo equivalente a la conclusión del estudio.

En cada fecha de análisis, se prepararon tres réplicas de SEAS LSC y SEAS LIC a partir de la solución madre con la que se prepararon las soluciones aplicadas en la validación, y otras tres réplicas de cada solución SEAS, preparadas a partir de una solución madre que se elaboró ese mismo día, que se emplearon como referencia.

El criterio de aceptación establecido fue que el valor promedio de la respuesta analítica de las SEAS LIC y LSC preparadas con la solución madre inicial, no debían diferir más del 10% absoluto de la respuesta analítica promedio de las SEAS LIC y LSC recién preparadas. [7]

Límite de detección. El límite de detección se estableció con la señal de metformina en matriz biológica comparada con la magnitud del nivel del ruido instrumental, expresado como relación señal ruido, bajo las condiciones instrumentales establecidas.

Se procesaron en un mismo día por triplicado, muestras identificadas como SC0 (19.72 ng/mL) a las condiciones de procesamiento de muestras, y se analizaron en acuerdo a las condiciones instrumentales estipuladas. Se obtuvo la relación señal/ruido a través del software del equipo.

El criterio de aceptación correspondió a la comparación del valor promedio de la relación señal/ruido de la SC0, que no debía ser inferior a 3. [7]

2.2.5.5 Análisis de muestras biológicas.

Secuencia de análisis. Las muestras de los sujetos de investigación se analizaron en orden ascendente según la secuencia numérica asignada, con un máximo de tres sujetos por día. Previamente se aplicó un control de calidad al equipo donde se llevó a cabo el análisis, a fin de asegurar su correcto funcionamiento.

El análisis de muestras de cada día incluyó la evaluación de una curva de calibración, un blanco de pool de plasma, viales con solvente para realizar pruebas de arrastre, así como soluciones de control de calidad que se intercalaron entre las muestras de un sujeto de investigación y otro.

2.2.5.6 Control de calidad de la corrida analítica.

Verificación de la adecuabilidad del sistema analítico de medición.

Se realizó diariamente durante la validación y el análisis de muestras biológicas con la finalidad de verificar el buen funcionamiento del sistema analítico de medición antes del análisis de cada día de trabajo. De esta manera se confirmó que los componentes del sistema analítico trabajaban

correctamente (desempeño de la columna, volumen de entrega de las bombas cromatográficas y precisión del inyector). De esta manera se respalda la cuantificación confiable metformina.

La verificación se realizó inyectando por quintuplicado la solución de verificación de la adecuabilidad del sistema (236.53 ng/mL) a las condiciones instrumentales especificadas en numeral 2.2.5. Para la evaluación se utilizaron los resultados de las últimas tres inyecciones, se determinó la precisión en cada caso.

Se evaluó el inyector a través del área del pico, la columna a través del ancho de pico a la mitad de la altura y la bomba a través del tiempo de retención.

Verificación de no interferencias. La verificación de no interferencias incluye la limpieza del proceso analítico, mediante el análisis del pool de plasma (reportado como blanco pool), la limpieza del sistema analítico de medición mediante la inyección del solvente final usado durante el procesamiento de la muestra (reportado como prueba de arrastre), así como la no interferencia de la matriz de la muestra biológica de cada sujeto de investigación (predosis).

Durante esta verificación se comprobó la ausencia de contaminantes y/o interferencias que alteren los resultados analíticos.

Verificación de la curva de calibración. El principal objetivo metrológico del uso de una curva de calibración, y más específicamente de la ecuación que la define, es la obtención de resultados de medición con una exactitud (% de error o % de desviación) dentro de especificaciones previamente establecidas y consistentes durante el desarrollo y aplicación de una metodología analítica.

La curva de calibración se define mediante un modelo matemático que describe adecuadamente la relación entre la concentración y la respuesta.

Este modelo es de tipo lineal asegurando una relación continua y reproducible en el intervalo de trabajo.

La verificación de la curva de calibración se realizó diariamente previa al análisis de las muestras de los sujetos de investigación. Una muestra de cada nivel de concentración se sometió al procesamiento de muestras y a las condiciones instrumentales establecidas.

Verificación de la exactitud y precisión del método (Muestras control). Las soluciones de control de calidad o muestras control identificadas como SCC's se usaron como parte de los criterios de aceptación de los resultados de una corrida analítica. Específicamente, el resultado de su análisis respalda los resultados del análisis de las muestras de uno o más sujetos de investigación intercalados entre ellas. Se prepararon tres niveles de concentración: bajo (263.65 ng/mL), medio (473.30 ng/mL) y alto (1,892.19 ng/mL).

Sus concentraciones son diferentes a las concentraciones de las soluciones de calibración, pero se encuentran dentro del intervalo de la curva de calibración.

Tabla 9. Control de calidad de la corrida analítica.

Parámetro	Criterio de Aceptación
Adecuabilidad del sistema Analítico de Medición (SV)	El Coeficiente de Variación del tiempo de retención, área, y ancho del pico a la mitad de la altura, debe ser < 5%.
Prueba de Arrastre y Blanco Pool (BIP)	El Área debe ser < 1/5 del Área de la SC de menor concentración (LIC).
Curva de Calibración (SC's)	El Coeficiente de Determinación (r^2) debe ser > 0.990. El % de Error absoluto o % de Desviación absoluta debe ser <15% de cada SC, excepto para el LIC, que debe ser < 20%. Al menos el 75% de un mínimo de 6 niveles deben cumplir.
Muestras Control (SCC's)	El Error absoluto debe ser ≤ 15 , respecto a la concentración nominal. Al menos el 67% de SCC y el 50% de cada nivel de concentración deben cumplir.

2.2.5.7 Criterios de reanálisis de muestras biológicas.

Los siguientes hechos se consideraron como criterios de reanálisis de muestras de sujetos de investigación:

- Cuando se obtiene una concentración cuantificada mayor al límite superior de la curva de calibración.
- Cuando se rechaza una corrida analítica por no cumplir con los criterios de calidad excluyentes establecidos para la misma.
- Cuando el reanálisis de cierto número de muestras se considere como parte del control del método analítico de medición.
- Muestras predosis con respuesta superior al LIC.

- Si se presenta una falla del equipo, inyección inadecuada de la muestra o se obtiene una pobre señal cromatográfica.
- Si la concentración obtenida está por arriba del Límite Inferior o Superior de Cuantificación en corridas analíticas donde fue necesario eliminar los estándares originales de la curva de calibración.

2.2.6 Análisis farmacocinético y estadístico.

Para llevar a cabo las pruebas se utilizó un diseño cruzado o crossover.

Datos.

Número de medicamentos:	= 3	A, B y C
Número de períodos:	= 3	P1, P2 y P3
Número de sujetos de investigación:	= 12	S01 a S12
Número de unidades experimentales(n):	= 36	UE01 a UE36

El análisis farmacocinético y estadístico para el cálculo de los parámetros farmacocinéticos se desarrolló haciendo uso del paquete computacional WinNonlin versión 6.3 y SPSS versión 13.

Procedimiento de captura de datos para el programa Winnonlin®. Se reordenaron los datos obtenidos de las concentraciones de metformina. Por medio del programa Winnonlin® se obtuvieron los valores de los parámetros farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos evaluados fueron los siguientes:

C_{máx}: La concentración sérica máxima que se obtuvo de manera gráfica a partir del perfil de concentración plasmática con respecto al tiempo.

T_{máx}: El tiempo transcurrido en que se produce la concentración sérica máxima se obtuvo de manera gráfica a partir del perfil de concentración sérica con respecto al tiempo.

ABC_{0-t}: El área bajo la curva de la concentración sérica desde la administración hasta el tiempo t (último tiempo de muestreo) se calculó por el método trapezoidal. El procedimiento para el cálculo de este parámetro se realizó con la siguiente fórmula:

$$ABC_{0-t} = \sum_{i=1}^n \frac{(C_i + C_{i-1})(t_i - t_{i-1})}{2}$$

Dónde:

n = número de tiempos de muestreo utilizados en el perfil sérico.

t_i = tiempo en que se realiza la i -ésima toma de muestra.

C_i = Concentración obtenida en el i -ésimo tiempo de muestreo.

K_e : la constante de eliminación se estimó a partir de la porción lineal terminal del perfil de concentración sérica con respecto al tiempo (en escala semilogarítmica) multiplicado por la integral de 2 (2.303).

$$K_e = b \times \ln(2)$$

Dónde:

b = pendiente de la recta.

$t^{1/2}$: la vida media de eliminación se estimó mediante el cociente de integral de 2 sobre constante de eliminación.

$$t^{1/2} = \ln(2)/K_e. [34-37]$$

Se compararon los parámetros farmacocinéticos $C_{m\acute{a}x}$ y ABC, generando el intervalo de confianza clásico y prueba t doble unilateral de Schuirmann, para el cociente de los parámetros farmacocinéticos (log transformados). [34-37]

Para cada parámetro se realizaron las siguientes pruebas:

Análisis de varianza. En la prueba de ANADEVa las fuentes de variación (secuencia, sujetos, períodos y tratamientos) se interpretaron de la siguiente manera: Si $p \geq 0.05$, se dice que no hay diferencia significativa; si $0.01 \leq p < 0.05$, se dice que hay diferencia significativa; con valores de $p < 0.01$, se dice que hay una diferencia altamente significativa. El poder de la prueba: el valor mínimo será de 0.80 ($1-\beta$). [7,34-37]

Intervalo de confianza. En la prueba de intervalo clásico para datos crudos y datos transformados logarítmicamente; con valores de $80 \leq X \leq 120$ y $80 \leq X \leq 125$ respectivamente y un nivel de significancia de 0.05 para la construcción de un intervalo de confianza al 90%, el producto a probar será bioequivalente si los parámetros farmacocinéticos se encuentran en el intervalo de confianza referido. [7,34-37]

Intervalo de Westlake. En la prueba del intervalo de Westlake, para datos crudos y datos transformados logarítmicamente con un valor de $80 \leq X \leq 120$ y $80 \leq X \leq 125$ para la construcción de un intervalo de confianza simétrico al 90%, el producto a probar será bioequivalente si los parámetros farmacocinéticos se encuentran en el intervalo referido. [7,35]

Prueba t doble unilateral de Schuirmann. El producto a probar será bioequivalente si los parámetros farmacocinéticos se encuentran en el intervalo $80 \leq X \leq 120$ y $80 \leq X \leq 125$ para datos transformados logarítmicamente con un alfa de 0.05 y un valor total de $p < 0.05$. [7,36]

CAPÍTULO III.

3. RESULTADOS.

3.1 Variables demográficas de los sujetos.

El estudio se inició con 12 sujetos de investigación sanos de ambos géneros (7 del género femenino y 5 del género masculino). El de mayor edad de 38 años y el de menor edad de 19 años (promedio 24 años). La estatura fluctuó entre 1.52 m y 1.79 m (promedio 1.65 m), el peso fluctuó entre 48.2 kg y 82.0 kg (promedio 62 kg), con un índice de masa corporal entre 18.59 kg/m² y 26.50 kg/m² (promedio de 23.02 kg/m²).

3.2 Signos vitales.

Los valores de los signos vitales (presión arterial, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria y temperatura) se muestran en las tablas 10 a 12 y figuras 3 a 7. No se observó alteración en los valores de los signos vitales en ninguno de los sujetos de investigación.

Tabla 10a. Signos vitales tomados pre estudio en la 1ª fase.

SIGNOS VITALES PRE ESTUDIO 1ª FASE					
SUJETO DE INVESTIGACIÓN	TA SISTÓLICA	TA DIASTÓLICA	PULSO	FRECUENCIA RESPIRATORIA	TEMPERATURA
S01ACB	100	60	64	16	36.4
S02BAC	100	60	62	14	36.6
S03BAC	110	70	62	14	36.4
S04ACB	110	70	68	18	36.3
S05ACB	110	80	66	14	36.7
S06CBA	100	60	82	15	36.7
S07CBA	110	60	68	14	36.6
S08ACB	100	60	92	18	36.8
S09CBA	110	80	74	16	36.4
S10BAC	100	60	64	18	36.5
S11BAC	110	70	72	18	36.9
S12CBA	110	70	68	18	36.8
PROMEDIO	105.8	66.7	70.2	16.1	36.6

Tabla 10b. Signos vitales tomados en la mañana en la 1ª fase del estudio.

SIGNOS VITALES MAÑANA 1ª FASE					
SUJETO DE INVESTIGACIÓN	TA SISTÓLICA	TA DIASTÓLICA	PULSO	FRECUENCIA RESPIRATORIA	TEMPERATURA
S01ACB	100	60	64	12	36.6
S02BAC	100	70	64	16	36.7
S03BAC	110	70	62	14	36.6
S04ACB	110	80	62	14	36.2
S05ACB	115	70	62	18	36.4
S06CBA	110	60	64	14	36.2
S07CBA	110	65	66	16	36.8
S08ACB	100	60	68	16	36.4
S09CBA	110	80	68	16	36.6
S10BAC	100	60	62	14	36.4
S11BAC	110	70	68	18	36.6
S12CBA	110	70	62	16	36.8
PROMEDIO	107.1	67.9	64.3	15.3	36.5

Tabla 10c. Signos vitales tomados en la tarde en la 1ª fase del estudio.

SIGNOS VITALES TARDE 1ª FASE					
SUJETO DE INVESTIGACIÓN	TA SISTÓLICA	TA DIASTÓLICA	PULSO	FRECUENCIA RESPIRATORIA	TEMPERATURA
S01ACB	110	70	88	17	36.6
S02BAC	110	80	76	16	37.5
S03BAC	110	60	70	16	37.1
S04ACB	110	70	78	15	36.7
S05ACB	110	72	66	15	36.4
S06CBA	100	60	93	16	36.6
S07CBA	110	70	74	16	37.4
S08ACB	100	70	92	15	36.4
S09CBA	110	80	78	18	36.3
S10BAC	100	60	78	12	37.0
S11BAC	110	80	64	14	36.4
S12CBA	110	60	74	12	36.5
PROMEDIO	107.5	69.3	77.6	15.2	36.7

Tabla 10d. Signos vitales tomados al egresar de la 1ª fase del estudio.

SIGNOS VITALES EGRESO 1ª FASE					
SUJETO DE INVESTIGACIÓN	TA SISTÓLICA	TA DIASTÓLICA	PULSO	FRECUENCIA RESPIRATORIA	TEMPERATURA
S01ACB	110	70	78	16	36.5
S02BAC	110	70	72	16	36.7
S03BAC	110	70	66	15	36.6
S04ACB	110	70	69	16	36.6
S05ACB	110	70	70	16	36.6
S06CBA	105	63	66	15	36.4
S07CBA	110	72	76	15	36.6
S08ACB	100	65	86	15	36.3
S09CBA	110	82	76	17	36.5
S10BAC	100	60	70	15	36.6
S11BAC	110	70	66	16	36.5
S12CBA	105	65	70	14	36.3
PROMEDIO	107.5	68.9	72.1	15.5	36.5

Tabla 11a. Signos vitales tomados pre estudio en la 2ª fase.

SIGNOS VITALES PRE ESTUDIO 2ª FASE					
SUJETO DE INVESTIGACIÓN	TA SISTÓLICA	TA DIASTÓLICA	PULSO	FRECUENCIA RESPIRATORIA	TEMPERATURA
S01ACB	105	80	68	14	36.8
S02BAC	100	60	66	14	36.8
S03BAC	100	80	62	14	36.8
S04ACB	110	70	71	16	36.2
S05ACB	100	70	65	15	36.5
S06CBA	103	70	68	16	36.4
S07CBA	100	70	62	14	36.5
S08ACB	100	60	90	16	36.8
S09CBA	110	60	72	18	36.2
S10BAC	100	70	70	14	36.6
S11BAC	110	75	92	17	36.6
S12CBA	120	80	80	16	36.2
PROMEDIO	104.8	70.4	72.2	15.3	36.5

Tabla 11b. Signos vitales tomados en la mañana en la 2ª fase del estudio.

SIGNOS VITALES MAÑANA 2ª FASE					
SUJETO DE INVESTIGACIÓN	TA SISTÓLICA	TA DIASTÓLICA	PULSO	FRECUENCIA RESPIRATORIA	TEMPERATURA
S01ACB	100	60	66	14	36.8
S02BAC	105	70	62	14	36.5
S03BAC	105	70	68	14	36.6
S04ACB	110	70	68	18	36.2
S05ACB	100	70	68	16	36.6
S06CBA	100	60	78	16	36.6
S07CBA	100	60	64	14	36.5
S08ACB	100	60	64	14	36.4
S09CBA	110	70	68	16	36.7
S10BAC	100	70	64	18	36.7
S11BAC	110	70	70	16	36.5
S12CBA	110	80	68	14	36.3
PROMEDIO	104.2	67.5	67.3	15.3	36.5

Tabla 11c. Signos vitales tomados en la tarde en la 2ª fase del estudio.

SIGNOS VITALES TARDE 2ª FASE					
SUJETO DE INVESTIGACIÓN	TA SISTÓLICA	TA DIASTÓLICA	PULSO	FRECUENCIA RESPIRATORIA	TEMPERATURA
S01ACB	100	60	92	17	36.8
S02BAC	100	60	86	16	36.4
S03BAC	100	60	84	14	36.3
S04ACB	105	70	72	15	36.2
S05ACB	110	60	70	15	36.6
S06CBA	100	60	88	19	36.7
S07CBA	100	60	85	17	36.5
S08ACB	100	70	88	15	36.6
S09CBA	110	70	84	15	36.4
S10BAC	100	70	85	14	36.7
S11BAC	110	60	74	16	36.5
S12CBA	100	80	80	13	36.7
PROMEDIO	102.9	65.0	82.3	15.5	36.5

Tabla 11d. Signos vitales tomados al egresar de la 2ª fase del estudio.

SIGNOS VITALES EGRESO 2ª FASE					
SUJETO DE INVESTIGACIÓN	TA SISTÓLICA	TA DIASTÓLICA	PULSO	FRECUENCIA RESPIRATORIA	TEMPERATURA
S01ACB	98	62	86	16	36.4
S02BAC	102	65	80	16	36.5
S03BAC	106	64	78	15	36.4
S04ACB	102	74	70	16	36.3
S05ACB	105	66	70	16	36.6
S06CBA	100	60	80	20	36.6
S07CBA	103	62	70	16	36.4
S08ACB	103	72	74	15	36.7
S09CBA	110	70	76	16	36.3
S10BAC	103	74	76	15	36.6
S11BAC	112	68	76	16	36.5
S12CBA	106	74	70	16	36.7
PROMEDIO	104.2	67.6	75.5	16.1	36.5

Tabla 12a. Signos vitales tomados pre estudio en la 3ª fase.

SIGNOS VITALES PRE ESTUDIO 3ª FASE					
SUJETO DE INVESTIGACIÓN	TA SISTÓLICA	TA DIASTÓLICA	PULSO	FRECUENCIA RESPIRATORIA	TEMPERATURA
S01ACB	100	70	92	17	36.4
S02BAC	100	70	80	16	36.6
S03BAC	100	70	64	14	36.3
S04ACB	110	60	66	15	36.2
S05ACB	110	80	64	14	36.4
S06CBA	100	60	74	15	36.6
S07CBA	100	70	84	17	36.1
S08ACB	100	60	92	18	36.4
S09CBA	110	60	85	16	36.6
S10BAC	100	60	80	16	36.6
S11BAC	110	70	86	17	36.6
S12CBA	110	70	84	15	36.4
PROMEDIO	104.2	66.7	79.3	15.8	36.4

Tabla 12b. Signos vitales tomados en la mañana en la 3ª fase del estudio.

SIGNOS VITALES MAÑANA 3ª FASE					
SUJETO DE INVESTIGACIÓN	TA SISTÓLICA	TA DIASTÓLICA	PULSO	FRECUENCIA RESPIRATORIA	TEMPERATURA
S01ACB	100	60	66	14	36.8
S02BAC	100	70	82	17	36.4
S03BAC	102	70	65	16	36.6
S04ACB	110	70	68	16	36.6
S05ACB	110	80	68	16	36.4
S06CBA	102	60	66	14	36.5
S07CBA	100	60	68	15	36.7
S08ACB	100	60	84	16	36.7
S09CBA	100	80	84	16	36.6
S10BAC	100	60	70	16	36.6
S11BAC	110	80	76	14	36.6
S12CBA	110	70	74	16	36.4
PROMEDIO	103.7	68.3	72.6	15.5	36.6

Tabla 12c. Signos vitales tomados en la tarde en la 3ª fase del estudio.

SIGNOS VITALES TARDE 3ª FASE					
SUJETO DE INVESTIGACIÓN	TA SISTÓLICA	TA DIASTÓLICA	PULSO	FRECUENCIA RESPIRATORIA	TEMPERATURA
S01ACB	100	60	86	15	36.7
S02BAC	100	60	82	18	36.7
S03BAC	110	60	80	14	36.6
S04ACB	110	70	80	16	36.4
S05ACB	110	80	67	14	36.1
S06CBA	100	70	82	15	36.6
S07CBA	100	60	76	15	36.6
S08ACB	100	60	92	16	36.5
S09CBA	110	60	68	15	36.4
S10BAC	100	70	88	17	36.8
S11BAC	110	80	74	16	36.4
S12CBA	110	80	76	16	36.4
PROMEDIO	105.0	67.5	79.3	15.6	36.5

Tabla 12d. Signos vitales tomados al egresar de la 3ª fase del estudio.

SIGNOS VITALES EGRESO 3ª FASE					
SUJETO DE INVESTIGACIÓN	TA SISTÓLICA	TA DIASTÓLICA	PULSO	FRECUENCIA RESPIRATORIA	TEMPERATURA
S01ACB	100	62	78	15	36.8
S02BAC	103	68	80	16	36.5
S03BAC	105	68	72	16	36.6
S04ACB	110	70	70	15	36.4
S05ACB	112	76	68	15	36.3
S06CBA	106	74	78	16	37.0
S07CBA	100	64	70	16	36.3
S08ACB	104	66	88	15	36.6
S09CBA	108	64	73	16	36.8
S10BAC	102	74	76	18	36.6
S11BAC	112	76	72	15	36.4
S12CBA	114	76	72	16	36.4
PROMEDIO	106.3	69.8	74.8	15.8	36.6

Figura 3. Gráfica de la T.A. Sistólica promedio durante el estudio.

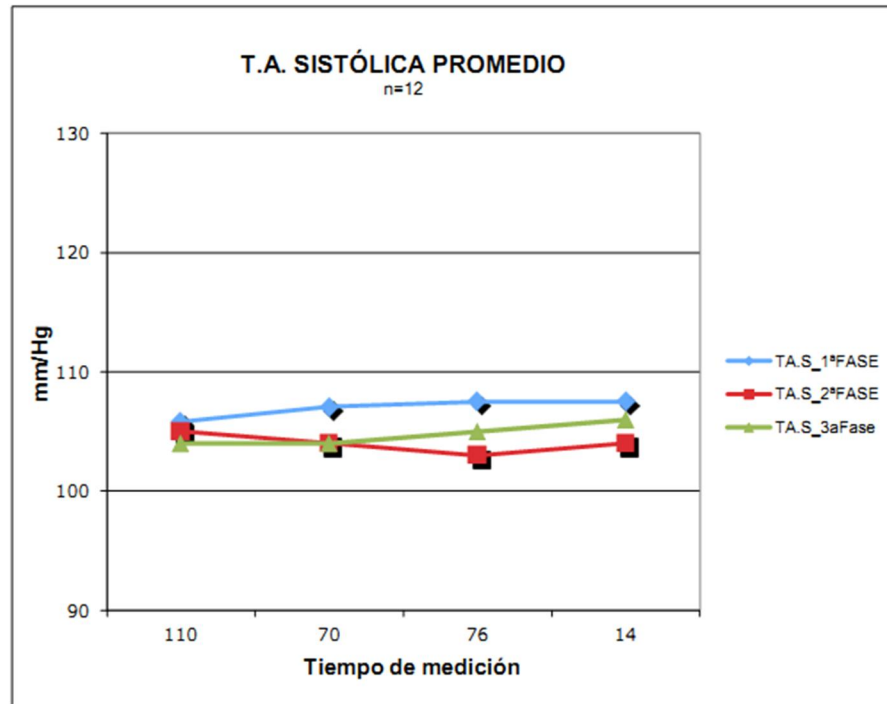


Figura 4. Gráfica de la T.A. Diastólica promedio durante el estudio.

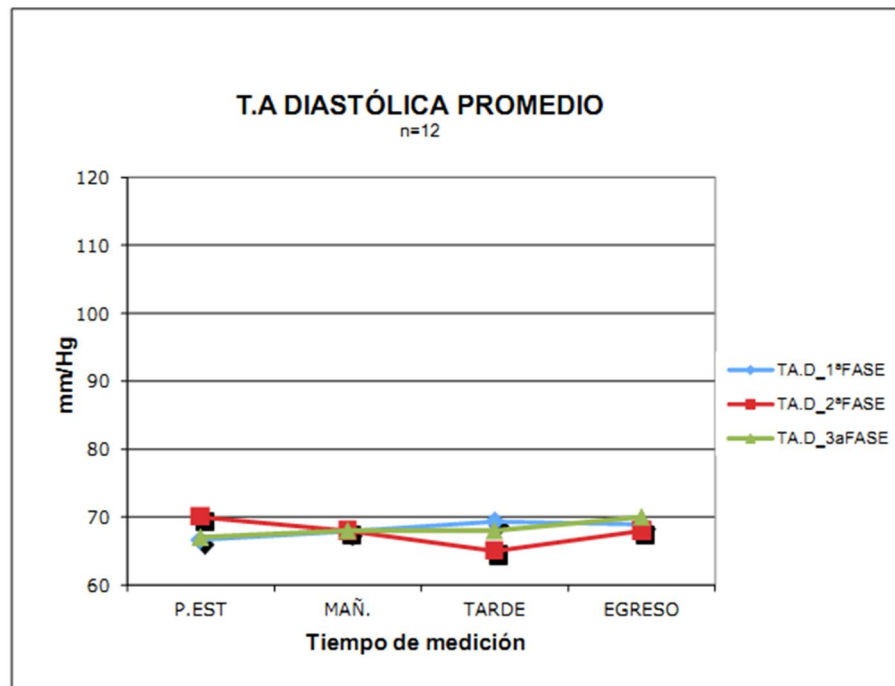


Figura 5. Gráfica del pulso promedio durante el estudio.

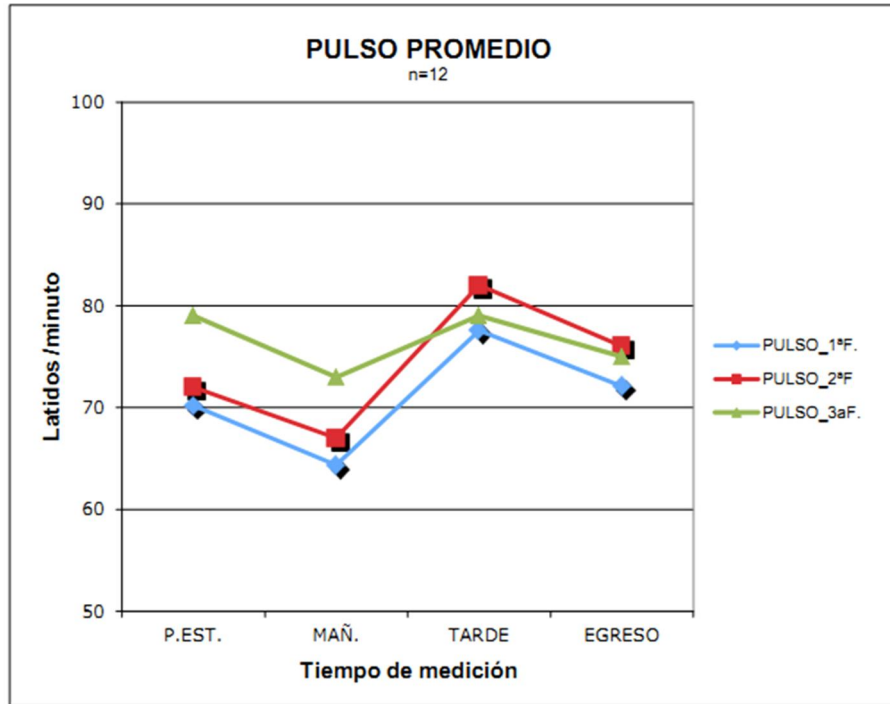


Figura 6. Gráfica de la temperatura promedio durante el estudio.

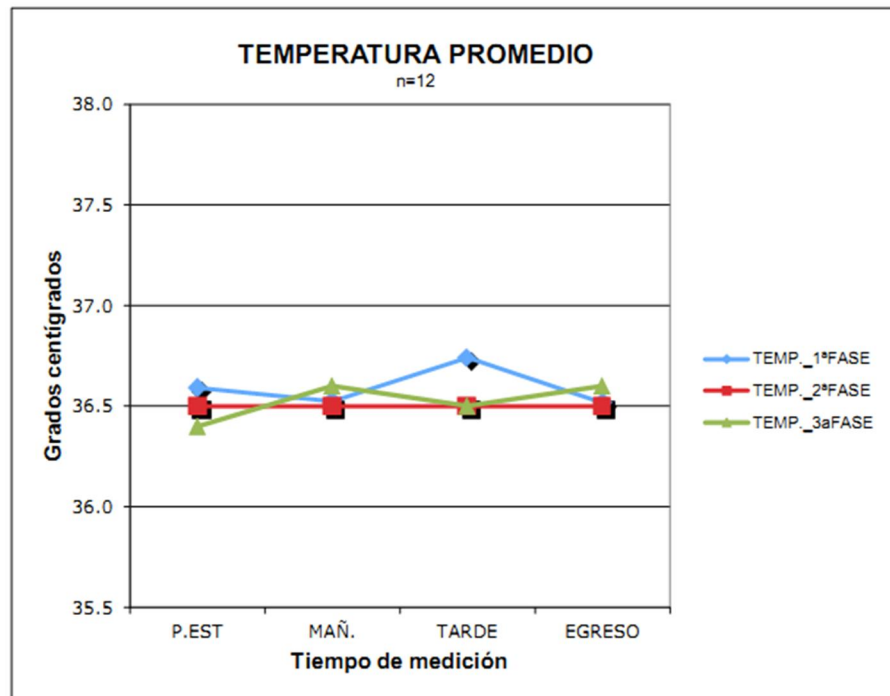
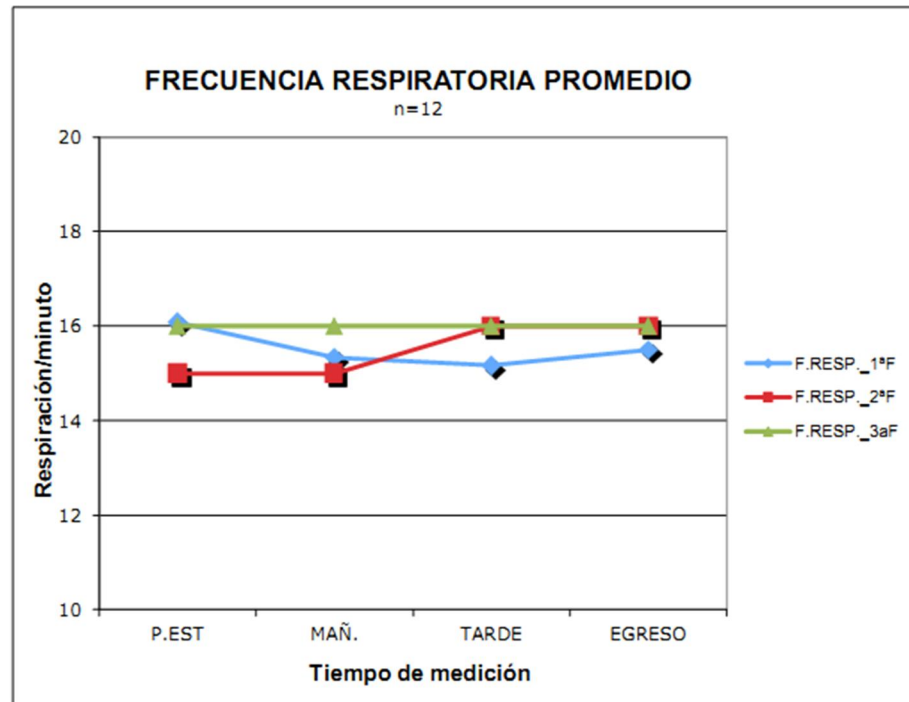


Figura 7. Gráfica de la frecuencia respiratoria promedio durante el estudio.



3.3 Número de muestras recolectadas.

Se recolectaron 15 muestras por cada sujeto de investigación en cada período durante las 16 horas de muestreo. El volumen de sangre total obtenido al final de los tres períodos del estudio fue de 225 mL.

3.4 Desviaciones al protocolo.

No se presentaron desviaciones al protocolo.

3.5 Efectos adversos.

No se presentaron reacciones adversas en ninguno de los sujetos de investigación.

3.6 Resultados de la validación del método analítico.

Selectividad.

Tabla 13. Selectividad, datos y evaluación.

Solución de Selectividad	Resultado (Área)	Criterio de Aceptación (Área)		Evaluación
SSH	22.97	<	222.695	Pasa
SSL	56.89	<	222.695	Pasa
SSP (1404235)	167.96	<	222.695	Pasa
SSP (1404236)	38.75	<	222.695	Pasa
SSP (1404237)	30.31	<	222.695	Pasa
SSP (1404238)	30.31	<	222.695	Pasa
SSP (1404239)	29.29	<	222.695	Pasa
SSP (1404240)	75.23	<	222.695	Pasa
SSF's				
Cafeína	25.55	<	222.695	Pasa
Paracetamol	0.00	<	222.695	Pasa
Diclofenaco	58.44	<	222.695	Pasa
Aspirina	24.04	<	222.695	Pasa
Naproxeno	65.55	<	222.695	Pasa
Loratadina	56.06	<	222.695	Pasa
Ibuprofeno	27.14	<	222.695	Pasa
SSA's				
Heparina sódica	33.36	<	222.695	Pasa
Citrato de Sodio	55.76	<	222.695	Pasa

Efecto de matriz para métodos por espectrometría de masas.

Tabla 14a. Respuestas obtenidas en blanco adicionado.

Respuesta de metformina en blanco adicionado procesado	Plasma 1	Plasma 2	Plasma 3	Plasma 4	Plasma 5	Plasma 6	SPL	SPH
SPNa. ₁	3,298.55	3,237.41	3,283.31	3,142.28	3,263.47	3,194.50	3,271.03	3,255.70
SPNa. ₃	21,991.16	22,312.50	21,846.54	22,131.52	21,860.55	21,986.31	22,332.12	22,014.77

Tabla 14b. Respuestas obtenidas para metformina en solución.

Respuesta de metformina en solución	Inyección 1	Inyección 2	Promedio
SEML ₁	3095.05	3105.06	3100.05
SEML ₃	21,558.09	21,794.62	21676.35

Tabla 14c. Factor de matriz normalizado.

FMN	Plasma 1	Plasma 2	Plasma 3	Plasma 4	Plasma 5	Plasma 6	SPL	SPH
Nivel Bajo (Sa1)	1.06	1.04	1.06	1.01	1.05	1.03	1.06	1.05
Nivel Alto (Sa3)	1.01	1.03	1.01	1.02	1.01	1.01	1.03	1.02

Tabla 14d. Resultado y evaluación de los datos obtenidos para el efecto de matriz para métodos por espectrometría de masas.

	FMN	Resultado (% CV)	Criterio de Aceptación	Evaluación
SPN	Concentración MCB	1.82	≤ 15	Pasa
SPN	Concentración MCA	0.80	≤ 15	Pasa
SPN + SPL	Concentración MCB	1.71	≤ 15	Pasa
SPN + SPL	Concentración MCA	0.90	≤ 15	Pasa
SPN + SPH	Concentración MCB	1.68	≤ 15	Pasa
SPN + SPH	Concentración MCA	0.73	≤ 15	Pasa

Efecto de acarreo para métodos por espectrometría de masas.

Tabla 15. Resultado y evaluación de los datos obtenidos para el efecto de acarreo para métodos por espectrometría de masas.

	Resultado (Área)	Criterio de aceptación (Área)	Evaluación
Blanco pool anterior al LSC	0.00	≤ 222.69	Pasa
Blanco pool posterior al LSC	28.84	≤ 222.69	Pasa
Blanco pool posterior al LSC	0.00	≤ 222.69	Pasa

Límite inferior de cuantificación. Se analizó bajo condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad. En cada caso se evaluó la precisión y exactitud.

Repetibilidad del LIC.

Tabla 16a. Datos obtenidos para la evaluación de repetibilidad para el límite inferior de cuantificación.

Datos						
Concentración (ng/mL)	Concentración calculada (ng/mL)					Promedio
78.88	84.27	81.73	79.69	86.23	85.14	83.41

Tabla 16b. Resultados y evaluación de repetibilidad para el límite inferior de cuantificación.

	Resultado	Criterio de Aceptación	Evaluación
% Coeficiente de Variación	3.2%	≤ 20%	Pasa
% de Error Absoluto	5.7%	≤ 20%	Pasa

Reproducibilidad del LIC.

Tabla 16c. Datos obtenidos para la evaluación de reproducibilidad para el límite inferior de cuantificación.

Datos						
78.88	Concentraciones calculadas (ng/mL)					Promedio
	69.30	70.42	75.62	67.50	73.37	71.24
	67.65	65.98	66.80	68.69	65.29	66.88
	67.91	68.03	65.07	68.36	67.23	67.32
					Promedio	68.48

Tabla 16d. Resultados y evaluación de reproducibilidad para el límite inferior de cuantificación.

	Resultado	Criterio de Aceptación	Evaluación
% Coeficiente de Variación	3.5%	≤ 20%	Pasa
% de Error Absoluto	13.2%	≤ 20%	Pasa

Curva de calibración.

Tabla 17a. Datos obtenidos para la evaluación la curva de calibración.

Área				
Concentración (ng/mL)	Curva de Calibración 1	Curva de Calibración 2	Curva de Calibración 3	Curva de Calibración 4
78.88	1,171.3	1,157.6	1,147.3	1,204.9
157.77	2,244.0	2,251.4	2,271.3	2,347.2
315.53	4,402.7	4,179.3	4,335.1	4,600.6
631.06	8,210.9	8,282.3	8,589.1	8,618.7
1,262.13	15,161.7	15,379.3	15,486.9	15,391.9
2,524.25	26,563.1	26,644.6	25,930.3	25,307.9
Pendiente	11.962	11.939	12.136	12.150
Ordenada al Origen	272.547	257.416	241.116	308.989

Tabla 17b. Resultados y evaluación del porcentaje de recuperación para la curva de calibración.

Porcentaje de recuperación en base a la concentración nominal				
Concentración (ng/mL)	Curva de Calibración 1	Curva de Calibración 2	Curva de Calibración 3	Curva de Calibración 4
78.88	75.1	75.4	74.7	73.7
157.77	164.8	167.0	167.3	167.8
315.53	345.3	328.5	337.3	353.2
631.06	663.6	672.2	687.9	683.9
1,262.13	1,244.7	1,266.6	1,256.2	1,241.4
2,524.25	2,197.9	2,210.2	2,116.8	2,057.5

Tabla 17c. Resultados del porcentaje de error absoluto para la curva de calibración.

% Error absoluto				
Concentración (ng/mL)	Curva de Calibración 1	Curva de Calibración 2	Curva de Calibración 3	Curva de Calibración 4
78.88	4.7	4.4	5.3	6.5
157.77	4.5	5.9	6.0	6.3
315.53	9.4	4.1	6.9	11.9
631.06	5.2	6.5	9.0	8.4
1,262.13	1.4	0.4	0.5	1.6
2,524.25	12.9	12.4	16.1	18.5

Tabla 17d. Evaluación del porcentaje de error absoluto para la curva de calibración.

Evaluación respecto al % error absoluto					
Concentración (ng/mL)	Criterio de aceptación % error absoluto (\leq)	Curva de Calibración 1	Curva de Calibración 2	Curva de Calibración 3	Curva de Calibración 4
78.88	20	pasa	pasa	pasa	pasa
157.77	15	pasa	pasa	pasa	pasa
315.53	15	pasa	pasa	pasa	pasa
631.06	15	pasa	pasa	pasa	pasa
1,262.13	15	pasa	pasa	pasa	pasa
2,524.25	15	pasa	pasa	No pasa	pasa

Tabla 17e. Evaluación respecto al porcentaje de réplicas que cumplen con el criterio de aceptación.

Evaluación respecto al porcentaje de réplicas que cumplen el criterio de aceptación		
Porcentaje de réplicas que cumplen el criterio de aceptación	Porcentaje de réplicas que deben cumplir el criterio de aceptación	Evaluación
100	50	pasa
100	50	pasa
100	50	pasa
100	50	pasa
100	50	pasa
50	50	pasa

Precisión y exactitud a condiciones de repetibilidad.

Tabla 18a. Datos obtenidos para la evaluación de precisión y exactitud a condiciones de repetibilidad.

Datos						
Concentración (ng/mL)	Concentración obtenida (ng/mL)					Promedio
	1	2	3	4	5	
236.65	276.32	264.72	264.44	271.24	276.59	270.66
473.30	490.61	479.62	491.67	473.39	524.37	491.93
1,893.19	1,713.12	1,656.18	1,745.56	1,715.64	1,801.72	1,726.45
1,893.19	1,878.36	1,852.38	1,856.04	1,894.13	1,830.13	1,862.21

Tabla 18b. Resultados y evaluación de precisión a condiciones de repetibilidad.

Concentración (ng/mL)	% Coeficiente de variación	Criterio de aceptación	Evaluación
236.65	2.2	≤ 15%	Pasa
473.30	4.0	< 15%	Pasa
1,893.19	3.1	< 15%	Pasa
1,893.19	1.3	< 15%	Pasa

Tabla 18c. Resultados y evaluación de exactitud a condiciones de repetibilidad.

Concentración esperada (ng/mL)	Concentración obtenida (ng/mL)	% Desviación	Criterio de aceptación	Evaluación
236.65	270.66	14.4%	≤ 15%	Pasa
473.30	491.93	3.9%	< 15%	Pasa
1,893.19	1,726.45	8.8%	< 15%	Pasa
1,893.19	1,862.21	1.6%	< 15%	Pasa

Precisión y exactitud a condiciones de reproducibilidad.

Tabla 19a. Datos obtenidos para la evaluación de precisión y exactitud a condiciones de reproducibilidad.

Datos					
236.65 ng/mL					
1	2	3	4	5	Promedio
277.15	280.75	262.46	257.30	262.48	268.03
516.50	470.39	530.92	496.16	518.39	506.47
1,778.73	1,685.57	1,683.74	1,715.07	1,691.45	1,710.91
473.30 ng/mL					
1	2	3	4	5	Promedio
264.79	265.53	270.39	267.79	256.89	267.12
522.36	512.71	493.84	511.68	499.70	510.15
1,795.74	1,777.08	1,751.79	1,736.12	1,750.34	1,765.18
1893.19 ng/mL					
1	2	3	4	5	Promedio
272.26	277.21	266.48	260.78	259.54	267.25
516.34	N.A.	518.21	504.64	512.35	512.89
1,813.37	1,797.13	1,808.33	1,751.50	1,836.67	1,801.40

Tabla 19b. Resultados y evaluación de precisión a condiciones de reproducibilidad.

Concentración (ng/mL)	% Coeficiente de variación	Criterio de aceptación	Evaluación
236.65	0.18%	≤ 15%	Pasa
473.30	0.63%	< 15%	Pasa
1,893.19	2.59%	< 15%	Pasa

Tabla 19c. Resultados y evaluación de exactitud a condiciones reproducibilidad.

Concentración esperada (ng/mL)	Concentración obtenida (ng/mL)	% Desviación	Criterio de aceptación	Evaluación
236.65	267.47	13.02%	≤ 15%	Pasa
473.30	509.83	7.72%	< 15%	Pasa
1,893.19	1,759.16	7.08%	< 15%	Pasa

Estabilidad de la muestra a corto plazo.

Tabla 20a. Datos obtenidos para la evaluación de la estabilidad a corto plazo.

Datos									
236.65 ng/mL	Concentración obtenida (ng/mL)			Promedio	1,893.19 ng/mL	Concentración obtenida (ng/mL)			Promedio
Referencia	262.66	251.74	270.28	261.56	Referencia	1,755.13	1,741.25	1,723.10	1,739.83
Corto plazo	262.94	259.91	255.87	261.42	Corto plazo	1,801.44	1,757.93	1,739.57	1,766.31

Tabla 20b. Evaluación de exactitud para la referencia de estabilidad a corto plazo.

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración obtenida de la referencia (ng/mL)	% Desviación	Criterio de aceptación	Evaluación
236.65	261.56	10.53%	≤ 15%	Pasa
1,893.19	1,739.83	8.10%	< 15%	Pasa

Tabla 20c. Evaluación de exactitud para las soluciones de prueba de estabilidad a corto plazo.

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración obtenida de la prueba (ng/mL)	% Desviación	Criterio de aceptación	Evaluación
236.65	261.42	10.47%	≤ 15%	Pasa
1,893.19	1,766.31	6.70%	< 15%	Pasa

Estabilidad de la muestra a largo plazo.

Tabla 21a. Datos obtenidos para la evaluación de la estabilidad a largo plazo (18 días).

Datos									
236.65 ng/mL	Concentración obtenida (ng/mL)			Promedio	1,893.19 ng/mL	Concentración obtenida (ng/mL)			Promedio
Referencia	238.95	260.82	243.99	247.92	Referencia	1,761.77	1,766.58	1,785.73	1,771.36
18 días	258.37	256.55	271.32	262.08	18 días	1,802.61	1,784.67	1,756.58	1,781.29

Tabla 21b. Datos obtenidos para la evaluación de la estabilidad a largo plazo (29 días).

Datos									
236.65 ng/mL	Concentración obtenida (ng/mL)			Promedio	1,893.19 ng/mL	Concentración obtenida (ng/mL)			Promedio
Referencia	232.18	249.47	244.48	242.04	Referencia	1,815.46	1,772.09	1,731.54	1,773.03
29 días	261.12	267.01	278.15	268.76	29 días	1,717.19	1,751.23	1,724.52	1,730.98

Tabla 21c. Evaluación de exactitud para las referencias de estabilidad a largo plazo (18 días).

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración obtenida de la referencia (ng/mL)	% Desviación	Criterio de aceptación	Evaluación
236.65	247.92	4.76%	≤ 15%	Pasa
1,893.19	1,771.36	6.44%	< 15%	Pasa

Tabla 21d. Evaluación de exactitud para las soluciones de prueba de estabilidad a largo plazo (18 días).

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración obtenida de la prueba (ng/mL)	% Desviación	Criterio de aceptación	Evaluación
236.65	262.08	10.74%	≤ 15%	Pasa
1,893.19	1,781.29	5.91%	< 15%	Pasa

Tabla 21e. Evaluación de exactitud para las referencias de estabilidad a largo plazo (29 días).

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración obtenida de la referencia (ng/mL)	% Desviación	Criterio de aceptación	Evaluación
236.65	242.04	2.28%	≤ 15%	Pasa
1,893.19	1,773.03	6.35%	< 15%	Pasa

Tabla 21f. Evaluación de exactitud para las soluciones de prueba de estabilidad a largo plazo (29 días).

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración obtenida de la prueba (ng/mL)	% Desviación	Criterio de aceptación	Evaluación
236.65	268.76	13.57%	≤ 15%	Pasa
1,893.19	1,730.98	8.57%	< 15%	Pasa

Estabilidad de la muestra procesada.

Tabla 22a. Datos obtenidos para la evaluación de la estabilidad de la muestra procesada, a las 24 y 72h.

Condiciones	Nivel Bajo				Nivel Alto			
	236.65 ng/mL				1,893.19 ng/mL			
	1	2	3	Promedio	1	2	3	Promedio
Referencia (24 h)	263.75	267.27	276.95	269.32	1,730.47	1,718.02	1,775.04	1,741.18
Temperatura ambiente (24 h)	271.55	266.65	261.41	266.54	1,775.22	1,767.19	1,742.30	1,761.57
≤ 5 °C (24 h)	264.98	263.12	265.91	264.67	1,816.35	1,778.63	1,791.31	1,795.43
Referencia (72 h)	263.69	257.74	264.48	261.97	1,755.13	1,741.25	1,723.10	1,739.83
≤ 5 °C (72 h)	266.80	266.33	274.10	269.08	1,810.13	1,787.07	1,767.46	1,788.22

Tabla 22b. Evaluación de exactitud para estabilidad de la muestra procesada, a las 24 y 72h.

Condiciones	Resultado Nivel Bajo	Resultado Nivel Alto	Criterio de Aceptación	Evaluación Nivel Bajo	Evaluación Nivel Alto
Referencia (24 h)	13.8%	8.0%	≤ 15 %	Pasa	Pasa
Temperatura Ambiente (24 h)	12.6%	7.0%	≤ 15 %	Pasa	Pasa
≤ 5 °C (24 h)	11.8%	5.2%	≤ 15 %	Pasa	Pasa
Referencia (72 h)	10.7%	8.1%	≤ 15 %	Pasa	Pasa
≤ 5 °C (72 h)	13.7%	5.5%	≤ 15 %	Pasa	Pasa

Estabilidad en el automuestreador.

Tabla 23a. Datos obtenidos para la evaluación de la estabilidad en el automuestreador hasta las 24h.

Datos									
236.65 ng/mL	Concentración obtenida (ng/mL)			Promedio	1,893.19 ng/mL	Concentración obtenida (ng/mL)			Promedio
0 h	263.75	267.27	276.95	269.32	0 h	1,748.91	1,740.93	1,734.16	1,741.34
8 h	253.37	260.11	261.37	258.28	8 h	1,638.94	1,613.68	1,584.76	1,612.46
16 h	249.31	257.26	259.89	255.49	16 h	1,596.21	1,584.19	1,573.24	1,584.55
24 h	245.78	263.90	259.58	256.42	24 h	1,591.62	1,556.36	1,559.98	1,569.32

Tabla 23b. Evaluación de exactitud para estabilidad en el automuestreador (0h).

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración 0h	% Desviación	Criterio de aceptación	Evaluación
236.65	269.32	13.81%	≤ 15%	Pasa
1,893.19	1741.34	8.02%	< 15%	Pasa

Tabla 23c. Evaluación de exactitud para estabilidad en el automuestreador (24h).

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración 24h	% Desviación	Criterio de aceptación	Evaluación
236.65	259.88	9.81%	≤ 15%	Pasa
1,893.19	1626.92	14.06%	< 15%	Pasa

Estabilidad en función de los ciclos de congelación y descongelación.

Tabla 24a. Datos obtenidos para la evaluación de la estabilidad en función de los ciclos de congelación y descongelación.

Concentración nominal ng/mL	1er ciclo			Promedio	2º ciclo			Promedio	3er ciclo			Promedio
236.65	266.22	262.25	262.48	263.65	270.50	267.55	273.36	269.02	277.17	262.77	254.65	264.86
1,893.19	1,736.56	1,754.67	1,739.18	1743.47	1,739.86	1,731.93	1,770.55	1,747.45	1,691.36	1,718.43	1,702.24	1,704.01

Tabla 24b. Evaluación de exactitud para estabilidad en función de los ciclos de congelación y descongelación (1er ciclo).

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración 1er ciclo (ng/mL)	% Desviación	Criterio de aceptación	Evaluación
236.65	263.65	11.41%	≤ 15%	Pasa
1,893.19	1743.47	7.91%	< 15%	Pasa

Tabla 24c. Evaluación de exactitud para estabilidad en función de los ciclos de congelación y descongelación (2º ciclo).

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración 2º ciclo (ng/mL)	% Desviación	Criterio de aceptación	Evaluación
236.65	269.02	13.68%	≤ 15%	Pasa
1,893.19	1747.45	7.70%	< 15%	Pasa

Tabla 24d. Evaluación de exactitud para estabilidad en función de los ciclos de congelación y descongelación (3er ciclo).

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración 3er ciclo (ng/mL)	% Desviación	Criterio de aceptación	Evaluación
236.65	264.86	11.92%	≤ 15%	Pasa
1,893.19	1704.01	9.99%	< 15%	Pasa

Estabilidad del analito en solución.

Tabla 25a. Datos obtenidos para la evaluación de la estabilidad del analito en solución (23 días).

Datos									
78.88 ng/mL	Área			Promedio	2,524.25 ng/mL	Área			Promedio
Referencia	1,881.51	1,818.34	1,830.38	1843.41	Referencia	38,277.80	38,450.81	38,270.19	38332.93
23 días	1,957.47	2,000.73	1,946.03	1968.08	23 días	38,980.25	39,672.70	41,087.76	39913.57

Tabla 25b. Datos obtenidos para la evaluación de la estabilidad del analito en solución (36 días).

Datos									
78.88 ng/mL	Área			Promedio	2,524.25 ng/mL	Área			Promedio
Referencia	1,400.42	1,344.08	1,510.82	1418.44	Referencia	46,609.31	45,501.53	45,723.99	46055.42
36 días	1,521.55	1,519.96	1,538.00	1526.51	36 días	46,229.64	44,061.77	43,637.06	45145.70

Tabla 25c. Evaluación de exactitud para la estabilidad del analito en solución (23 días).

Concentración nominal (ng/mL)	% Desviación absoluta de la respuesta analítica promedio	Criterio de aceptación	Evaluación
78.88	6.76%	≤ 10%	Pasa
2,524.25	4.12%	< 10%	Pasa

Tabla 25d. Evaluación de exactitud para la estabilidad del analito en solución (36 días).

Concentración nominal (ng/mL)	% Desviación absoluta de la respuesta analítica promedio	Criterio de aceptación	Evaluación
78.88	7.62%	≤ 10%	Pasa
2,524.25	1.98%	< 10%	Pasa

Límite de detección.

Tabla 26a. Datos obtenidos para la evaluación del límite de detección (relación señal/ruido proporcionada por el software del equipo).

Relación Señal/Ruido de SC 19.72 ng/mL	Datos			Promedio
	40.72	45.47	40.16	42.12

Tabla 26b. Evaluación de la relación señal/ruido.

	Resultado	Criterio de Aceptación	Evaluación
Relación Señal/Ruido	42.12	≥ 3	Pasa

3.7 Resultados del control de calidad durante la validación del método analítico.

3.7.1 Verificación de la adecuabilidad del sistema analítico de medición.

Tabla 27a. Datos obtenidos para solución de verificación de la adecuabilidad del sistema analítico de medición.

Concentración 236.53 ng/mL	Tiempo de Retención (Bomba-Columna)			Área (Inyector-Detector)			Ancho del pico a la mitad de la altura (Columna)			
	Fecha	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	2014-05-08	1.806	1.806	1.806	6864.958	6738.812	6711.101	0.049	0.049	0.049
	2014-05-09	1.803	1.803	1.803	7054.356	7145.103	7069.424	0.049	0.049	0.049
	2014-05-13	1.813	1.813	1.816	7738.662	7698.900	7626.499	0.049	0.049	0.049
	2014-05-16	1.779	1.779	1.782	7108.072	7143.769	7180.876	0.047	0.048	0.048
	2014-05-19	1.782	1.792	1.803	7158.562	7219.705	7279.803	0.048	0.047	0.048
	2014-05-20	1.813	1.813	1.813	8095.939	8043.753	7997.688	0.049	0.049	0.048
	2014-05-23	1.775	1.775	1.775	6568.486	6555.589	6545.076	0.047	0.048	0.048
	2014-06-05	1.772	1.772	1.772	5874.691	5482.184	5444.177	0.047	0.047	0.046
	2014-06-06	1.775	1.769	1.769	6521.367	6400.010	6512.865	0.047	0.047	0.046

Tabla 27b. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-05-08.

Número de réplica	Tiempo de Retención
1	1.806
2	1.806
3	1.806
% CV	0.000%
Criterio de Aceptación	≤ 5%
Evaluación	Pasa



Tabla 27c. Evaluación del área del día 2014-05-08.

Número de réplica	Area
1	6864.958
2	6738.812
3	6711.101
% CV	1.211%
Criterio de Aceptación	≤ 5%
Evaluación	Pasa

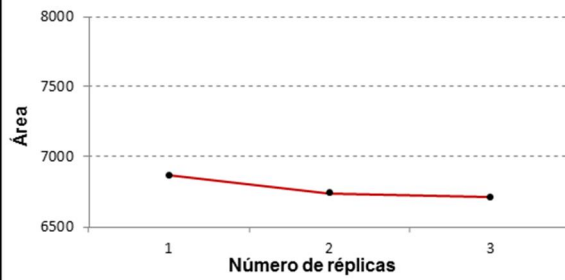


Tabla 27d. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-05-08.

Número de réplica	Ancho de pico a la mitad de la altura
1	0.049
2	0.049
3	0.049
% CV	0.218%
Criterio de Aceptación	≤ 5%
Evaluación	Pasa

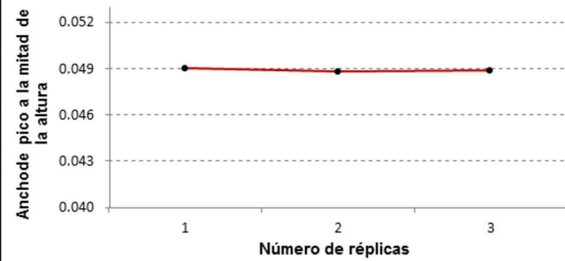


Tabla 27e. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-05-09.

Número de réplica	Tiempo de Retención
1	1.803
2	1.803
3	1.803
% CV	0.000%
Criterio de Aceptación	≤ 5%
Evaluación	Pasa

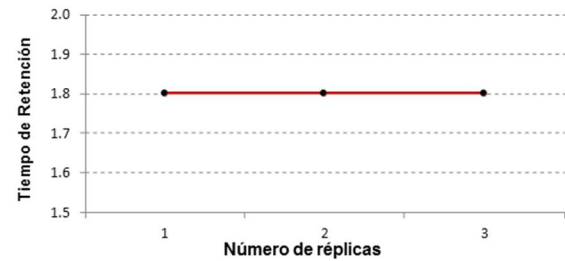


Tabla 27f. Evaluación del área del día 2014-05-09.

Número de réplica	Area
1	7054.356
2	7145.103
3	7069.424
% CV	0.686%
Criterio de Aceptación	≤ 5%
Evaluación	Pasa

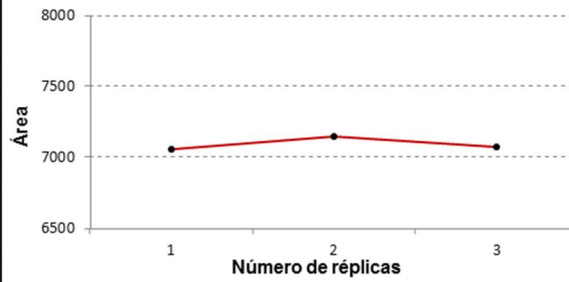


Tabla 27g. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-05-09.

Número de réplica	Ancho de pico a la mitad de la altura
1	0.049
2	0.049
3	0.049
% CV	0.634%
Criterio de Aceptación	≤ 5%
Evaluación	Pasa

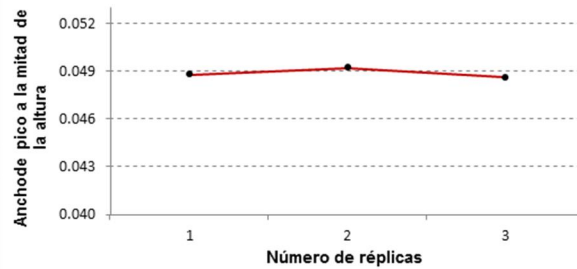


Tabla 27h. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-05-13.

Número de réplica	Tiempo de Retención
1	1.813
2	1.813
3	1.816
% CV	0.108%
Criterio de Aceptación	≤ 5%
Evaluación	Pasa



Tabla 27i. Evaluación del área del día 2014-05-13.

Número de réplica	Area
1	7738.662
2	7698.900
3	7626.499
% CV	0.740%
Criterio de Aceptación	$\leq 5\%$
Evaluación	Pasa

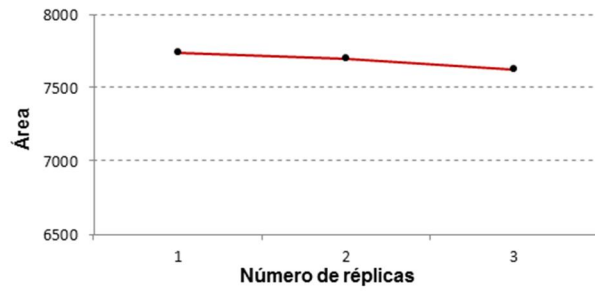


Tabla 27j. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-05-13.

Número de réplica	Ancho de pico a la mitad de la altura
1	0.049
2	0.049
3	0.049
% CV	0.337%
Criterio de Aceptación	$\leq 5\%$
Evaluación	Pasa

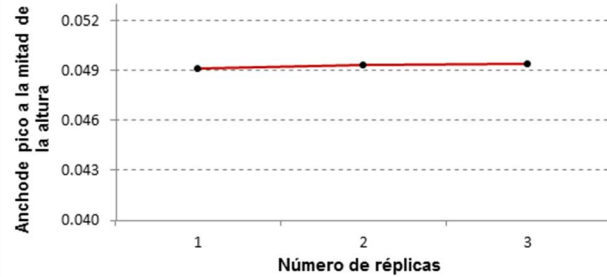


Tabla 27k. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-05-16.

Número de réplica	Tiempo de Retención
1	1.779
2	1.779
3	1.782
% CV	0.110%
Criterio de Aceptación	$\leq 5\%$
Evaluación	Pasa

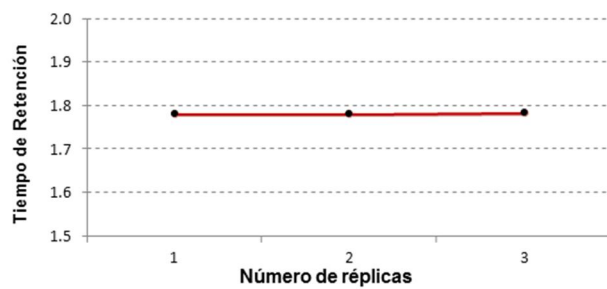


Tabla 27l. Evaluación del área del día 2014-05-16.

Número de réplica	Area
1	7108.072
2	7143.769
3	7180.876
% CV	0.510%
Criterio de Aceptación	$\leq 5\%$
Evaluación	Pasa

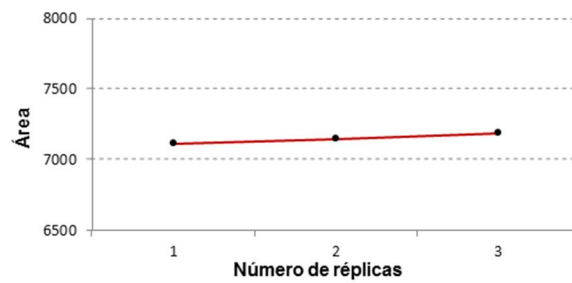


Tabla 27m. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-05-16.

Número de réplica	Ancho de pico a la mitad de la altura
1	0.047
2	0.048
3	0.048
% CV	0.473%
Criterio de Aceptación	$\leq 5\%$
Evaluación	Pasa

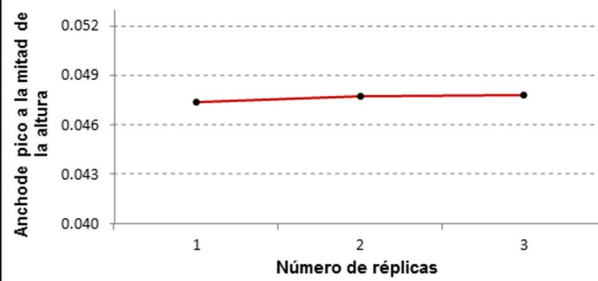


Tabla 27n. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-05-19.

Número de réplica	Tiempo de Retención
1	1.782
2	1.792
3	1.803
% CV	0.568%
Criterio de Aceptación	$\leq 5\%$
Evaluación	Pasa



Tabla 27ñ. Evaluación del área del día 2014-05-19.

Número de réplica	Area
1	7158.562
2	7219.705
3	7279.803
% CV	0.840%
Criterio de Aceptación	≤ 5%
Evaluación	Pasa

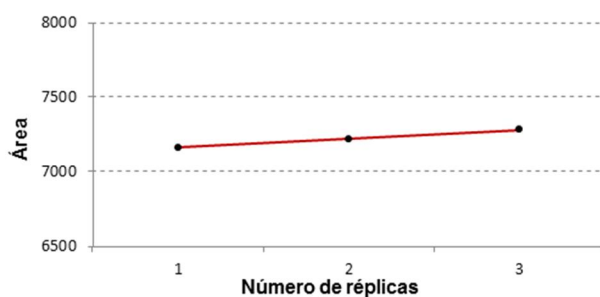


Tabla 27o. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-05-19.

Número de réplica	Ancho de pico a la mitad de la altura
1	0.048
2	0.047
3	0.048
% CV	1.038%
Criterio de Aceptación	≤ 5%
Evaluación	Pasa

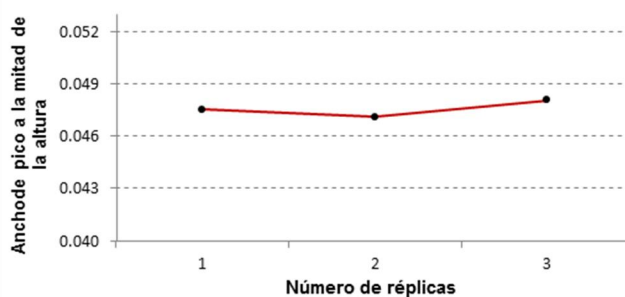


Tabla 27p. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-05-20.

Número de réplica	Tiempo de Retención
1	1.813
2	1.813
3	1.813
% CV	0.000%
Criterio de Aceptación	≤ 5%
Evaluación	Pasa



Tabla 27q. Evaluación del área del día 2014-05-20.

Número de réplica	Area
1	8095.939
2	8043.753
3	7997.688
% CV	0.611%
Criterio de Aceptación	$\leq 5\%$
Evaluación	Pasa

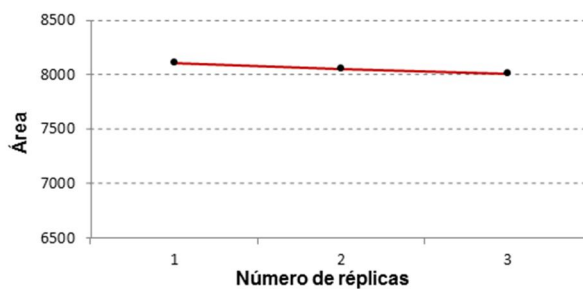


Tabla 27r. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-05-20.

Número de réplica	Ancho de pico a la mitad de la altura
1	0.049
2	0.049
3	0.048
% CV	0.557%
Criterio de Aceptación	$\leq 5\%$
Evaluación	Pasa

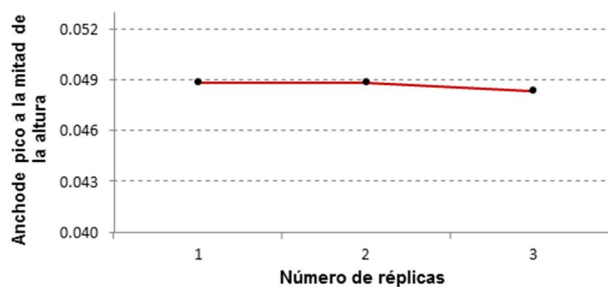


Tabla 27s. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-05-23.

Número de réplica	Tiempo de Retención
1	1.775
2	1.775
3	1.775
% CV	0.000%
Criterio de Aceptación	$\leq 5\%$
Evaluación	Pasa

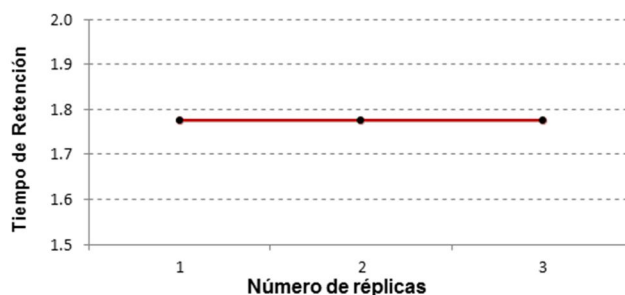


Tabla 27t. Evaluación del área del día 2014-05-23.

Número de réplica	Area
1	6568.486
2	6555.589
3	6545.076
% CV	0.179%
Criterio de Aceptación	$\leq 5\%$
Evaluación	Pasa

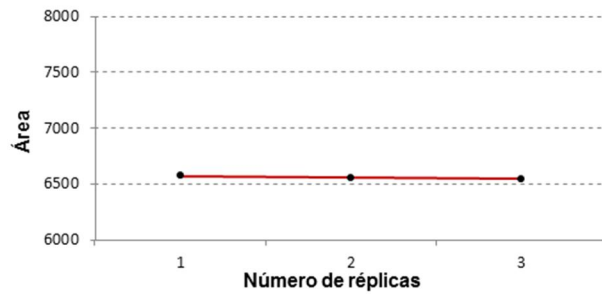


Tabla 27u. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-05-23.

Número de réplica	Ancho de pico a la mitad de la altura
1	0.047
2	0.048
3	0.048
% CV	0.267%
Criterio de Aceptación	$\leq 5\%$
Evaluación	Pasa



Tabla 27v. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-06-05.

Número de réplica	Tiempo de Retención
1	1.772
2	1.772
3	1.772
% CV	0.000%
Criterio de Aceptación	$\leq 5\%$
Evaluación	Pasa



Tabla 27w. Evaluación del área del día 2014-06-05.

Número de réplica	Area
1	5874.691
2	5482.184
3	5444.177
% CV	4.256%
Criterio de Aceptación	$\leq 5\%$
Evaluación	Pasa

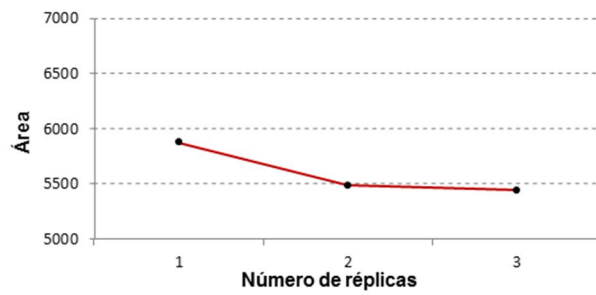


Tabla 27x. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-06-05.

Número de réplica	Ancho de pico a la mitad de la altura
1	0.047
2	0.047
3	0.046
% CV	1.143%
Criterio de Aceptación	$\leq 5\%$
Evaluación	Pasa

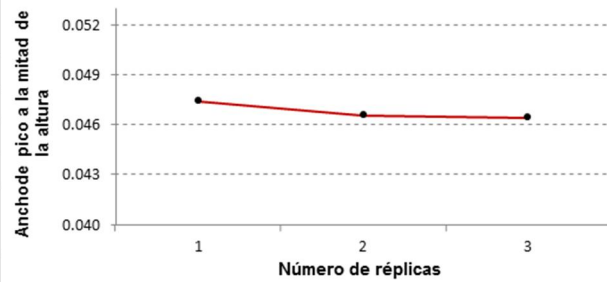


Tabla 27y. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-06-06.

Número de réplica	Tiempo de Retención
1	1.775
2	1.769
3	1.769
% CV	0.221%
Criterio de Aceptación	$\leq 5\%$
Evaluación	Pasa



Tabla 27z. Evaluación del área del día 2014-06-06.

Número de réplica	Area
1	6521.367
2	6400.010
3	6512.865
% CV	1.046%
Criterio de Aceptación	≤ 5%
Evaluación	Pasa

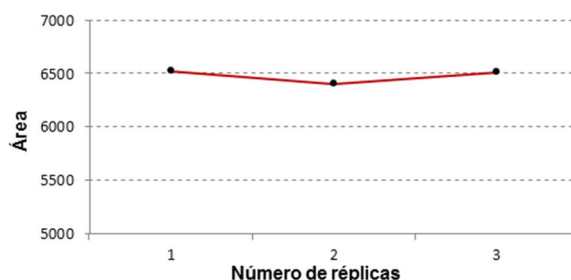
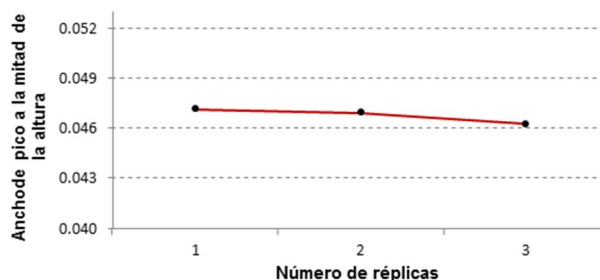


Tabla 27za. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-06-06.

Número de réplica	Ancho de pico a la mitad de la altura
1	0.047
2	0.047
3	0.046
% CV	1.002%
Criterio de Aceptación	≤ 5%
Evaluación	Pasa



3.7.2 Verificación de la curva de calibración.

Tabla 28a. Evaluación de la curva de calibración 2014-05-08.

Curva de calibración del 2014-05-08 (Modelo matemático de tipo lineal con ponderación)			
Concentración (ng/mL)	Área	Concentración Obtenida (ng/mL)	Desviación (% de Error)
78.88	1,111.27	67.8	14.1
157.77	2,001.74	153.3	2.8
315.53	4,013.63	346.6	-9.9
631.06	7,505.13	682.1	-8.1
1,262.13	13,962.18	1,302.6	-3.2
2,524.25	25,562.10	2,417.2	4.2
Parámetro	Valor obtenido	Criterio de aceptación	Evaluación
% Desviación (% error absoluto)	14.1	≤ 15% (absoluto)	Pasa

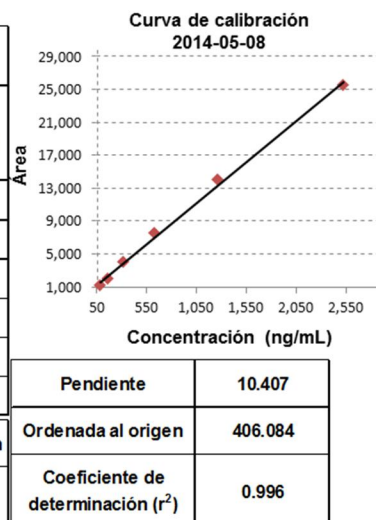


Tabla 28b. Evaluación de la curva de calibración 2014-05-09.

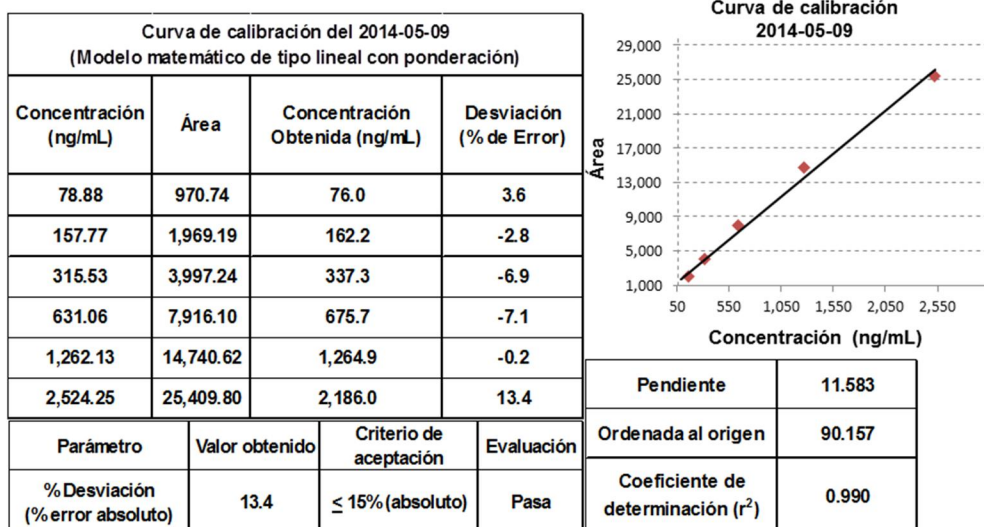


Tabla 28c. Evaluación de la curva de calibración 2014-05-13.

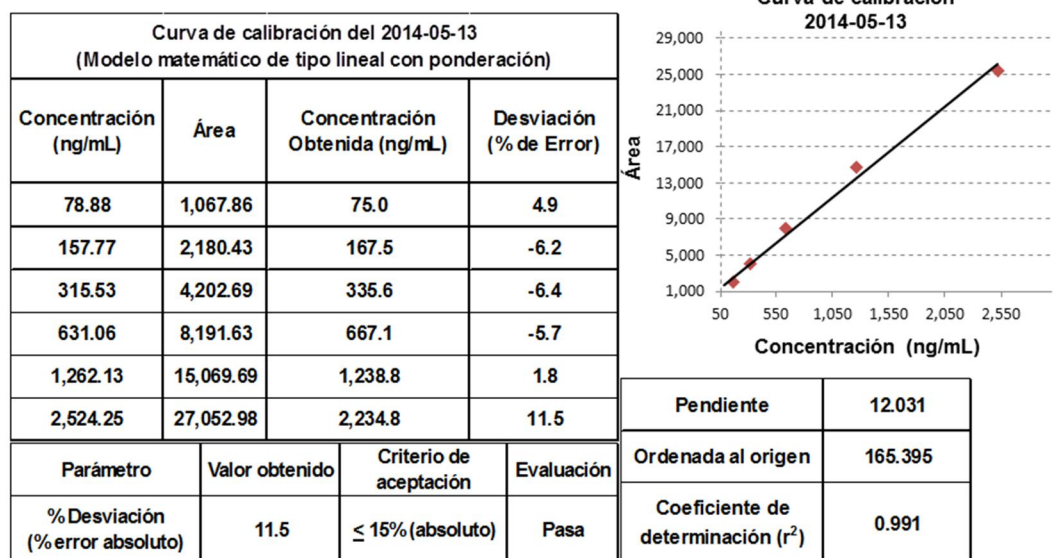


Tabla 28d. Evaluación de la curva de calibración 2014-05-16.

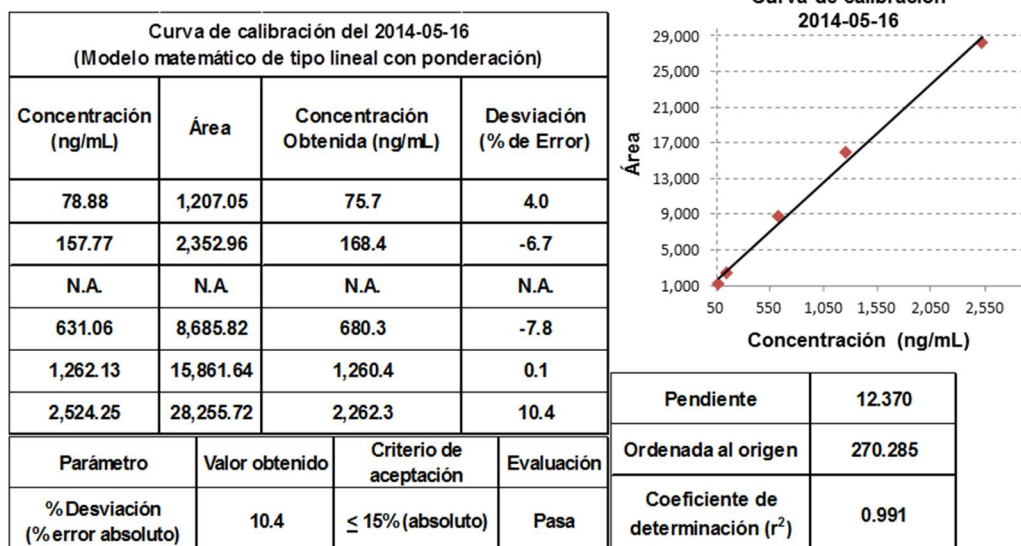


Tabla 28e. Evaluación de la curva de calibración 2014-05-20.

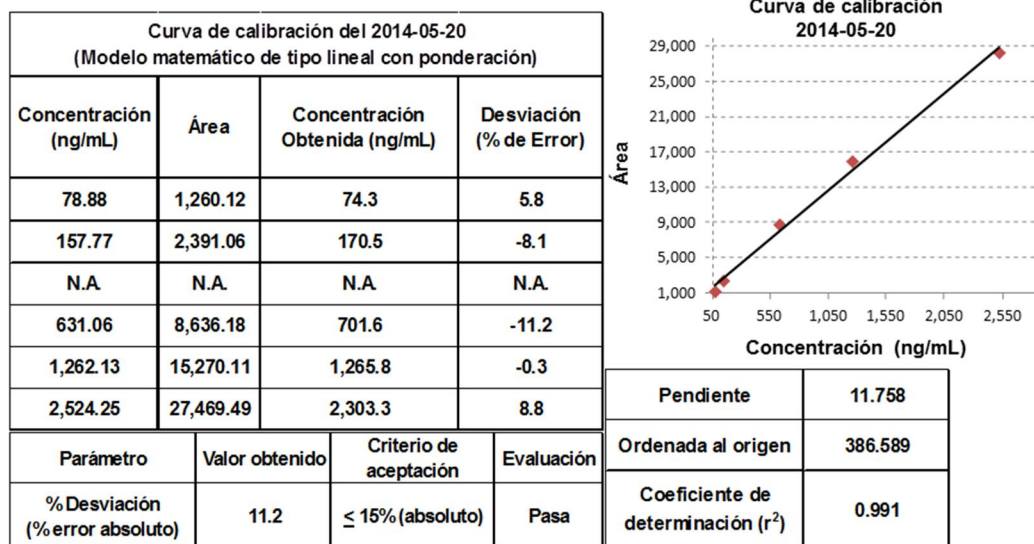


Tabla 28f. Evaluación de la curva de calibración 2014-05-23(I).

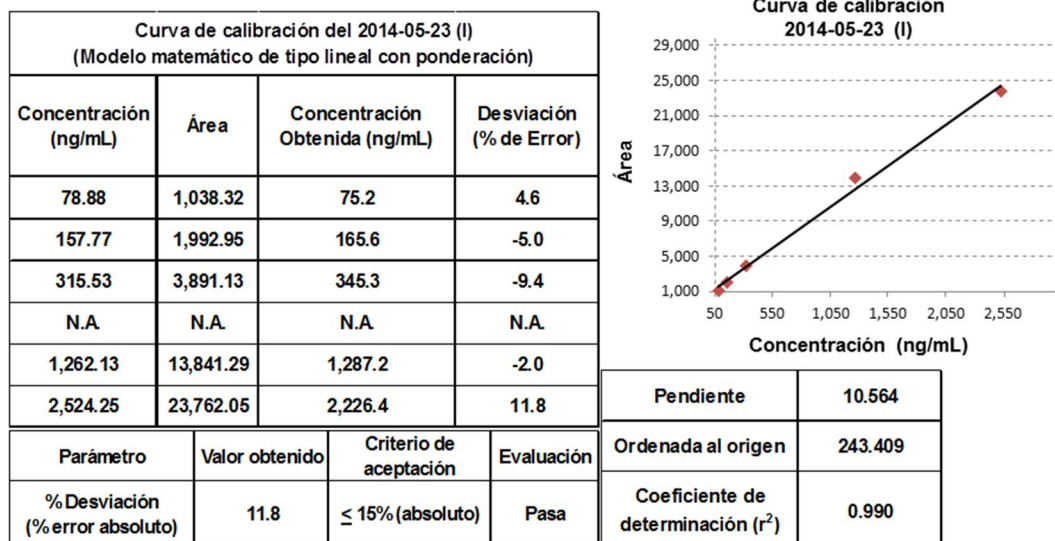


Tabla 28g. Evaluación de la curva de calibración 2014-05-23(II).

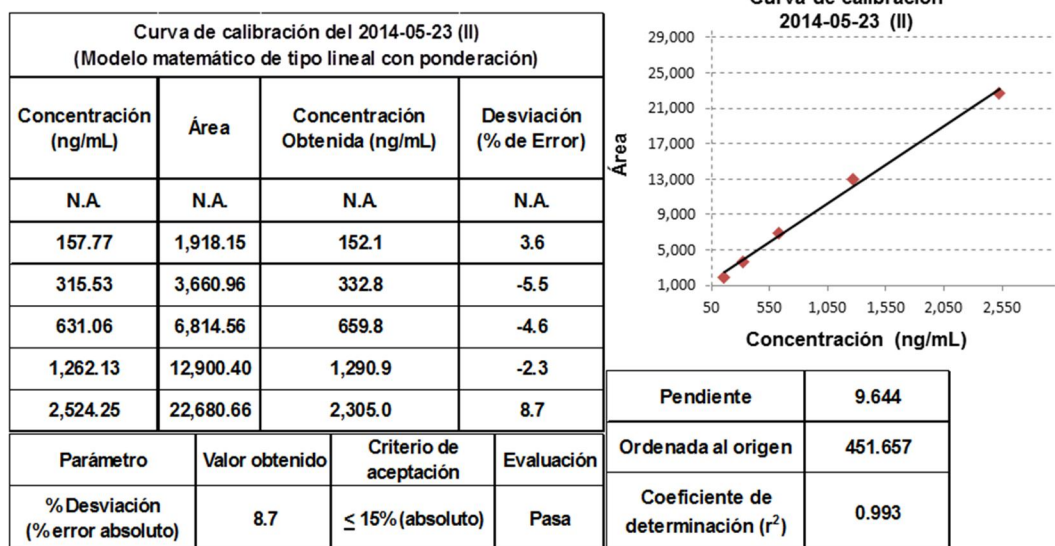


Tabla 28h. Evaluación de la curva de calibración 2014-06-05(I).

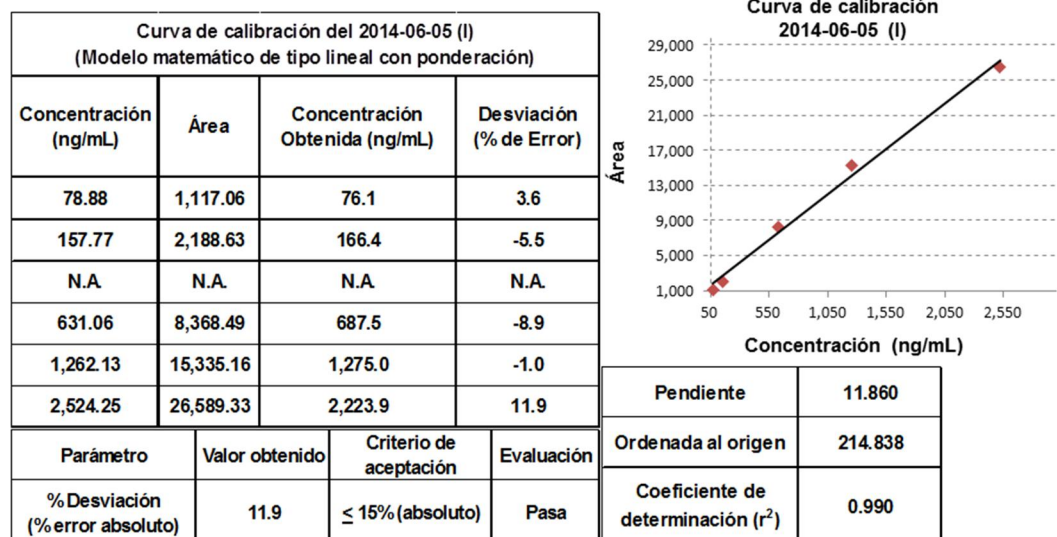
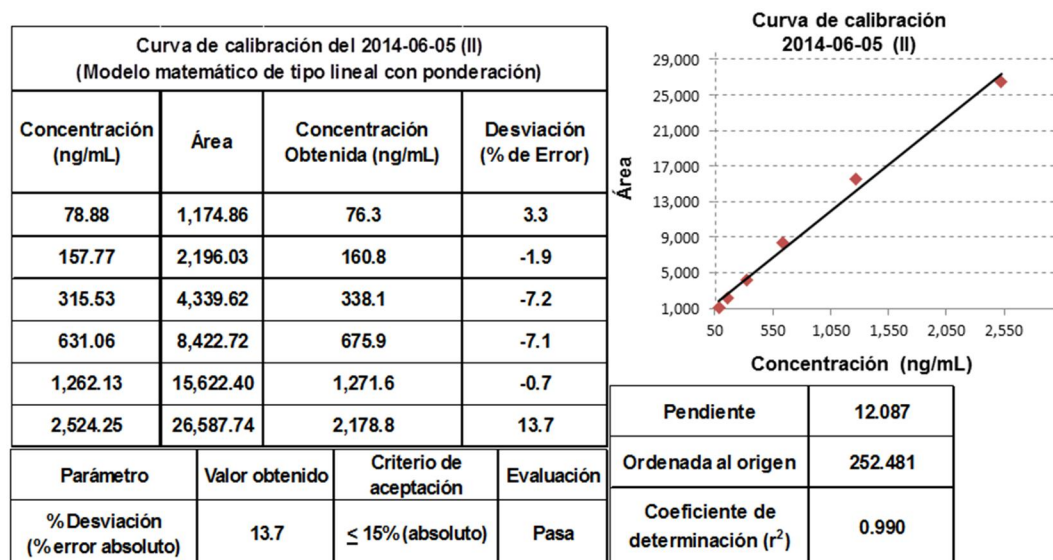


Tabla 28i. Evaluación de la curva de calibración 2014-06-05(II).



3.8 Resultados del análisis de muestras biológicas.

Tabla 29. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina:
Medicamento A, B, y C - Sujeto de investigación 01.

SUJETO 01			
Muestreo [horas]	MEDICAMENTO A (ng/mL)	MEDICAMENTO B (ng/mL)	MEDICAMENTO C (ng/mL)
0.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.
0.25	< L.C.	< L.C.	< L.C.
0.50	168.46	205.59	171.08
0.75	258.21	315.19	433.62
1.00	367.79	289.61	692.92
1.50	448.79	435.74	647.51
2.00	638.34	746.08	794.10
2.50	683.59	889.73	976.25
3.00	761.97	942.51	1129.89
3.50	834.44	912.11	1214.14
4.00	807.94	881.41	1134.17
6.00	390.32	439.48	597.17
8.00	178.80	219.35	318.46
12.00	< L.C.	< L.C.	94.66
16.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.

< L.C. = Menor al límite de cuantificación (78.88 ng/mL)

Tabla 30. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina:

Medicamento A, B, y C - Sujeto de investigación 02.

SUJETO 02			
Muestreo [horas]	MEDICAMENTO A (ng/mL)	MEDICAMENTO B (ng/mL)	MEDICAMENTO C (ng/mL)
0.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.
0.25	< L.C.	< L.C.	< L.C.
0.50	215.01	215.70	166.40
0.75	472.80	512.60	427.91
1.00	663.96	560.97	574.51
1.50	721.54	638.20	691.93
2.00	671.02	688.51	799.65
2.50	837.74	737.55	887.12
3.00	946.60	739.50	1005.56
3.50	946.71	806.00	1028.31
4.00	993.85	788.62	1193.46
6.00	712.54	516.20	766.35
8.00	422.10	299.61	461.67
12.00	138.14	95.67	149.11
16.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.
< L.C. = Menor al límite de cuantificación (78.88 ng/mL)			

Tabla 31. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina:

Medicamento A, B, y C - Sujeto de investigación 03.

SUJETO 03			
Muestreo [horas]	MEDICAMENTO A (ng/mL)	MEDICAMENTO B (ng/mL)	MEDICAMENTO C (ng/mL)
0.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.
0.25	< L.C.	< L.C.	< L.C.
0.50	387.19	< L.C.	< L.C.
0.75	643.33	275.69	402.11
1.00	645.42	492.72	649.03
1.50	468.43	794.89	912.25
2.00	566.59	913.78	971.76
2.50	869.73	924.76	914.56
3.00	908.36	1116.49	934.51
3.50	887.14	1108.86	950.23
4.00	880.97	1033.72	979.58
6.00	419.95	628.68	501.49
8.00	234.95	293.57	261.92
12.00	< L.C.	92.75	< L.C.
16.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.
< L.C. = Menor al límite de cuantificación (78.88 ng/mL)			

Tabla 32. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina:

Medicamento A, B, y C - Sujeto de investigación 04.

SUJETO 04			
Muestreo [horas]	MEDICAMENTO A (ng/mL)	MEDICAMENTO B (ng/mL)	MEDICAMENTO C (ng/mL)
0.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.
0.25	< L.C.	< L.C.	< L.C.
0.50	275.91	568.46	224.98
0.75	692.09	867.28	522.36
1.00	1063.99	1033.61	575.84
1.50	1278.87	1161.03	1034.25
2.00	1268.25	1409.86	1328.39
2.50	1443.49	1338.64	1440.63
3.00	1444.48	1293.79	1342.83
3.50	1273.58	1211.69	1294.98
4.00	1271.11	1127.01	1206.18
6.00	673.47	700.90	712.16
8.00	420.83	382.48	467.80
12.00	149.31	141.26	162.26
16.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.
< L.C. = Menor al límite de cuantificación (78.88 ng/mL)			

Tabla 33. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina:

Medicamento A, B, y C - Sujeto de investigación 05.

SUJETO 05			
Muestreo [horas]	MEDICAMENTO A (ng/mL)	MEDICAMENTO B (ng/mL)	MEDICAMENTO C (ng/mL)
0.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.
0.25	< L.C.	< L.C.	< L.C.
0.50	200.97	212.51	293.90
0.75	313.71	383.20	744.87
1.00	407.87	547.10	947.76
1.50	774.11	497.19	958.11
2.00	819.38	723.01	806.11
2.50	847.83	999.09	843.51
3.00	727.57	1035.11	812.46
3.50	889.23	1021.29	785.70
4.00	1101.47	1072.96	796.88
6.00	634.28	558.81	795.30
8.00	300.62	285.43	277.23
12.00	< L.C.	86.71	80.84
16.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.
< L.C. = Menor al límite de cuantificación (78.88 ng/mL)			

Tabla 34. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina:

Medicamento A, B, y C - Sujeto de investigación 06.

SUJETO 06			
Muestreo [horas]	MEDICAMENTO A (ng/mL)	MEDICAMENTO B (ng/mL)	MEDICAMENTO C (ng/mL)
0.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.
0.25	< L.C.	< L.C.	< L.C.
0.50	443.84	394.65	154.80
0.75	793.85	682.40	363.43
1.00	796.53	806.09	592.83
1.50	823.34	950.86	788.16
2.00	877.20	1006.16	812.87
2.50	836.47	1074.36	914.67
3.00	886.25	1027.18	968.30
3.50	940.97	939.12	897.65
4.00	877.95	833.79	823.15
6.00	452.15	458.02	456.71
8.00	235.13	223.73	228.62
12.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.
16.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.
< L.C. = Menor al límite de cuantificación (78.88 ng/mL)			

Tabla 35. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina:

Medicamento A, B, y C - Sujeto de investigación 07.

SUJETO 07			
Muestreo [horas]	MEDICAMENTO A (ng/mL)	MEDICAMENTO B (ng/mL)	MEDICAMENTO C (ng/mL)
0.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.
0.25	159.37	< L.C.	< L.C.
0.50	395.02	215.26	281.15
0.75	516.83	476.03	517.78
1.00	663.05	691.20	655.51
1.50	682.41	707.82	684.46
2.00	865.57	940.55	835.64
2.50	907.88	1010.06	1046.94
3.00	1104.88	1118.80	1058.45
3.50	974.16	978.69	948.17
4.00	894.37	882.76	867.99
6.00	422.50	478.58	391.15
8.00	215.29	277.31	218.77
12.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.
16.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.
< L.C. = Menor al límite de cuantificación (78.88 ng/mL)			

Tabla 36. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina:

Medicamento A, B, y C - Sujeto de investigación 08.

SUJETO 08			
Muestreo [horas]	MEDICAMENTO A (ng/mL)	MEDICAMENTO B (ng/mL)	MEDICAMENTO C (ng/mL)
0.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.
0.25	< L.C.	< L.C.	< L.C.
0.50	348.02	320.62	0.00
0.75	543.06	496.06	262.92
1.00	484.03	639.93	523.79
1.50	713.55	1102.86	779.89
2.00	854.60	1329.95	1114.37
2.50	922.97	1229.79	1184.30
3.00	1058.99	1207.40	1188.06
3.50	1161.91	1248.46	1185.38
4.00	1072.06	1097.86	1115.47
6.00	525.48	555.75	519.50
8.00	278.87	312.44	375.79
12.00	89.77	123.07	98.34
16.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.
< L.C. = Menor al límite de cuantificación (78.88 ng/mL)			

Tabla 37. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina:

Medicamento A, B, y C - Sujeto de investigación 09.

SUJETO 09			
Muestreo [horas]	MEDICAMENTO A (ng/mL)	MEDICAMENTO B (ng/mL)	MEDICAMENTO C (ng/mL)
0.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.
0.25	89.15	< L.C.	89.43
0.50	304.19	226.70	505.96
0.75	452.31	622.45	784.14
1.00	766.86	907.71	897.13
1.50	716.19	972.96	977.73
2.00	829.94	1119.80	895.76
2.50	859.50	1021.23	968.40
3.00	926.47	998.93	889.05
3.50	948.27	1101.60	990.41
4.00	1040.32	1191.90	1025.69
6.00	622.93	723.96	577.84
8.00	337.58	389.27	314.09
12.00	134.26	135.26	127.34
16.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.
< L.C. = Menor al límite de cuantificación (78.88 ng/mL)			

Tabla 38. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina:

Medicamento A, B, y C - Sujeto de investigación 10.

SUJETO 10			
Muestreo [horas]	MEDICAMENTO A (ng/mL)	MEDICAMENTO B (ng/mL)	MEDICAMENTO C (ng/mL)
0.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.
0.25	< L.C.	< L.C.	< L.C.
0.50	379.62	368.90	311.82
0.75	742.02	782.57	515.74
1.00	1037.45	960.65	581.57
1.50	1224.93	1056.01	868.28
2.00	1455.67	1254.08	1165.75
2.50	1421.33	1316.71	1087.64
3.00	1318.01	1485.29	1054.75
3.50	1298.88	1397.89	1278.79
4.00	1331.65	1345.99	1184.87
6.00	650.13	582.80	585.85
8.00	353.64	297.31	325.18
12.00	95.13	93.91	124.04
16.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.
< L.C. = Menor al límite de cuantificación (78.88 ng/mL)			

Tabla 39. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina:

Medicamento A, B, y C - Sujeto de investigación 11.

SUJETO 11			
Muestreo [horas]	MEDICAMENTO A (ng/mL)	MEDICAMENTO B (ng/mL)	MEDICAMENTO C (ng/mL)
0.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.
0.25	287.99	133.65	< L.C.
0.50	796.53	717.34	403.67
0.75	1280.13	956.34	672.44
1.00	1675.79	1368.20	1045.29
1.50	1881.27	1515.69	1482.41
2.00	1726.61	1178.89	1349.69
2.50	1366.39	1119.89	1005.02
3.00	1172.49	1044.20	1075.60
3.50	1148.46	1069.03	1044.80
4.00	1101.93	1056.34	1060.32
6.00	666.41	627.00	661.43
8.00	379.58	339.00	365.74
12.00	120.91	104.84	133.31
16.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.
< L.C. = Menor al límite de cuantificación (78.88 ng/mL)			

Tabla 40. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina:

Medicamento A, B, y C - Sujeto de investigación 12.

SUJETO 12			
Muestreo [horas]	MEDICAMENTO A (ng/mL)	MEDICAMENTO B (ng/mL)	MEDICAMENTO C (ng/mL)
0.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.
0.25	< L.C.	< L.C.	< L.C.
0.50	245.13	353.71	203.97
0.75	633.23	723.59	535.42
1.00	1094.35	935.30	755.67
1.50	873.88	940.45	1008.00
2.00	984.07	1102.05	1051.97
2.50	1068.74	1151.08	1166.91
3.00	1018.59	1048.84	1225.95
3.50	980.61	1091.67	1218.70
4.00	893.75	918.62	1190.34
6.00	473.06	483.43	676.19
8.00	271.77	253.64	404.57
12.00	104.64	93.71	115.40
16.00	< L.C.	< L.C.	< L.C.
< L.C. = Menor al límite de cuantificación (78.88 ng/mL)			

Tabla 41. Concentraciones obtenidas en el análisis de metformina:

Medicamento A, B, y C – Promedio de concentraciones.

PROMEDIO DE CONCENTRACIONES			
Muestreo [horas]	MEDICAMENTO A (ng/mL)	MEDICAMENTO B (ng/mL)	MEDICAMENTO C (ng/mL)
0.00	0.00	0.00	0.00
0.25	44.71	11.14	7.45
0.50	346.66	316.62	226.48
0.75	611.80	591.12	515.23
1.00	805.59	769.42	707.65
1.50	883.94	897.81	902.75
2.00	963.10	1034.39	993.84
2.50	1005.47	1067.74	1036.33
3.00	1022.89	1088.17	1057.12
3.50	1023.70	1073.87	1069.77
4.00	1022.28	1019.25	1048.18
6.00	553.60	562.80	603.43
8.00	302.43	297.76	334.99
12.00	69.35	80.60	90.44
16.00	0.00	0.00	0.00
< L.C. = Menor al límite de cuantificación (78.88 ng/mL)			

3.9 Resultados del control de calidad durante el análisis de muestras biológicas.

3.9.1 Verificación de la adecuabilidad del sistema analítico de medición.

Tabla 42a. Datos obtenidos para solución de verificación de la adecuabilidad del sistema analítico de medición.

Concentración 236.53 ng/mL	Tiempo de Retención (Bomba-Columna)			Área (Inyector-Detector)			Ancho del pico a la mitad de la altura (Columna)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Fecha									
2014-05-29	1.758	1.762	1.762	3312.582	3428.360	3407.543	0.046	0.047	0.046
2014-05-30	1.769	1.769	1.769	6247.040	6159.072	6261.858	0.048	0.048	0.048
2014-06-02	1.769	1.769	1.772	7794.663	7758.106	7935.548	0.046	0.046	0.047
2014-06-03	1.772	1.769	1.772	7058.518	7261.962	7117.132	0.048	0.048	0.048
2014-06-04	1.772	1.772	1.772	7455.538	7622.243	7432.247	0.048	0.048	0.048

Tabla 42b. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-05-29.

Número de réplica	Tiempo de Retención
1	1.769
2	1.769
3	1.772
% CV	0.111%
Criterio de Aceptación	≤ 5%
Evaluación	Pasa

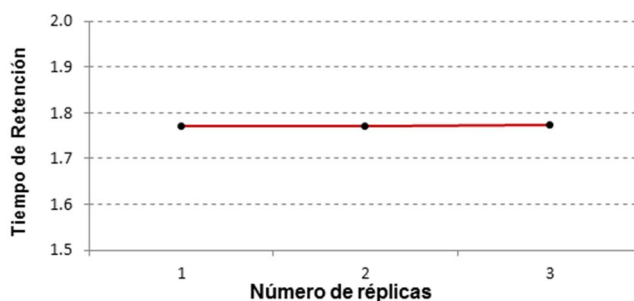


Tabla 42c. Evaluación del área del día 2014-05-29.

Número de réplica	Area
1	7794.663
2	7758.106
3	7935.548
% CV	1.197%
Criterio de Aceptación	< 5%
Evaluación	Pasa

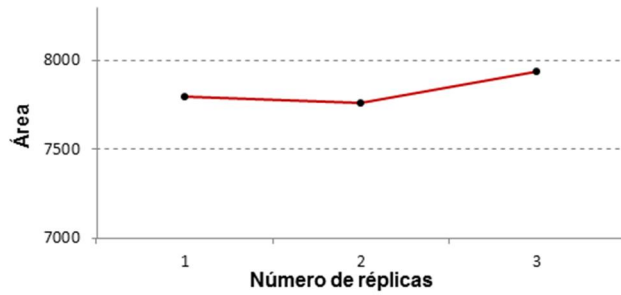


Tabla 42d. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-05-29.

Número de réplica	Ancho de pico a la mitad de la altura
1	0.046
2	0.046
3	0.047
% CV	0.484%
Criterio de Aceptación	< 5%
Evaluación	Pasa

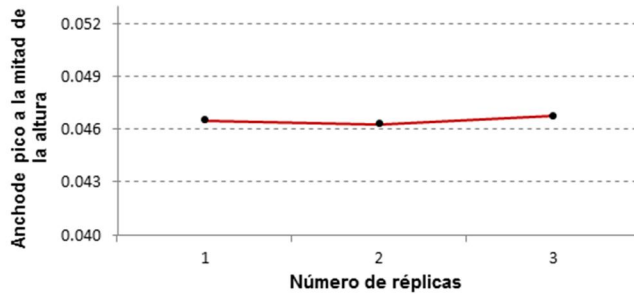


Tabla 42e. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-05-30.

Número de réplica	Tiempo de Retención
1	1.772
2	1.769
3	1.772
% CV	0.111%
Criterio de Aceptación	≤ 5%
Evaluación	Pasa

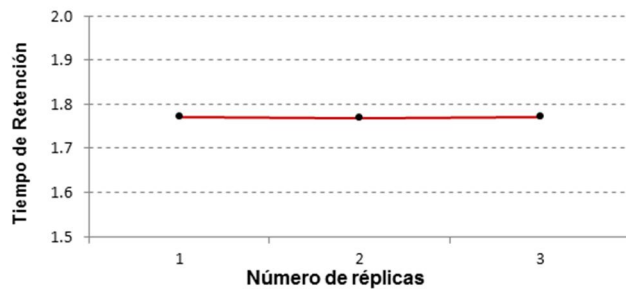


Tabla 42f. Evaluación del área del día 2014-05-30.

Número de réplica	Area
1	7058.518
2	7261.962
3	7117.132
% CV	1.465%
Criterio de Aceptación	< 5%
Evaluación	Pasa

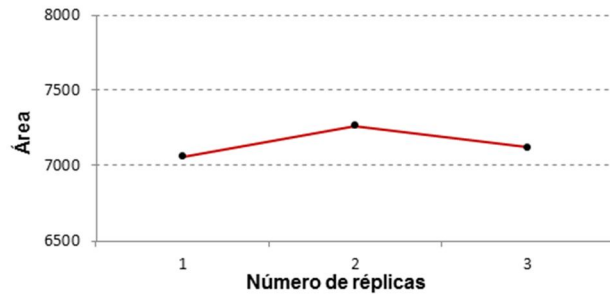


Tabla 42g. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-05-30.

Número de réplica	Ancho de pico a la mitad de la altura
1	0.048
2	0.048
3	0.048
% CV	0.165%
Criterio de Aceptación	< 5%
Evaluación	Pasa

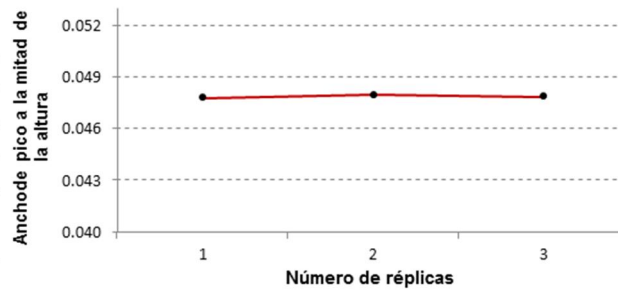


Tabla 42h. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-06-02.

Número de réplica	Tiempo de Retención
1	1.772
2	1.772
3	1.772
% CV	0.000%
Criterio de Aceptación	≤ 5%
Evaluación	Pasa

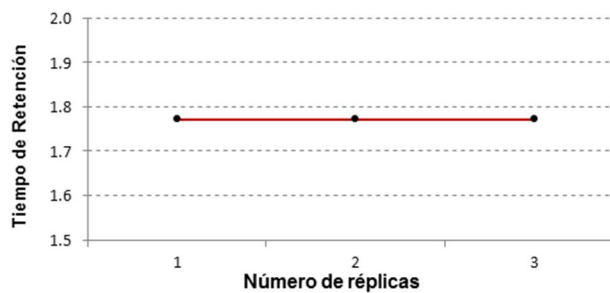


Tabla 42i. Evaluación del área del día 2014-06-02.

Número de réplica	Area
1	7455.538
2	7622.243
3	7432.247
% CV	1.381%
Criterio de Aceptación	< 5%
Evaluación	Pasa

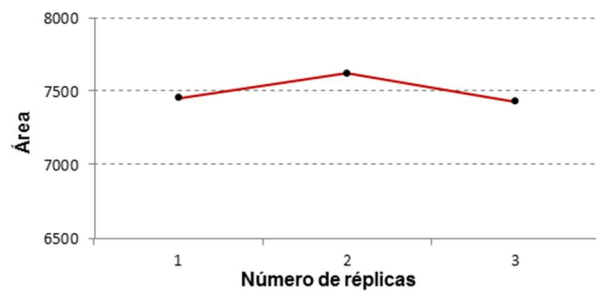


Tabla 42j. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-06-02.

Número de réplica	Ancho de pico a la mitad de la altura
1	0.048
2	0.048
3	0.048
% CV	0.347%
Criterio de Aceptación	< 5%
Evaluación	Pasa

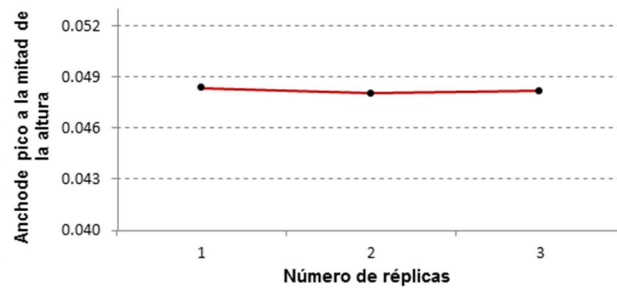


Tabla 42k. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-06-03.

Número de réplica	Tiempo de Retención
1	1.772
2	1.769
3	1.772
% CV	0.111%
Criterio de Aceptación	≤ 5%
Evaluación	Pasa

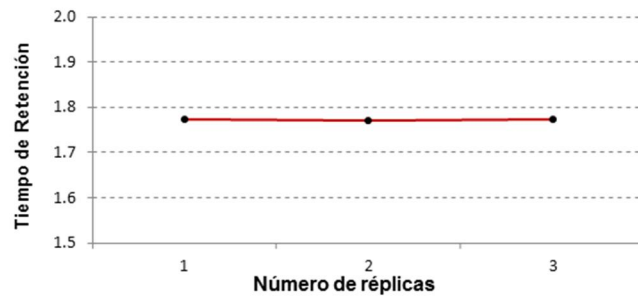


Tabla 42l. Evaluación del área del día 2014-06-03.

Número de réplica	Area
1	7058.518
2	7261.962
3	7117.132
% CV	1.465%
Criterio de Aceptación	< 5%
Evaluación	Pasa

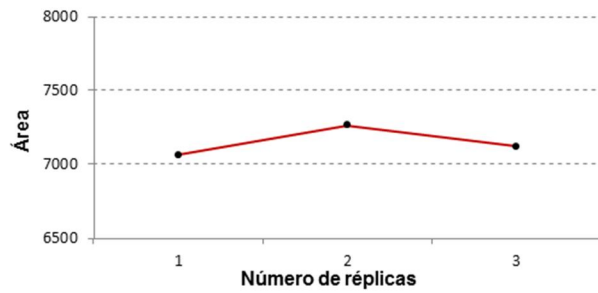


Tabla 42m. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-06-03.

Número de réplica	Ancho de pico a la mitad de la altura
1	0.048
2	0.048
3	0.048
% CV	0.165%
Criterio de Aceptación	< 5%
Evaluación	Pasa

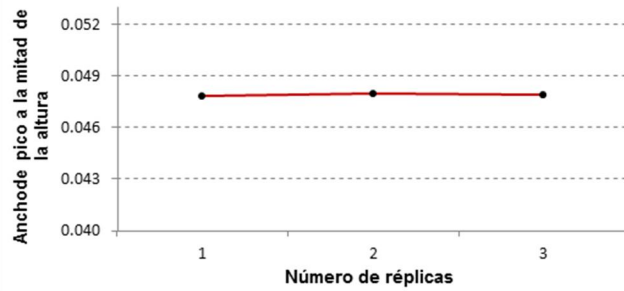


Tabla 42n. Evaluación del tiempo de retención del día 2014-06-04.

Número de réplica	Tiempo de Retención
1	1.772
2	1.772
3	1.772
% CV	0.000%
Criterio de Aceptación	≤ 5%
Evaluación	Pasa

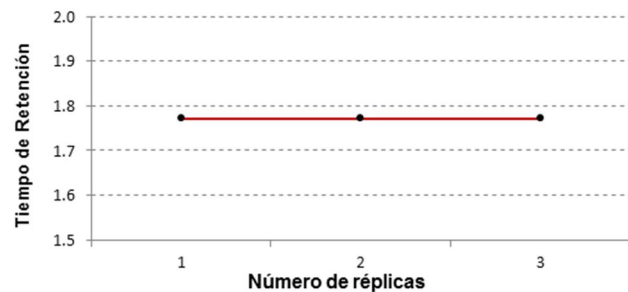


Tabla 42ñ. Evaluación del área del día 2014-06-04.

Número de réplica	Area
1	7455.538
2	7622.243
3	7432.247
% CV	1.381%
Criterio de Aceptación	< 5%
Evaluación	Pasa

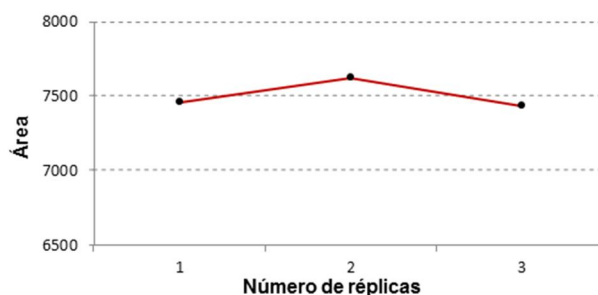


Tabla 42o. Evaluación del ancho de pico a la mitad de la altura del día 2014-06-04.

Número de réplica	Ancho de pico a la mitad de la altura
1	0.048
2	0.048
3	0.048
% CV	0.347%
Criterio de Aceptación	< 5%
Evaluación	Pasa

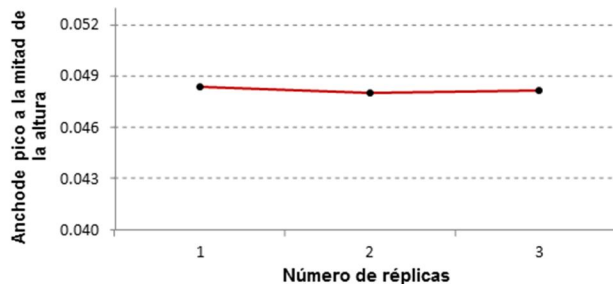


Tabla 42p. Seguimiento de la verificación de la adecuabilidad del sistema analítico de medición.

Fecha	Tiempo de Retención	Área	Ancho de pico a la mitad de la altura
2014-05-29	1.761	3382.828	0.046
2014-05-30	1.769	6222.656	0.048
2014-06-02	1.770	7829.439	0.046
2014-06-03	1.771	7145.870	0.048
2014-06-04	1.772	7503.343	0.048
Promedio	1.768	6416.827	0.047
Desviación Estándar	0.004	1799.329	0.001
Promedio + 2DE	1.777	10015.486	0.049
Promedio - 2DE	1.759	2818.169	0.046
Evaluación	Pasa	Pasa	Pasa

3.9.2 Evaluación de la curva de calibración.

Tabla 43a. Evaluación de la curva de calibración 2014-05-29.

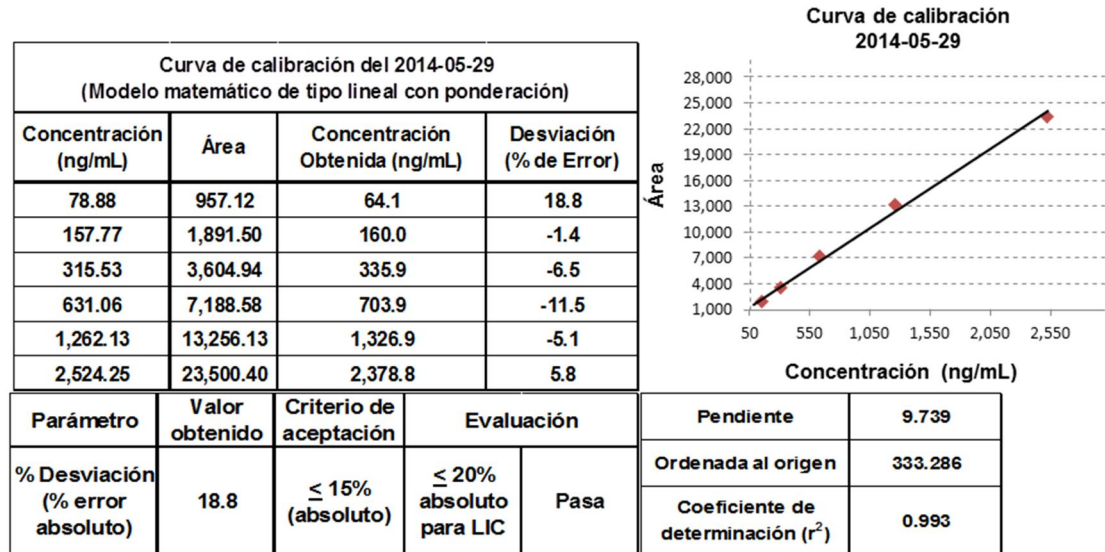


Tabla 43b. Evaluación de la curva de calibración 2014-05-30.

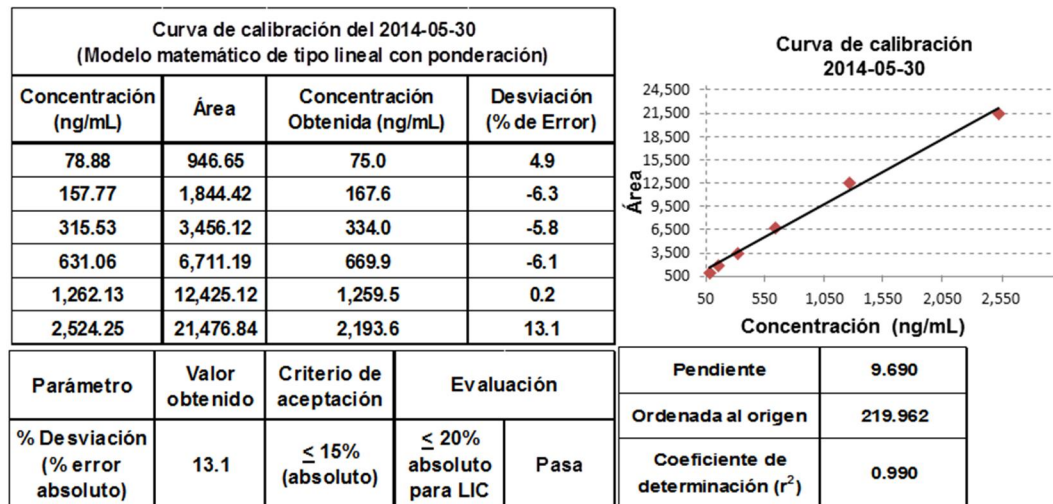


Tabla 43c. Evaluación de la curva de calibración 2014-06-02.

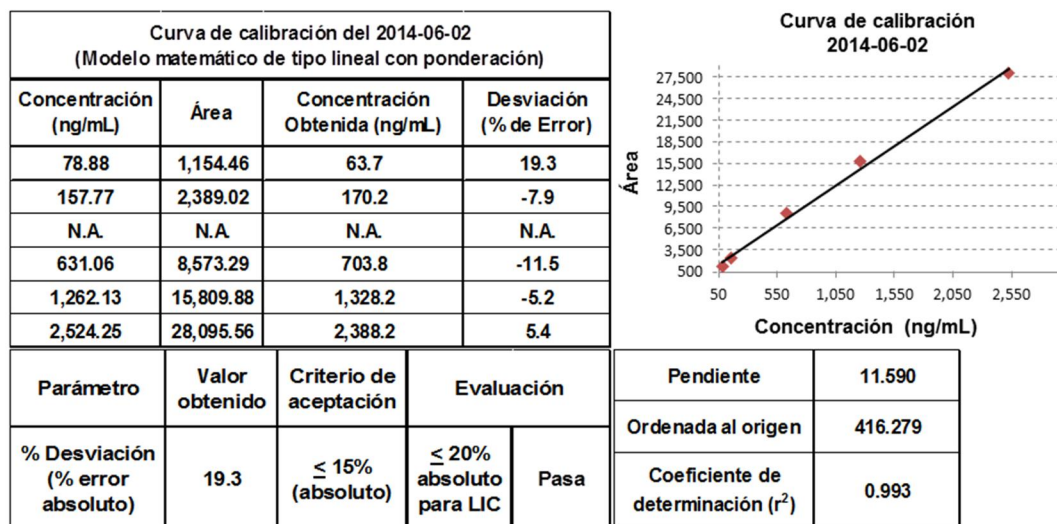


Tabla 43d. Evaluación de la curva de calibración 2014-06-03.

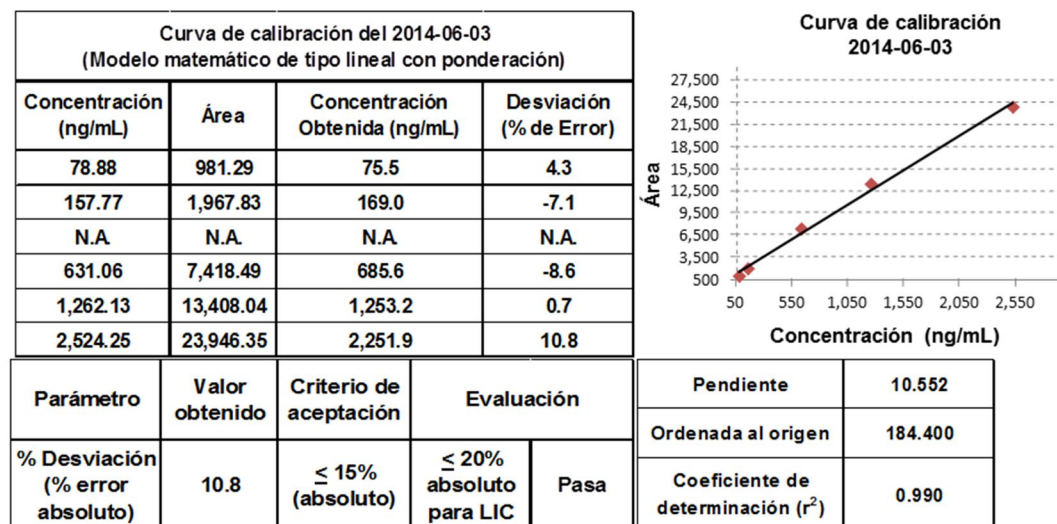


Tabla 43e. Evaluación de la curva de calibración 2014-06-04.

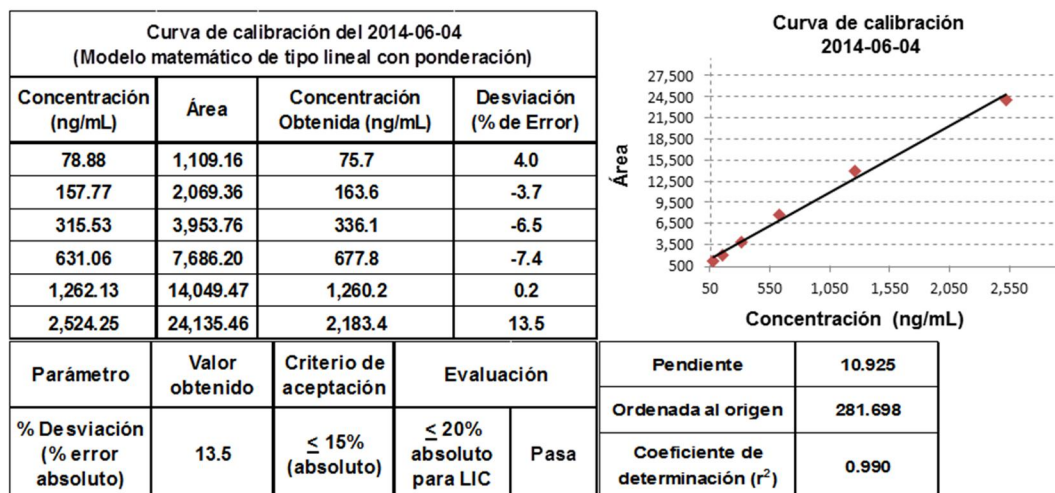


Tabla 43f. Seguimiento de las curvas de calibración empleadas en el análisis de muestras.

Fecha	Curva de Calibración Aplicable	Pendiente	Ordenada al Origen	Coefficiente de Determinación (r ²)
2014-05-29	I	9.739	333.286	0.993
2014-05-30	I	9.690	219.962	0.990
2014-06-02	I	11.590	416.279	0.993
2014-06-03	I	10.552	184.400	0.990
2014-06-04	I	10.925	281.698	0.990
Promedio		10.499	287.125	0.991
Desviación Estándar		0.807	92.066	0.002
Promedio + 2DE		12.114	471.256	0.995
Promedio - 2DE		8.885	102.994	0.988
Evaluación		Pasa	Pasa	Pasa

3.9.3 Evaluación de las muestras de control de calidad.

Tabla 44a. Datos obtenidos para las soluciones de control de calidad durante el análisis de muestras.

Concentración (ng/mL)												
Fecha	236.65				473.30				1,893.19			
2014-05-29	257.19	242.18	244.69	241.77	525.50	494.01	489.90	493.52	1,805.21	1,695.37	1,684.16	1,695.19
2014-05-30	249.71	244.02	237.31	252.67	522.68	506.38	496.46	500.04	1,769.28	1,583.46	1,677.26	1,677.54
2014-06-02	261.44	228.51	221.77	N.A.	531.40	487.23	473.70	N.A.	1,842.84	1,630.43	1,601.13	N.A.
2014-06-03	251.83	251.52	261.55	N.A.	520.65	540.84	538.41	N.A.	1,755.43	1,798.22	1,786.56	N.A.
2014-06-04	251.89	253.37	237.05	N.A.	502.60	513.73	502.20	N.A.	1,754.16	1,763.56	1,719.50	N.A.

Tabla 44b. Evaluación de las soluciones de control de calidad en función del número de controles utilizados en relación al número de muestras analizadas.

Fecha	Número de muestras	Controles utilizados	Porcentaje de controles usados	Criterio de aceptación	Evaluación
2014-05-29	135	12	8.9	> 5%	Pasa
2014-05-30	135	12	8.9	> 5%	Pasa
2014-06-02	90	9	10.0	> 5%	Pasa
2014-06-03	90	9	10.0	> 5%	Pasa
2014-06-04	90	9	10.0	> 5%	Pasa

Tabla 44c. Evaluación de la solución de control de calidad de concentración baja en función del % de error.

Nivel Bajo			
Fecha	LMP	% Error	LIP
2014-05-29	15%	4.1%	-15%
2014-05-30	15%	3.9%	-15%
2014-06-02	15%	0.2%	-15%
2014-06-03	15%	7.7%	-15%
2014-06-04	15%	4.6%	-15%

Tabla 44d. Evaluación de la solución de control de calidad de concentración media en función del % de error.

Nivel Medio			
Fecha	LMP	% Error	LIP
2014-05-29	15%	5.8%	-15%
2014-05-30	15%	7.0%	-15%
2014-06-02	15%	5.1%	-15%
2014-06-03	15%	12.7%	-15%
2014-06-04	15%	6.9%	-15%

Tabla 44e. Evaluación de la solución de control de calidad de concentración alta en función del % de error.

Nivel Alto			
Fecha	LMP	% Error	LIP
2014-05-29	15%	-9.1%	-15%
2014-05-30	15%	-11.4%	-15%
2014-06-02	15%	-10.7%	-15%
2014-06-03	15%	-6.0%	-15%
2014-06-04	15%	-7.8%	-15%

Figura 8. Carta control de exactitud a nivel bajo de concentración.

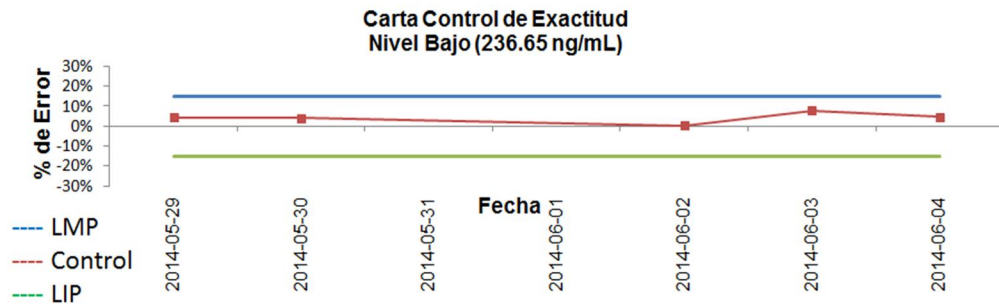


Figura 9. Carta control de exactitud a nivel medio de concentración.

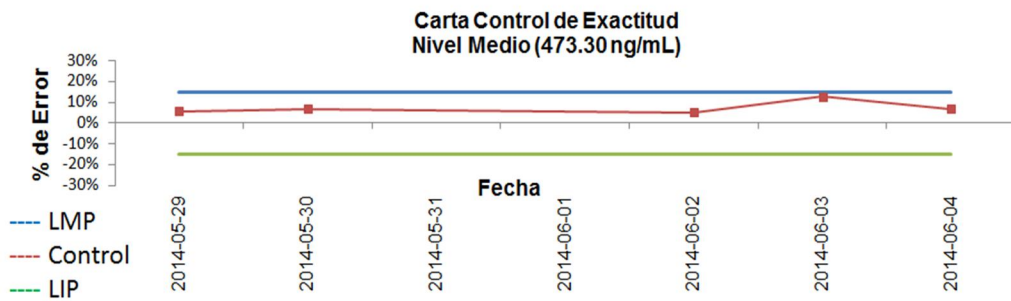


Figura 10. Carta control de exactitud a nivel alto de concentración.

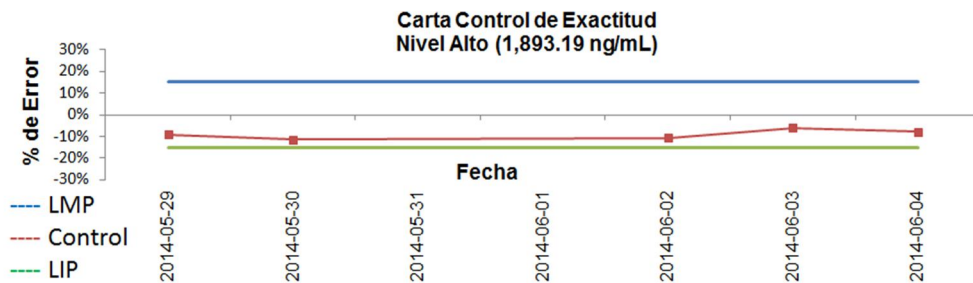


Figura 11. Carta control de precisión a nivel bajo de concentración.

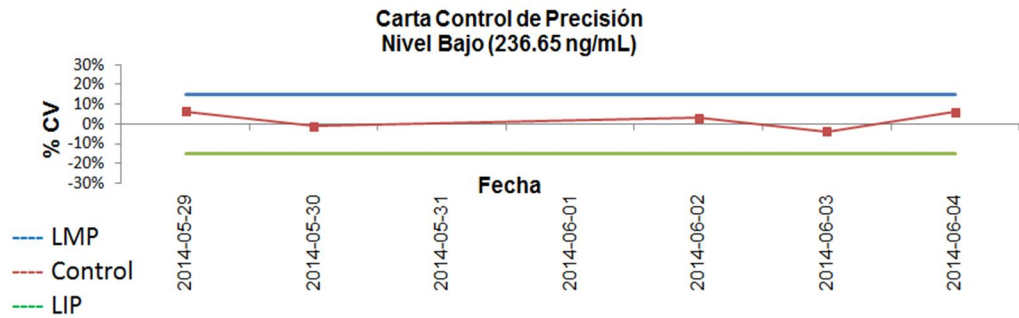


Figura 12. Carta control de precisión a nivel medio de concentración.

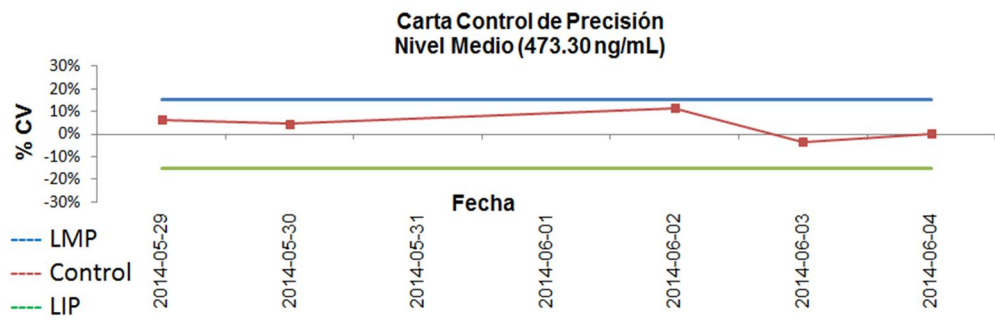
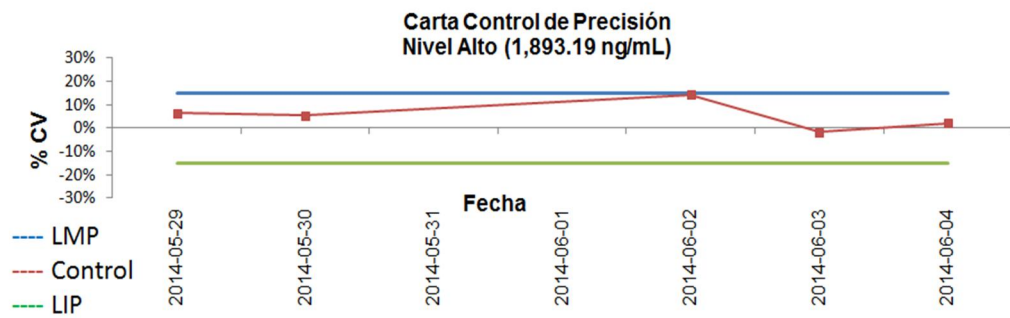


Figura 13. Carta control de precisión a nivel alto de concentración.



3.10 Resultados del análisis estadístico.

3.10.1 Estadística descriptiva para las variables demográficas.

Tabla 45. Estadística descriptiva para las variables demográficas, por género y total.

Variable	Género	n	Media	DE	EEM	VMin	Mediana	VMáx	CV%
Edad (años)	Femenino	7	21.29	1.9760	0.7469	19.00	20.00	24.00	9.28
	Masculino	5	28.60	8.1117	3.6277	19.00	26.00	38.00	28.36
	Total	12	24.33	6.3437	1.8313	19.00	23.00	38.00	26.07
Peso (Kg)	Femenino	7	56.36	5.2538	1.9858	48.20	57.50	62.40	9.32
	Masculino	5	71.20	6.1400	2.7459	67.00	69.00	82.00	8.62
	Total	12	62.54	9.3371	2.6954	48.20	60.95	82.00	14.93
Talla (m)	Femenino	7	1.62	0.0465	0.0176	1.52	1.62	1.66	2.88
	Masculino	5	1.69	0.0730	0.0326	1.59	1.68	1.79	4.33
	Total	12	1.65	0.0665	0.0192	1.52	1.65	1.79	4.04
IMC (Kg/m ²)	Femenino	7	21.58	1.7716	0.6696	18.59	21.12	23.78	8.21
	Masculino	5	25.04	1.1922	0.5332	23.26	25.04	26.50	4.76
	Total	12	23.02	2.3221	0.6703	18.59	23.10	26.50	10.09

DE = Desviación Estándar, EEM = Error Estándar de la Media, VMin = Valor Mínimo, VMáx = Valor Máximo, CV% = Coeficiente de Variación en %

3.10.2 Estadística descriptiva para las variables de concentración plasmática con respecto al tiempo.

Tabla 46. Estadísticas descriptivas para las concentraciones plasmáticas de metformina con respecto al tiempo para el medicamento A.

t	Tiempo t (h)	n	Media (ng/mL)	DE (ng/mL)	EEM (ng/mL)	VMin (ng/mL)	Mediana (ng/mL)	VMáx (ng/mL)	CV%
1	0.00	12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
2	0.25	12	44.71	91.60	26.44	0.00	0.00	287.99	204.88
3	0.50	12	346.66	166.33	48.02	168.46	326.10	796.53	47.98
4	0.75	12	611.80	265.78	76.72	258.21	588.14	1280.13	43.44
5	1.00	12	805.59	367.06	105.96	367.79	715.41	1675.79	45.56
6	1.50	12	883.94	401.01	115.76	448.79	747.83	1881.27	45.37
7	2.00	12	963.10	348.26	100.54	566.59	860.09	1726.61	36.16
8	2.50	12	1005.47	259.42	74.89	683.59	888.80	1443.49	25.80
9	3.00	12	1022.89	212.66	61.39	727.57	982.59	1444.48	20.79
10	3.50	12	1023.70	156.13	45.07	834.44	961.21	1298.88	15.25
11	4.00	12	1022.28	163.34	47.15	807.94	1017.09	1331.65	15.98
12	6.00	12	553.60	117.66	33.96	390.32	574.21	712.54	21.25
13	8.00	12	302.43	80.69	23.29	178.80	289.75	422.10	26.68
14	12.00	12	69.35	63.51	18.33	0.00	92.45	149.31	91.59
15	26.00	12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	Total	180	577.03	453.30	33.79	0.00	628.08	1881.27	78.56

DE = Desviación Estándar, EEM = Error Estándar de la Media, VMin = Valor Mínimo, VMáx = Valor Máximo, CV% = Coeficiente de Variación en %

Tabla 47. Estadísticas descriptivas para las concentraciones plasmáticas de metformina con respecto al tiempo para el medicamento B.

t	Tiempo t (h)	n	Media (ng/mL)	DE (ng/mL)	EEM (ng/mL)	VMin (ng/mL)	Mediana (ng/mL)	VMáx (ng/mL)	CV%
1	0.00	12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
2	0.25	12	11.14	38.58	11.14	0.00	0.00	133.65	346.41
3	0.50	12	316.62	187.37	54.09	0.00	273.66	717.34	59.18
4	0.75	12	591.12	217.52	62.79	275.69	567.53	956.34	36.80
5	1.00	12	769.42	291.61	84.18	289.61	748.64	1368.20	37.90
6	1.50	12	897.81	303.99	87.75	435.74	945.66	1515.69	33.86
7	2.00	12	1034.39	239.93	69.26	688.51	1054.11	1409.86	23.19
8	2.50	12	1067.74	176.51	50.95	737.55	1047.80	1338.64	16.53
9	3.00	12	1088.17	185.06	53.42	739.50	1046.52	1485.29	17.01
10	3.50	12	1073.87	160.88	46.44	806.00	1080.35	1397.89	14.98
11	4.00	12	1019.25	163.53	47.21	788.62	1045.03	1345.99	16.04
12	6.00	12	562.80	93.28	26.93	439.48	557.28	723.96	16.57
13	8.00	12	297.76	53.63	15.48	219.35	295.44	389.27	18.01
14	12.00	12	80.60	51.62	14.90	0.00	93.81	141.26	64.04
15	26.00	12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	Total	180	587.38	454.72	33.89	0.00	575.63	1515.69	77.42

DE = Desviación Estándar, EEM = Error Estándar de la Media, VMin = Valor Mínimo, VMáx = Valor Máximo, CV% = Coeficiente de Variación en %

Tabla 48. Estadísticas descriptivas para las concentraciones plasmáticas de metformina con respecto al tiempo para el medicamento C.

t	Tiempo t (h)	n	Media (ng/mL)	DE (ng/mL)	EEM (ng/mL)	VMin (ng/mL)	Mediana (ng/mL)	VMáx (ng/mL)	CV%
1	0.00	12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
2	0.25	12	7.45	25.82	7.45	0.00	0.00	89.43	346.41
3	0.50	12	226.48	147.47	42.57	0.00	214.47	505.96	65.12
4	0.75	12	515.23	154.92	44.72	262.92	516.76	784.14	30.07
5	1.00	12	707.65	169.01	48.79	523.79	652.27	1045.29	23.88
6	1.50	12	902.75	225.59	65.12	647.51	890.27	1482.41	24.99
7	2.00	12	993.84	205.99	59.46	794.10	933.76	1349.69	20.73
8	2.50	12	1036.33	166.08	47.94	843.51	990.64	1440.63	16.03
9	3.00	12	1057.12	149.73	43.22	812.46	1056.60	1342.83	14.16
10	3.50	12	1069.77	164.82	47.58	785.70	1036.56	1294.98	15.41
11	4.00	12	1048.18	150.30	43.39	796.88	1087.90	1206.18	14.34
12	6.00	12	603.43	123.90	35.77	391.15	591.51	795.30	20.53
13	8.00	12	334.99	82.81	23.91	218.77	321.82	467.80	24.72
14	12.00	12	90.44	58.98	17.03	0.00	106.87	162.26	65.21
15	26.00	12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	Total	180	572.91	439.80	32.78	0.00	583.71	1482.41	76.77

DE = Desviación Estándar, EEM = Error Estándar de la Media, VMin = Valor Mínimo, VMáx = Valor Máximo, CV% = Coeficiente de Variación en %

3.10.3 Análisis de varianza.

Tabla 49. Análisis de varianza para pruebas de F secuenciales.

Parámetro	Fuente de Variación	Grados de libertad del numerador	Grados de libertad del denominador	Estadística F	Valor de p
Ln(C _{máx})	Secuencia	2	9	0.490	.6278
Ln(C _{máx})	Tratamiento	2	20	0.202	.8185
Ln(C _{máx})	Periodo	2	20	0.873	.4332
Ln(ABC _{0-t})	Secuencia	2	9	0.564	.5878
Ln(ABC _{0-t})	Tratamiento	2	20	0.963	.3987
Ln(ABC _{0-t})	Periodo	2	20	1.528	.2413
Ln(ABC _{0-∞})	Secuencia	2	8.976	0.500	.6226
Ln(ABC _{0-∞})	Tratamiento	2	18.182	0.848	.4445
Ln(ABC _{0-∞})	Periodo	2	18.211	1.583	.2324

Tabla 50. Análisis de varianza para pruebas de F parciales.

Parámetro	Fuente de Variación	Grados de libertad del numerador	Grados de libertad del denominador	Estadística F	Valor de p
Ln(C _{máx})	Secuencia	2	9	0.49	.6278
Ln(C _{máx})	Tratamiento	2	20	0.20	.8185
Ln(C _{máx})	Periodo	2	20	0.87	.4332
Ln(ABC _{0-t})	Secuencia	2	9	0.56	.5878
Ln(ABC _{0-t})	Tratamiento	2	20	0.96	.3987
Ln(ABC _{0-t})	Periodo	2	20	1.53	.2413
Ln(ABC _{0-∞})	Secuencia	2	9.015	0.53	.6081
Ln(ABC _{0-∞})	Tratamiento	2	18.211	0.93	.4121
Ln(ABC _{0-∞})	Periodo	2	18.211	1.58	.2324

3.10.4 Estadística descriptiva para los parámetros farmacocinéticos.

Tabla 51. Estadísticas descriptivas para los parámetros farmacocinéticos de metformina por medicamento (A,B,C).

Variable	Trt	n	Media	DE	EEM	VMín	Mediana	VMáx	CV%
T _{máx} (h)	A	12	3.000	1.000	0.2887	1.00	3.25	4.00	33.33
	B	12	2.833	0.778	0.2247	1.50	3.00	4.00	27.48
	C	12	3.042	0.865	0.2497	1.50	3.00	4.00	28.44
C _{máx} (ng/mL)	A	12	1,163.50	295.18	85.210	834.44	1,097.91	1,881.27	25.37
	B	12	1,184.57	215.03	62.073	806.00	1,134.94	1,515.69	18.15
	C	12	1,167.80	176.76	51.026	958.11	1,190.76	1,482.41	15.14
ABC _{0-t} (h*ng/mL)	A	12	6,240.69	1,629.35	470.353	3,897.51	6,174.14	8,957.99	26.11
	B	12	6,433.69	1,249.75	360.773	4,401.97	6,324.69	8,194.57	19.43
	C	12	6,567.12	1,145.48	330.671	4,713.67	6,711.13	8,283.25	17.44
ABC _{0-∞} (h*ng/mL)	A	11	6,837.27	1,618.47	487.987	4,371.69	6,599.99	9,382.69	23.67
	B	12	6,911.79	1,178.41	340.177	5,032.80	6,637.34	8,733.57	17.05
	C	11	7,178.63	1,086.84	327.696	5,427.50	7,189.53	8,944.91	15.14
Constante de Eliminación Ke (1/h)	A	11	0.3018	0.0440	0.01326	0.2496	0.2929	0.3771	14.57
	B	12	0.2938	0.0263	0.00759	0.2486	0.2938	0.3477	8.95
	C	11	0.2912	0.0398	0.01201	0.2452	0.2912	0.3706	13.68
Vida Media de Eliminación (h)	A	11	2.3406	0.3352	0.10106	1.8383	2.3664	2.7768	14.32
	B	12	2.3764	0.2125	0.06135	1.9934	2.3594	2.7878	8.94
	C	11	2.4189	0.3129	0.09435	1.8703	2.3802	2.8266	12.94
TMR _{0-∞} (h)	A	11	4.8250	0.4386	0.13223	4.3255	4.6775	5.6343	9.09
	B	12	4.8561	0.2927	0.08449	4.3644	4.9538	5.2876	6.03
	C	11	5.0380	0.3511	0.10585	4.4220	5.0367	5.6741	6.97

DE = Desviación Estándar, EEM = Error Estándar de la Media, VMín = Valor Mínimo, VMáx = Valor Máximo, CV% = Coeficiente de Variación en %

Tabla 52. Parámetro $T_{m\acute{a}x}$ de metformina, para los medicamentos A y B. Diferencia, cociente y logaritmo natural del cociente.

Sujeto	Secuencia	Referencia (A)	Prueba (B)	Diferencia (B-A)	Cociente (B/A)	Ln(B/A)
1	ACB	3.50	3.00	-0.50	0.8571	-0.1542
2	BAC	4.00	3.50	-0.50	0.8750	-0.1335
3	BAC	3.00	3.00	0.00	1.0000	0.0000
4	ACB	3.00	2.00	-1.00	0.6667	-0.4055
5	ACB	4.00	4.00	0.00	1.0000	0.0000
6	CBA	3.50	2.50	-1.00	0.7143	-0.3365
7	CBA	3.00	3.00	0.00	1.0000	0.0000
8	ACB	3.50	2.00	-1.50	0.5714	-0.5596
9	CBA	4.00	4.00	0.00	1.0000	0.0000
10	BAC	2.00	3.00	1.00	1.5000	0.4055
11	BAC	1.50	1.50	0.00	1.0000	0.0000
12	CBA	1.00	2.50	1.50	2.5000	0.9163
Promedio		3.000	2.833	-0.167	1.0570	-0.0223
Desviación Estándar		1.0000	0.7785	0.8348	0.5111	0.3850
Error Estándar de la Media		0.2887	0.2247	0.2410	0.1475	0.1111
Valor Mínimo		1.00	1.50	-1.50	0.5714	-0.5596
Mediana		3.25	3.00	0.00	1.0000	0.0000
Valor Máximo		4.00	4.00	1.50	2.5000	0.9163

Tabla 53. Parámetro $C_{m\acute{a}x}$ de metformina, para los medicamentos A y B. Diferencia, cociente y logaritmo natural del cociente.

Sujeto	Secuencia	Referencia (A)	Prueba (B)	Diferencia (B-A)	Cociente (B/A)	Ln(B/A)
1	ACB	834.44	942.51	108.07	1.1295	0.1218
2	BAC	993.85	806.00	-187.85	0.8110	-0.2095
3	BAC	908.36	1,116.49	208.13	1.2291	0.2063
4	ACB	1,444.48	1,409.86	-34.62	0.9760	-0.0243
5	ACB	1,101.47	1,072.96	-28.51	0.9741	-0.0262
6	CBA	940.97	1,074.36	133.39	1.1418	0.1326
7	CBA	1,104.88	1,118.80	13.92	1.0126	0.0125
8	ACB	1,161.91	1,329.95	168.05	1.1446	0.1351
9	CBA	1,040.32	1,191.90	151.58	1.1457	0.1360
10	BAC	1,455.67	1,485.29	29.62	1.0203	0.0201
11	BAC	1,881.27	1,515.69	-365.58	0.8057	-0.2161
12	CBA	1,094.35	1,151.08	56.73	1.0518	0.0505
Promedio		1,163.497	1,184.575	21.078	1.0369	0.0282
Desviación Estándar		295.1761	215.0275	163.4611	0.1325	0.1339
Error Estándar de la Media		85.2100	62.0731	47.1871	0.0383	0.0386
Valor Mínimo		834.44	806.00	-365.58	0.8057	-0.2161
Mediana		1,097.91	1,134.94	43.18	1.0361	0.0353
Valor Máximo		1,881.27	1,515.69	208.13	1.2291	0.2063

Tabla 54. Parámetro ABC_{0-t} de metformina, para los medicamentos A y B.

Diferencia, cociente y logaritmo natural del cociente.

Sujeto	Secuencia	Referencia (A)	Prueba (B)	Diferencia (B-A)	Cociente (B/A)	Ln(B/A)
1	ACB	3,897.51	4,401.97	504.46	1.1294	0.1217
2	BAC	6,692.73	5,305.68	-1,387.05	0.7928	-0.2322
3	BAC	4,525.85	6,298.79	1,772.94	1.3917	0.3306
4	ACB	8,492.28	8,194.57	-297.71	0.9649	-0.0357
5	ACB	5,256.70	5,980.48	723.77	1.1377	0.1290
6	CBA	5,043.18	5,252.40	209.22	1.0415	0.0406
7	CBA	4,962.15	5,147.89	185.75	1.0374	0.0367
8	ACB	6,167.48	7,170.66	1,003.18	1.1627	0.1507
9	CBA	6,466.72	7,540.45	1,073.73	1.1660	0.1536
10	BAC	8,244.87	7,830.95	-413.92	0.9498	-0.0515
11	BAC	8,957.99	7,729.89	-1,228.10	0.8629	-0.1475
12	CBA	6,180.80	6,350.59	169.79	1.0275	0.0271
Promedio		6,240.688	6,433.692	193.004	1.0554	0.0436
Desviación Estándar		1629.3509	1249.7535	926.0428	0.1583	0.1500
Error Estándar de la Media		470.3531	360.7728	267.3255	0.0457	0.0433
Valor Mínimo		3,897.51	4,401.97	-1,387.05	0.7928	-0.2322
Mediana		6,174.14	6,324.69	197.49	1.0395	0.0387
Valor Máximo		8,957.99	8,194.57	1,772.94	1.3917	0.3306

Tabla 55. Parámetro $ABC_{0-\infty}$ de metformina para los medicamentos A y B.

Diferencia, cociente y logaritmo natural del cociente.

Sujeto	Secuencia	Referencia (A)	Prueba (B)	Diferencia (B-A)	Cociente (B/A)	Ln(B/A)
1	ACB	4,371.69	5,032.80	661.11	1.1512	0.1408
2	BAC	7,196.43	5,645.45	-1,550.98	0.7845	-0.2427
3	BAC	5,236.94	6,601.22	1,364.29	1.2605	0.2315
4	ACB	9,084.28	8,733.57	-350.71	0.9614	-0.0394
5	ACB		6,261.35	6,261.35		
6	CBA	5,757.20	5,953.15	195.95	1.0340	0.0335
7	CBA	5,566.83	6,120.98	554.15	1.0995	0.0949
8	ACB	6,473.96	7,665.64	1,191.68	1.1841	0.1690
9	CBA	6,999.17	8,029.54	1,030.37	1.1472	0.1373
10	BAC	8,540.80	8,141.96	-398.85	0.9533	-0.0478
11	BAC	9,382.69	8,082.41	-1,300.28	0.8614	-0.1492
12	CBA	6,599.99	6,673.46	73.48	1.0111	0.0111
Promedio		6,837.270	6,911.795	644.297	1.0408	0.0308
Desviación Estándar		1618.4700	1178.4074	1993.9089	0.1444	0.1434
Error Estándar de la Media		487.9871	340.1769	575.5919	0.0435	0.0432
Valor Mínimo		4,371.69	5,032.80	-1,550.98	0.7845	-0.2427
Mediana		6,599.99	6,637.34	375.05	1.0340	0.0335
Valor Máximo		9,382.69	8,733.57	6,261.35	1.2605	0.2315

Tabla 56. Parámetro $T_{m\acute{a}x}$ de metformina, para los medicamentos A y C.

Diferencia, cociente y logaritmo natural del cociente.

Sujeto	Secuencia	Referencia (A)	Prueba (C)	Diferencia (C-A)	Cociente (C/A)	Ln(C/A)
1	ACB	3.50	3.50	0.00	1.0000	0.0000
2	BAC	4.00	4.00	0.00	1.0000	0.0000
3	BAC	3.00	4.00	1.00	1.3333	0.2877
4	ACB	3.00	2.50	-0.50	0.8333	-0.1823
5	ACB	4.00	1.50	-2.50	0.3750	-0.9808
6	CBA	3.50	3.00	-0.50	0.8571	-0.1542
7	CBA	3.00	3.00	0.00	1.0000	0.0000
8	ACB	3.50	3.00	-0.50	0.8571	-0.1542
9	CBA	4.00	4.00	0.00	1.0000	0.0000
10	BAC	2.00	3.50	1.50	1.7500	0.5596
11	BAC	1.50	1.50	0.00	1.0000	0.0000
12	CBA	1.00	3.00	2.00	3.0000	1.0986
Promedio		3.000	3.042	0.042	1.1672	0.0395
Desviación Estándar		1.0000	0.8649	1.1373	0.6604	0.4887
Error Estándar de la Media		0.2887	0.2497	0.3283	0.1906	0.1411
Valor Mínimo		1.00	1.50	-2.50	0.3750	-0.9808
Mediana		3.25	3.00	0.00	1.0000	0.0000
Valor Máximo		4.00	4.00	2.00	3.0000	1.0986

Tabla 57. Parámetro $C_{m\acute{a}x}$ de metformina, para los medicamentos A y C.

Diferencia, cociente y logaritmo natural del cociente.

Sujeto	Secuencia	Referencia (A)	Prueba (C)	Diferencia (C-A)	Cociente (C/A)	Ln(C/A)
1	ACB	834.44	1,214.14	379.70	1.4550	0.3750
2	BAC	993.85	1,193.46	199.61	1.2008	0.1830
3	BAC	908.36	979.58	71.22	1.0784	0.0755
4	ACB	1,444.48	1,440.63	-3.85	0.9973	-0.0027
5	ACB	1,101.47	958.11	-143.35	0.8699	-0.1394
6	CBA	940.97	968.30	27.32	1.0290	0.0286
7	CBA	1,104.88	1,058.45	-46.43	0.9580	-0.0429
8	ACB	1,161.91	1,188.06	26.15	1.0225	0.0223
9	CBA	1,040.32	1,025.69	-14.63	0.9859	-0.0142
10	BAC	1,455.67	1,278.79	-176.88	0.8785	-0.1296
11	BAC	1,881.27	1,482.41	-398.86	0.7880	-0.2383
12	CBA	1,094.35	1,225.95	131.60	1.1203	0.1136
Promedio		1,163.497	1,167.797	4.301	1.0320	0.0192
Desviación Estándar		295.1761	176.7587	195.6155	0.1747	0.1609
Error Estándar de la Media		85.2100	51.0259	56.4693	0.0504	0.0464
Valor Mínimo		834.44	958.11	-398.86	0.7880	-0.2383
Mediana		1,097.91	1,190.76	11.15	1.0099	0.0098
Valor Máximo		1,881.27	1,482.41	379.70	1.4550	0.3750

Tabla 58. Parámetro ABC_{0-t} de metformina, para los medicamentos A y C.

Diferencia, cociente y logaritmo natural del cociente.

Sujeto	Secuencia	Referencia (A)	Prueba (C)	Diferencia (C-A)	Cociente (C/A)	Ln(C/A)
1	ACB	3,897.51	6,548.74	2,651.24	1.6802	0.5189
2	BAC	6,692.73	7,278.05	585.32	1.0875	0.0838
3	BAC	4,525.85	5,174.95	649.10	1.1434	0.1340
4	ACB	8,492.28	8,283.25	-209.03	0.9754	-0.0249
5	ACB	5,256.70	6,296.35	1,039.65	1.1978	0.1805
6	CBA	5,043.18	4,713.67	-329.51	0.9347	-0.0676
7	CBA	4,962.15	4,818.43	-143.72	0.9710	-0.0294
8	ACB	6,167.48	6,745.56	578.08	1.0937	0.0896
9	CBA	6,466.72	6,676.71	209.99	1.0325	0.0320
10	BAC	8,244.87	7,029.01	-1,215.86	0.8525	-0.1595
11	BAC	8,957.99	7,651.87	-1,306.12	0.8542	-0.1576
12	CBA	6,180.80	7,588.82	1,408.03	1.2278	0.2052
Promedio		6,240.688	6,567.117	326.430	1.0876	0.0671
Desviación Estándar		1629.3509	1145.4778	1100.1313	0.2233	0.1860
Error Estándar de la Media		470.3531	330.6709	317.5806	0.0645	0.0537
Valor Mínimo		3,897.51	4,713.67	-1,306.12	0.8525	-0.1595
Mediana		6,174.14	6,711.13	394.03	1.0600	0.0579
Valor Máximo		8,957.99	8,283.25	2,651.24	1.6802	0.5189

Tabla 59. Parámetro $ABC_{0-\infty}$ de metformina para los medicamentos A y B.

Diferencia, cociente y logaritmo natural del cociente.

Sujeto	Secuencia	Referencia (A)	Prueba (C)	Diferencia (C-A)	Cociente (C/A)	Ln(C/A)
1	ACB	4,371.69	6,857.64	2,485.95	1.5686	0.4502
2	BAC	7,196.43	7,821.81	625.37	1.0869	0.0833
3	BAC	5,236.94		-5,236.94	0.0000	
4	ACB	9,084.28	8,944.91	-139.36	0.9847	-0.0155
5	ACB		6,514.49	6,514.49		
6	CBA	5,757.20	5,427.50	-329.70	0.9427	-0.0590
7	CBA	5,566.83	5,466.70	-100.13	0.9820	-0.0182
8	ACB	6,473.96	7,082.64	608.68	1.0940	0.0899
9	CBA	6,999.17	7,189.53	190.36	1.0272	0.0268
10	BAC	8,540.80	7,513.16	-1,027.64	0.8797	-0.1282
11	BAC	9,382.69	8,161.46	-1,221.22	0.8698	-0.1394
12	CBA	6,599.99	7,985.10	1,385.11	1.2099	0.1905
Promedio		6,837.270	7,178.632	312.915	0.9678	0.0481
Desviación Estándar		1618.4700	1086.8438	2701.3633	0.3753	0.1737
Error Estándar de la Media		487.9871	327.6957	779.8164	0.1132	0.0549
Valor Mínimo		4,371.69	5,427.50	-5,236.94	0.0000	-0.1394
Mediana		6,599.99	7,189.53	45.12	0.9847	0.0057
Valor Máximo		9,382.69	8,944.91	6,514.49	1.5686	0.4502

3.10.5 Pruebas estadísticas para establecer bioequivalencia.

Tabla 60. Intervalos de confianza y pruebas límite para los parámetros farmacocinéticos de metformina transformados logarítmicamente: medicamento A contra medicamento B.

Parámetro farmacocinético	Promedio Geométrico por mínimos cuadrados		Razón de Promedios	IC 90 % Clásico		IC 90% de Westlake		T doble unilateral de Schuirmann		Valor de p	
	Referencia (A)	Prueba (B)	[B/A] (%)	LI	LS	LI	LS	P < 80	P > 125	AH	Potencia
Ln(C _{máx})	1,133.83	1,166.30	102.86	95.12	111.24	90.59	109.41	.000010	.000176	.00017	.99772
Ln(ABC _{0,t})	6,049.27	6,318.84	104.46	95.98	113.68	88.48	111.52	.000013	.000777	.00076	.99476
Ln(ABC _{0-∞})	6,589.24	6,818.70	103.48	95.50	112.13	89.84	110.16	.000014	.000345	.00033	.99685
Criterio				> 80	< 125	> 80	< 125	< .05	< .05	< .05	> .80

A = Tratamiento A, B = Tratamiento B, IC = Intervalo de Confianza, LI = Límite Inferior, LS = Límite Superior, AH = Anderson Hauck

Tabla 61. Intervalos de confianza y pruebas límite para los parámetros farmacocinéticos de metformina transformados logarítmicamente: medicamento A contra medicamento C.

Parámetro farmacocinético	Promedio Geométrico por mínimos cuadrados		Razón de Promedios	IC 90 % Clásico		IC 90% de Westlake		T doble unilateral de Schuirmann		Valor de p	
	Referencia (A)	Prueba (C)	[C/A] (%)	LI	LS	LI	LS	P < 80	P > 125	AH	Potencia
Ln(C _{máx})	1,133.83	1,155.86	101.94	94.27	110.24	91.34	108.66	.000016	.000111	.00010	.99772
Ln(ABC _{0,t})	6,049.27	6,469.00	106.94	98.26	116.38	85.87	114.13	.000004	.002345	.00234	.99476
Ln(ABC _{0-∞})	6,589.24	7,035.97	106.78	98.24	116.06	86.16	113.84	.000005	.002080	.00207	.99533
Criterio				> 80	< 125	> 80	< 125	< .05	< .05	< .05	> .80

A = Tratamiento A, C = Tratamiento C, IC = Intervalo de Confianza, LI = Límite Inferior, LS = Límite Superior, AH = Anderson Hauck

Tabla 62. Intervalos de confianza y pruebas límite para los parámetros farmacocinéticos de metformina transformados logarítmicamente: medicamento B contra medicamento C.

Parámetro farmacocinético	Promedio Geométrico por mínimos cuadrados		Razón de Promedios	IC 90 % Clásico		IC 90% de Westlake		T doble unilateral de Schuirmann		Valor de p	
	Referencia (B)	Prueba (C)	[C/B] (%)	LI	LS	LI	LS	P < 80	P > 125	AH	Potencia
Ln(C _{máx})	1,166.30	1,155.86	99.104	91.65	107.17	92.13	107.87	.000065	.000026	.000039	.99772
Ln(ABC _{0-t})	6,318.84	6,469.00	102.376	94.07	111.41	90.41	109.59	.000032	.000298	.000266	.99476
Ln(ABC _{0-∞})	6,818.70	7,035.97	103.186	95.23	111.81	90.12	109.88	.000016	.000300	.000285	.99685
Criterio				> 80	< 125	> 80	< 125	< .05	< .05	< .05	> .80

A = Tratamiento A, B = Tratamiento B, IC = Intervalo de Confianza, LI = Límite Inferior, LS = Límite Superior, AH = Anderson Hauck

Tabla 63. Intervalos de confianza y pruebas límite para los parámetros farmacocinéticos de metformina transformados logarítmicamente: medicamento C contra medicamento B.

Parámetro farmacocinético	Promedio Geométrico por mínimos cuadrados		Razón de Promedios	IC 90 % Clásico		IC 90% de Westlake		T doble unilateral de Schuirmann		Valor de p	
	Referencia (C)	Prueba (B)	[B/C] (%)	LI	LS	LI	LS	P < 80	P > 125	AH	Potencia
Ln(C _{máx})	1,155.86	1,166.30	100.90	93.31	109.12	91.94	108.06	.000026	.000065	.000039	.99772
Ln(ABC _{0-t})	6,469.00	6,318.84	97.68	89.76	106.30	90.98	109.02	.000298	.000032	.000266	.99476
Ln(ABC _{0-∞})	7,035.97	6,818.70	96.91	89.44	105.01	90.86	109.14	.000300	.000016	.000285	.99685
Criterio				> 80	< 125	> 80	< 125	< .05	< .05	< .05	> .80

A = Tratamiento A, C = Tratamiento C, IC = Intervalo de Confianza, LI = Límite Inferior, LS = Límite Superior, AH = Anderson Hauck

Figura 14. Perfil farmacocinético promedio de metformina \pm error estándar, en escala normal.

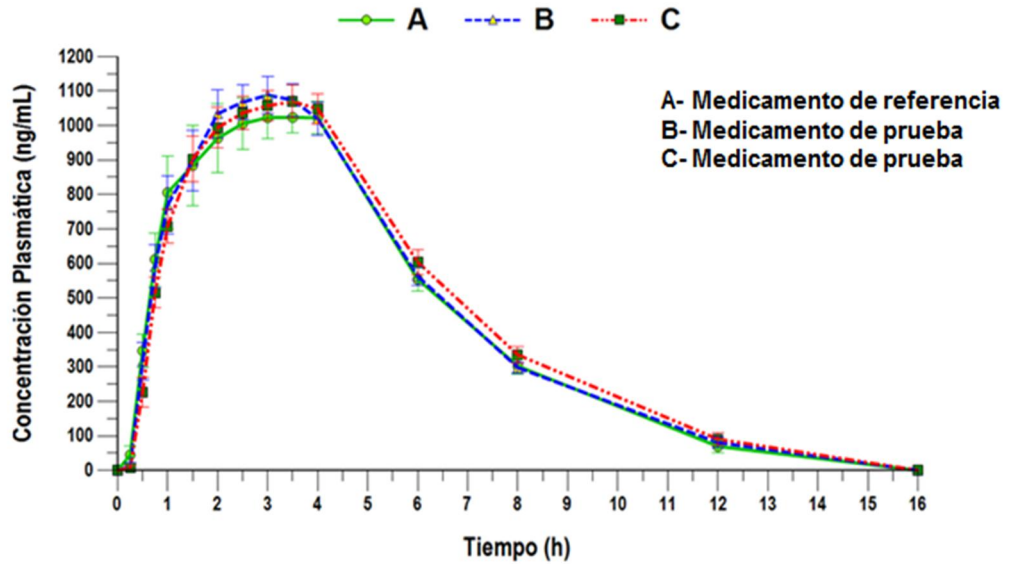


Figura 15. Perfil farmacocinético promedio de metformina \pm error estándar, en escala semilogarítmica.

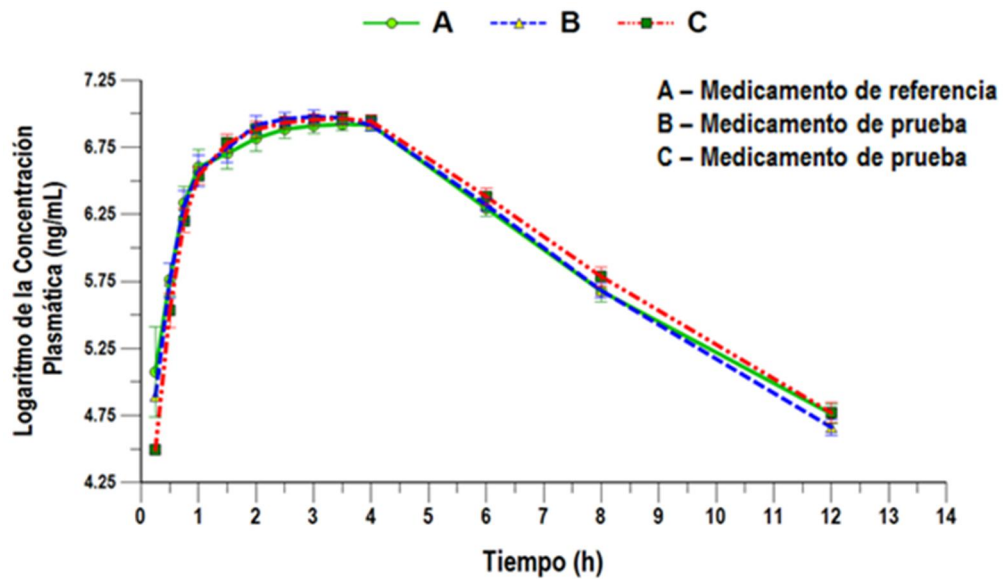


Figura 16. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. Medicamento A, B, C – Sujeto 01.

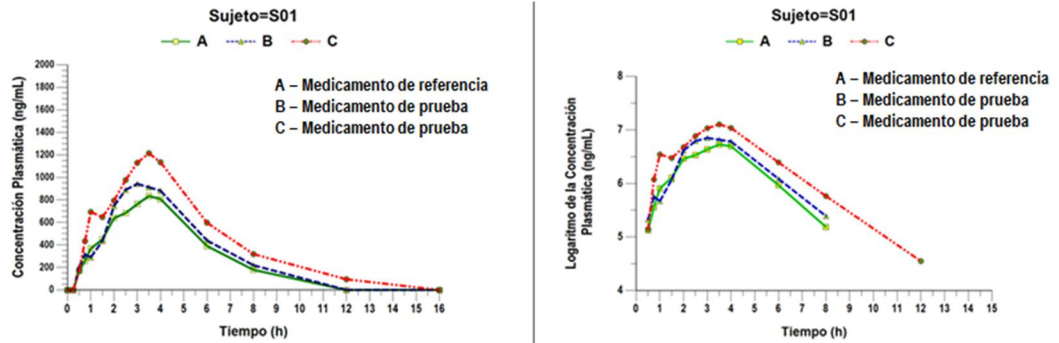


Figura 17. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. Medicamento A, B, C – Sujeto 02.

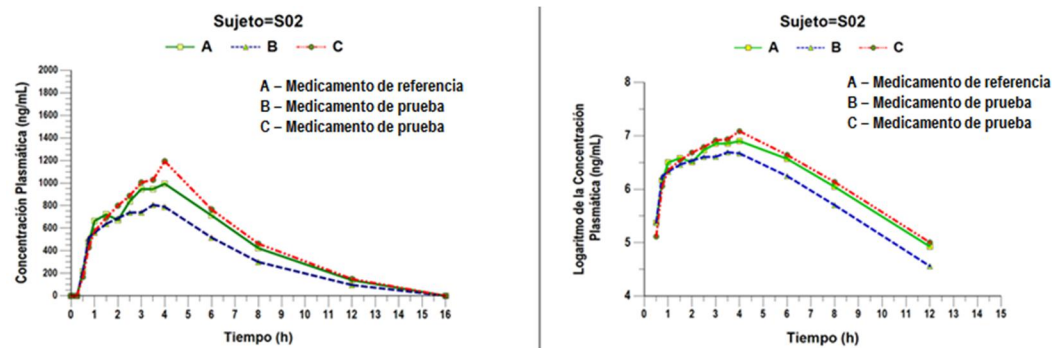


Figura 18. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. Medicamento A, B, C – Sujeto 03.

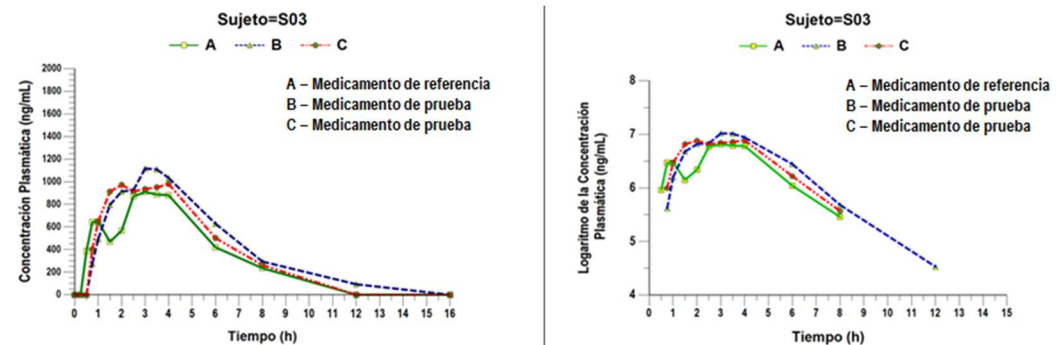


Figura 19. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. Medicamento A, B, C – Sujeto 04.

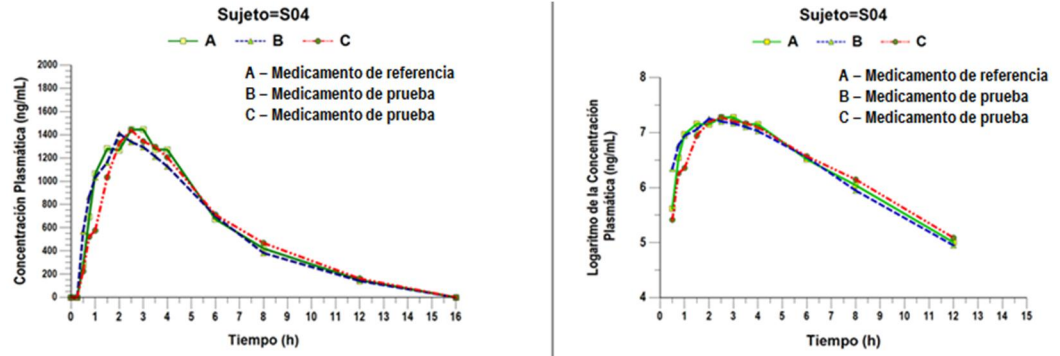


Figura 20. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. Medicamento A, B, C – Sujeto 05.

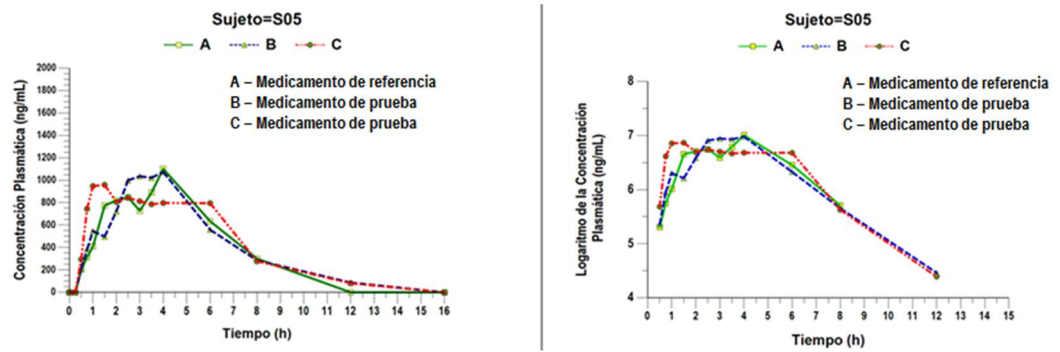


Figura 21. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. Medicamento A, B, C – Sujeto 06.

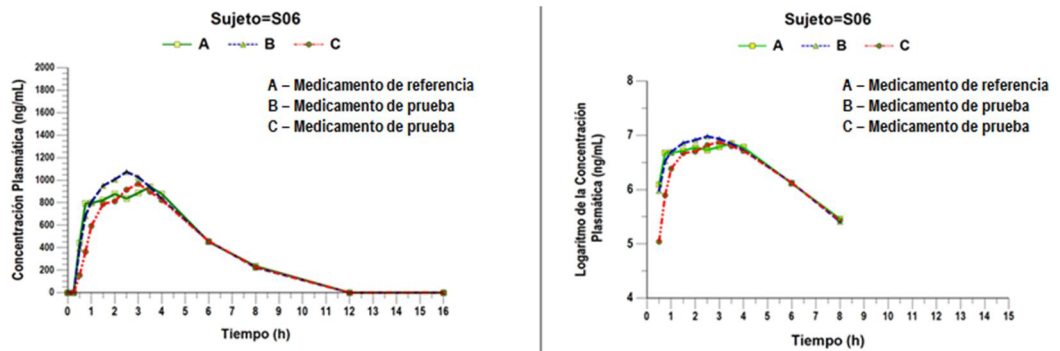


Figura 22. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. Medicamento A, B, C – Sujeto 07.

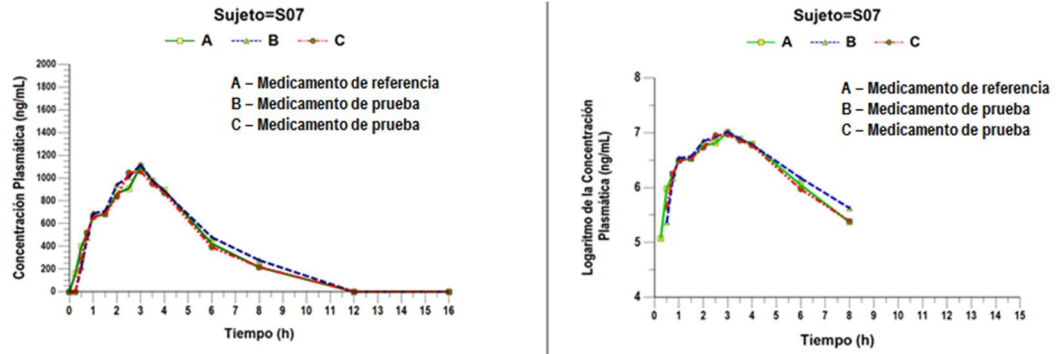


Figura 23. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. Medicamento A, B, C – Sujeto 08.

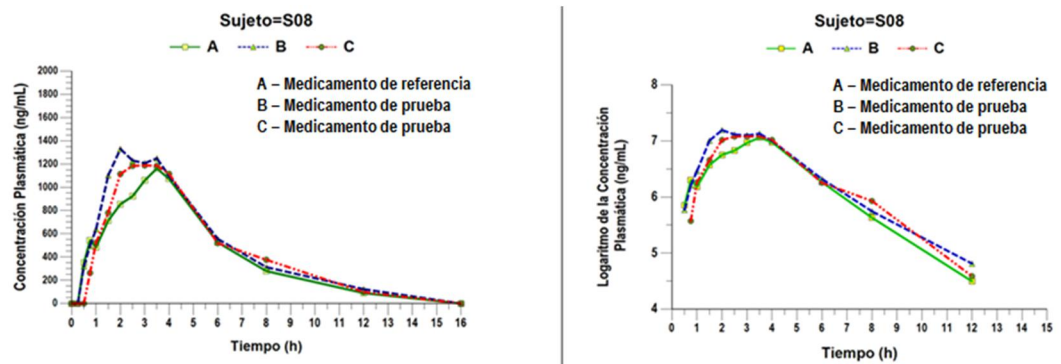


Figura 24. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. Medicamento A, B, C – Sujeto 09.

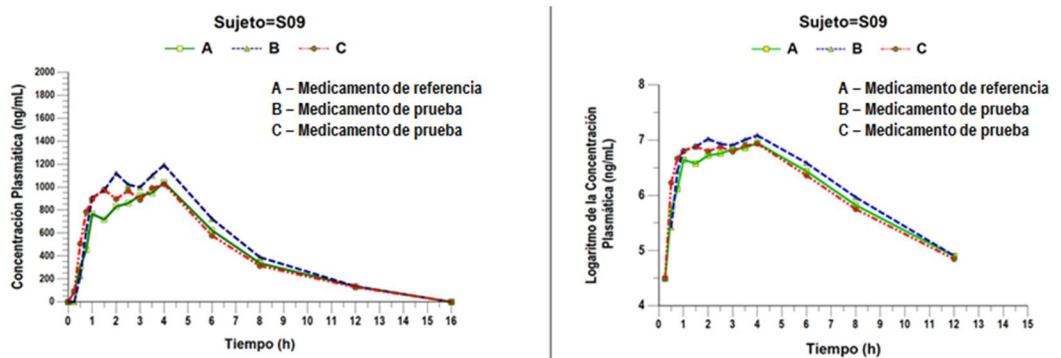


Figura 25. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. Medicamento A, B, C – Sujeto 10.

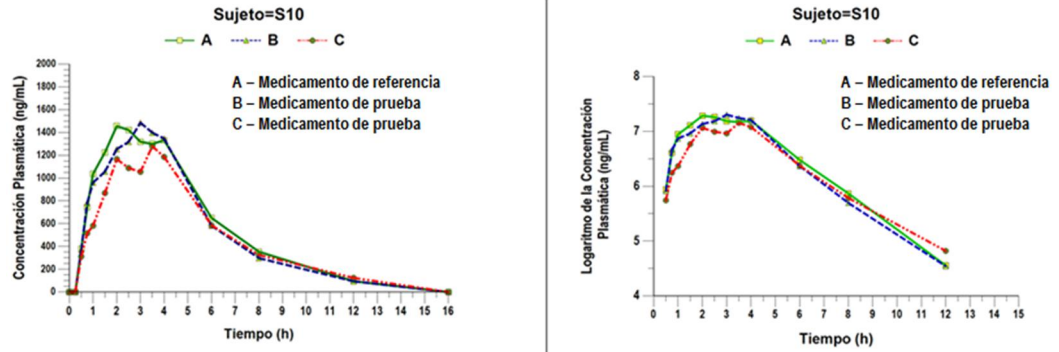


Figura 26. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. Medicamento A, B, C – Sujeto 11.

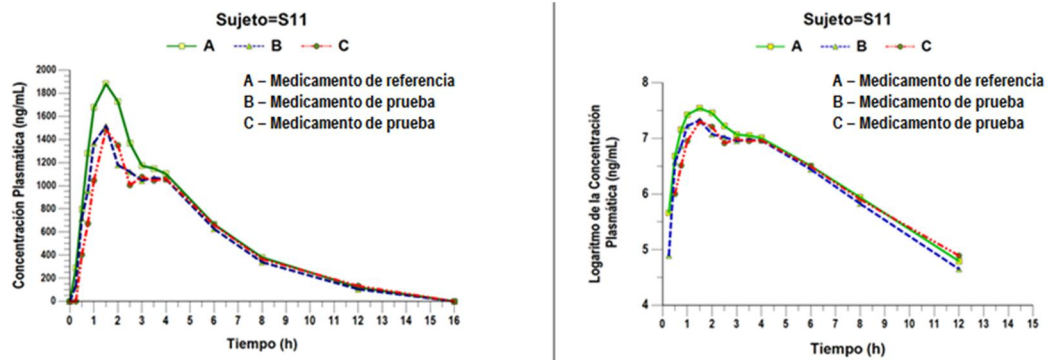


Figura 27. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. Medicamento A, B, C – Sujeto 12.

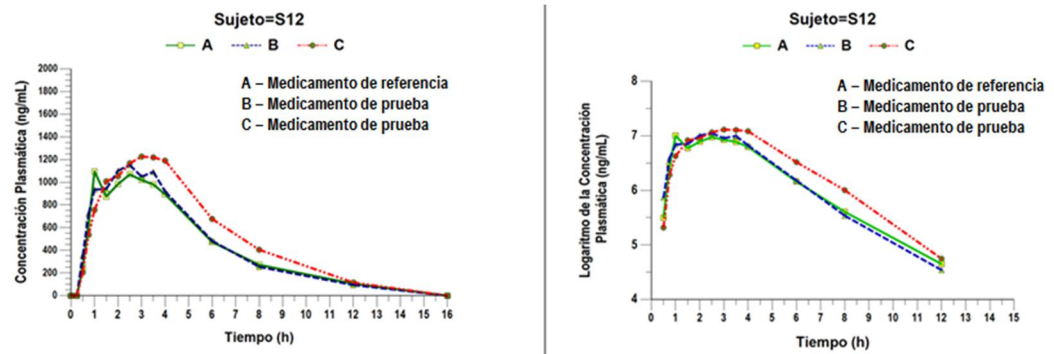


Figura 28. Gráficos de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo para el medicamento A.

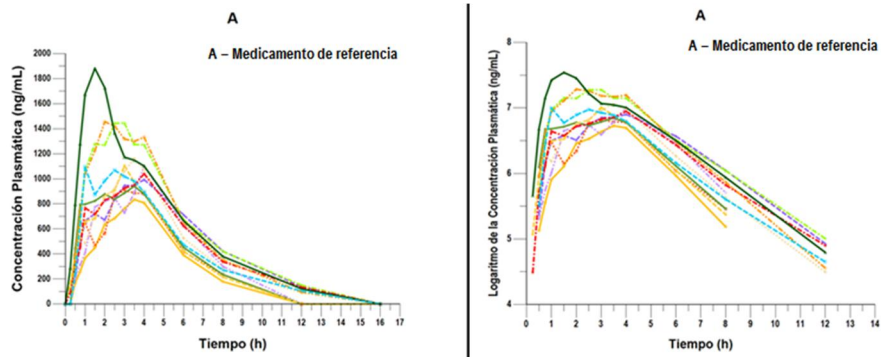


Figura 29. Gráficos de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo para el tratamiento B.

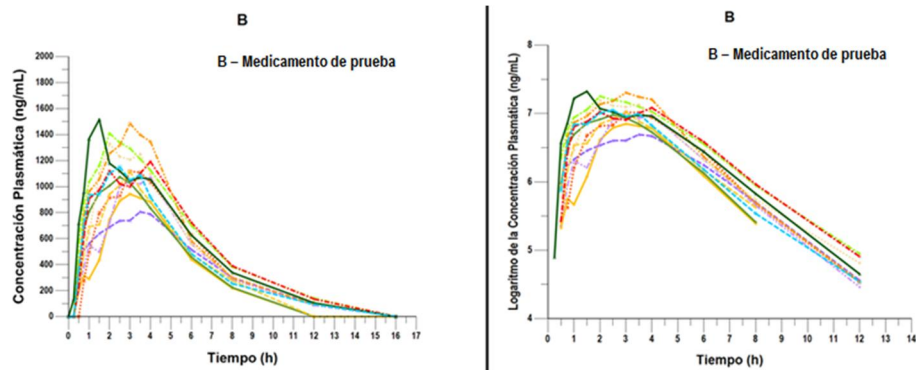
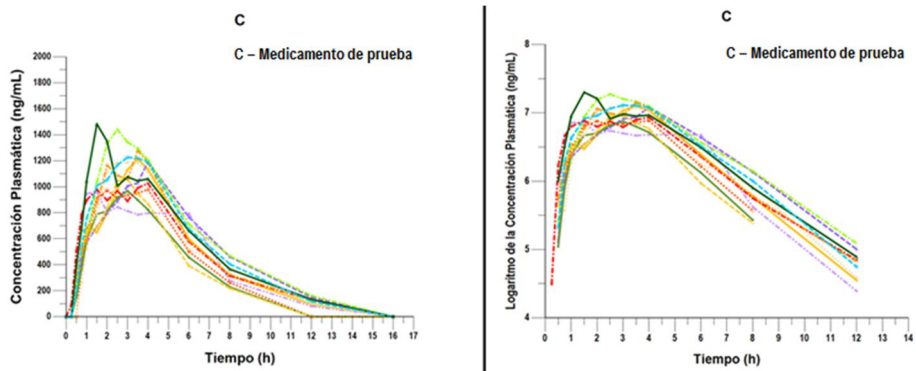


Figura 30. Gráficos de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo para el tratamiento C.



CAPÍTULO IV.

4. DISCUSIÓN.

4.1 Validación.

En este trabajo se desarrolló un procedimiento analítico para la cuantificación de metformina en plasma humano que cumple con los criterios establecidos por la NOM-177-SSA1-2013.

El procedimiento analítico consistió básicamente en un tratamiento de muestra por precipitación de proteínas con el empleo de acetonitrilo, y separación cromatográfica con una columna de interacciones hidrofílicas (HILIC) con posterior detección mediante espectrometría de masas en tandem (LC-MS-MS o HILIC-MS-MS).

En diversos estudios se ha determinado la metformina mediante cromatografía de líquidos y detección con ultravioleta, [38,39] sin embargo, este procedimiento requiere un intervalo de trabajo a concentraciones más altas ($\mu\text{g/mL}$). La sensibilidad que ofrece la espectrometría de masas como método de detección permite trabajar con concentraciones más bajas (ng/mL).

El intervalo de concentraciones de las soluciones empleadas en el presente estudio va desde 78.88 a 2,524.25 ng/mL, y se diseñó tomando en cuenta las concentraciones plasmáticas máximas reportadas en la literatura para sujetos de investigación caucásicos [17], que se encuentran alrededor de 1,600 + 200 ng/mL. [17] Según lo establecido por la NOM-177-SSA1-2013, el límite inferior de cuantificación debe ser del 5% de la concentración plasmática máxima que se reporte en la literatura para el analito en cuestión. De acuerdo a este criterio, se estableció 78.88 ng/mL como límite inferior de cuantificación, ya que el 5% de la $C_{m\acute{a}x}$ reportada es 80%.

Varios autores han recurrido a la derivatización para alcanzar niveles de concentración en el orden de ng/mL. [40]. Una de las ventajas de este procedimiento analítico es su alta sensibilidad que se alcanza con solo inyectar 1 μ L de muestra.

El intervalo de concentraciones que se manejó se encuentra dentro de lo reportado por Jung *et al.* (5 – 3,000 ng/mL), Hoelscher *et al.* (5 – 1,500 ng/mL), y Chen *et al.* (4- 5,000 ng/mL).

La precipitación de proteínas con acetonitrilo fue la técnica de tratamiento de muestra elegida para la determinación de metformina en este trabajo. Este tratamiento consume una pequeña cantidad de muestra, sólo 200 μ L de plasma humano, y emplea técnicas de extracción más rápidas y

económicas que la extracción en fase sólida empleadas en otros trabajos.[41-43]

Para el manejo del intervalo de trabajo en la curva de calibración (relación de concentraciones con su respuesta analítica), se empleó el modelo matemático lineal con ponderación. El modelo de tipo lineal asegura una relación continua y reproducible en el intervalo de trabajo. En el modelo de regresión lineal simple clásico se asume la misma varianza en todas las concentraciones, es decir, los datos son homocedásticos, sin embargo, para los datos de la curva de calibración la varianza generalmente aumenta con la concentración, los errores asociados con altas concentraciones son más altos y estos pueden afectar indebidamente la pendiente de la línea de calibración. En la regresión lineal no ponderada se trata a todos los puntos de la misma forma, lo que en efecto significa que los puntos de concentración más bajos tienen menos probabilidades de no encontrarse en la línea de calibración. Esto puede ser un problema importante si la curva de calibración se extiende sobre varios órdenes de magnitud. La respuesta es ponderar los datos y minimizar la suma de cuadrados ponderados. [44-46] En este estudio, se trabajó con un intervalo de trabajo dos órdenes de magnitud.

El tamaño de los errores aleatorios en la respuesta es dada por la varianza y es habitual para ponderar los datos por $1/s^2$, o algún valor que es directamente proporcional al recíproco de la varianza.

En otras palabras, los puntos con los errores más bajos asumen más importancia que aquellos con los errores más grandes. Si la desviación estándar relativa es constante a lo largo del intervalo de concentración utilizado para la curva de calibración a continuación, el tamaño de s es proporcional al tamaño del área y , para una relación lineal proporcional a la concentración de la muestra. En estas condiciones, se podría ponderar los datos por $1/(\text{respuesta})^2$ o por $1/(\text{concentración})^2$. El programa utilizado para la cuantificación de los datos permite la opción de ponderación.

La ponderación de datos, en la curva de calibración, no es un método para manipular el resultado para que parezca más aceptable, es el tratamiento estadístico correcto para los datos heterocedásticos [41].

Dado el intervalo de trabajo y las órdenes de magnitud empleadas en la curva de calibración para la cuantificación de metformina, fue necesario utilizar la ponderación lo cual es aceptado y ha sido ampliamente utilizado en el desarrollo de métodos bioanalíticos. [47-50]

Con respecto a la selectividad, está reportado que la cromatografía de LC-MS-MS es una técnica instrumental de alta especificidad, sensibilidad con capacidad de multianálisis que la convierte en una alternativa ideal al inmuno-ensayo y a cromatografía de líquidos de alta resolución convencional (CLAR). [51]

En este método no se observaron interferencia con fármacos que pudieran haber sido administrados de manera concomitante, así como con plasma humano lipémico o hemolizado; el criterio de aceptación para este parámetro fue una respuesta menor al 20% con respecto al límite de cuantificación para las respuestas cercanas al tiempo de retención. El uso de la técnica analítica instrumental utilizada permitió una rápida separación sin interferencias y disminuyó el tiempo de análisis, este estudio presenta una ventaja contra métodos reportados recientemente en los cuales el tiempo de análisis es mayor a 10 minutos. [52-54]

Uno de los inconvenientes de utilizar LC-MS-MS como técnica de análisis, es el efecto de matriz evidenciado por la supresión inesperada o aumento de la respuesta del analito de interés debido a coeluyentes constituyentes de la matriz al momento de ingresar en la fuente de ionización. [55]

Dado lo anterior la NOM-177-SSA1-2013 incluyó el efecto de matriz como un parámetro más de validación. Los resultados de este estudio no mostraron un efecto de matriz para los constituyentes del pool de plasma humano, ni para plasma humano hemolizado o lipémico. El tiempo de análisis por muestra incluyendo el lavado es menor a 5 minutos, lo que permite en teoría analizar más entre 100 y 250 muestras por día.

4.2 Análisis de muestras biológicas.

Durante el análisis de las muestras de sujetos, cada corrida analítica consistió en al menos una muestra blanco, curva de calibración (6 niveles de concentración) y al menos 3 niveles de concentración de muestras control (MCB, MCM y MCA) por duplicado por sujeto. El número de muestras control fue superior al 5% de muestras control del número de muestras del estudio establecidas en la NOM-177-SSA1-2013.

La NOM-177-SSA1-2013v establece que al menos dos muestras control se deben encontrar dentro del intervalo de concentraciones de las muestras del estudio. Las muestras control empleadas a nivel bajo, y a nivel medio, estuvieron siempre presentes dentro de las concentraciones de las muestras del estudio. Si bien es cierto que la muestra control alto, y muestra control de dilución no estuvieron presentes dentro de las concentraciones del estudio, estas pudieran aplicarse a estudios de bioequivalencia con dosis mayores de metformina.

Farmacocinética. Los parámetros farmacocinéticos obtenidos, concentración plasmática máxima ($C_{\text{máx}} 1,171.96 \pm 227.68 \text{ ng/mL}$) y área bajo la curva desde el tiempo cero hasta el último tiempo de muestreo ($ABC_{0-t} 6,413 \pm 1,325.17 \text{ h/mL}$), concuerdan con lo reportado para metformina en la literatura para población caucásica ($C_{\text{máx}} 1,600 + 380 \text{ ng/mL}$, $ABC_{0-t} 7,718 \pm 2,639.8 \text{ h/mL}$). [17,28]

La vida media de 2.38 horas resultó menor a lo reportado en otros estudios realizados en poblaciones asiáticas (5.53 horas), mientras que fue muy semejante a lo obtenido para poblaciones caucásicas (1.74 horas). [17,27] Este es un hecho común en estudios de BE, por lo que las pruebas deben realizarse en la población en la que se va a comercializar el producto.

El tiempo máximo fue de 2.9 ± 0.9 h, y en la mayoría de los sujetos se detectaron concentraciones en sangre por encima del límite de cuantificación a partir de las 0.5 horas. Ningún sujeto mostró concentración mayor al límite de cuantificación en la toma correspondiente a las 16 horas, al contrario de lo reportado por Lingyun C. *et al.* (20 h, 200 ng/mL).

La metformina no es metabolizada, y es excretada en la orina de manera inalterada. Diversos transportadores orgánicos participan en los procesos de absorción y excreción de la metformina, en estos procesos al menos dos tipos de transportadores de cationes orgánicos OCT1 y OCT2 han sido identificados. [56] Polimorfismos en los genes de estos transportadores se han asociado con variabilidad en el área bajo la curva y el $C_{\text{máx}}$. [57] La variabilidad en los parámetros farmacocinéticos de metformina en este estudio puede deberse a la presencia de estos transportadores.

Análisis estadístico. Previo a la determinación de bioequivalencia es necesaria la conducción de un Análisis de Varianza (ANADEVA) con el fin de evaluar todos los factores que pudieran afectar la conclusión del estudio, siendo estos secuencia, fármaco, período y error experimental. Un trabajo previo reportado por la Universidad de Antioquia reportó efecto de período al estudiar la bioequivalencia para dos formulaciones de metformina. [54] En el período dos del estudio, se observa que para las tres secuencias de los tratamientos se obtuvo una $C_{m\acute{a}x}$ y un área bajo la curva mayor, sin embargo, los resultados del análisis estadístico ANADEVA no mostraron efecto debido a los factores de secuencia, período y tratamiento en el diseño experimental; con lo que se puede establecer que el tiempo de lavado en el estudio fue lo suficientemente largo para asegurar la correcta eliminación del fármaco previa a la administración del medicamento en el período subsecuente.

En cuanto a los resultados obtenidos en las pruebas para establecer bioequivalencia, los cocientes de las relaciones de $C_{m\acute{a}x}$ y ABC, tanto de los medicamentos de prueba contra el medicamento de referencia, así como en la comparación de los medicamentos de prueba entre ellos, estuvieron dentro de lo permitido por la norma 177: 80-125%, con un intervalo de confianza del 90% y una potencia superior al 80%.

Como se mencionó en la introducción, se han realizado diversos estudios alrededor del mundo en los que se han evaluado medicamentos genéricos *postmarketing*, entre ellos genéricos de fenitoína, amoxicilina, teofilina, y omeprazol. El resultado de dichos estudios mostró bioinequivalencia entre los medicamentos genéricos comparados contra el medicamento de referencia, sin llegar a comparar los medicamentos genéricos entre ellos. En este estudio de comparación de formulaciones genéricas de metformina, primeramente se comparó cada formulación genérica contra el medicamento de referencia establecido por la Secretaría de Salud, para corroborar la bioequivalencia, requisito establecido por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios para su comercialización. Posteriormente, como propósito principal del estudio, se compararon las formulaciones genéricas de metformina entre sí, y se obtuvo que los cocientes de sus parámetros farmacocinéticos se encontraban dentro de los intervalos establecidos por las pruebas de Westlake y Schuirmann para establecer bioequivalencia.

La potencia estadística de 0.99 es contundente para demostrar que el tamaño de muestra es adecuado para establecer un juicio de bioequivalencia a partir de los resultados obtenidos.

Eventos adversos. Las reacciones adversas a metformina son del tipo gastrointestinales, predominan diarrea, cólicos abdominales y distensiones. [17] En nuestro estudio, durante los tres períodos de tratamientos no se presentaron eventos adversos, evidenciados por signos y síntomas, o por cambios en los parámetros de laboratorio.

CAPÍTULO V.

5. CONCLUSIÓN.

El método analítico cumplió con los parámetros establecidos en la NOM-177-SSA1-2013, y por lo tanto es confiable para el análisis de metformina en plasma humano. El intervalo de trabajo del procedimiento analítico desarrollado en este trabajo, permite su aplicación a estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia para todas las formulaciones de metformina de liberación inmediata utilizadas en la clínica (500, 850 y 1,000 mg).

De acuerdo a los criterios de la NOM-177-SSA1-2013 para establecer bioequivalencia, las formulaciones estudiadas (Pre-Dial y Dimefor) mostraron ser bioequivalentes, lo que indica que los dos medicamentos genéricos evaluados son intercambiables entre sí, por lo pueden ser utilizados de manera indistinta en la terapéutica médica.

CAPÍTULO VI.

6. PERSPECTIVAS.

Como perspectiva se plantea el análisis de medicamentos genéricos de índice terapéutico estrecho, así como realizar comparaciones de medicamentos genéricos que se encuentran en el mercado utilizados en el tratamiento de padecimientos crónicos, como la hipertensión arterial.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Waldman S., Terzic A. *Farmacología y terapéutica. Principios para la práctica*. Editorial El Manual Moderno, México, 2009, p. 15 – 28.
2. Magos G., Lorenzana M. *Monografía: Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos*. Rev. Fac. Med. UNAM Vol. 52 No. 6 Noviembre-Diciembre, 2009, p. 260 – 264.
3. Guía Nacional para la Integración y el Funcionamiento de los Comités de Hospitalarios de Bioética. Comisión Nacional de Bioética. Secretaria de Salud, 2010, p. 60.
4. Comisión Nacional de Bioética. *Código de Nüremberg*. Normas éticas sobre la experimentación en seres humanos.
5. *World Medical Association Declaration of Helsinki*: Ethical principles for medical research involving human subjects [WMA Web site]. Adopted by the 18th WMA General Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, and amended by the 52nd WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland, October 7, 2000. <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>.
6. Patel J., Kritika A., Tiwari R. *A review on bioavailability and bioequivalence trials and its necessity*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. Vol. 2. Issue 3, 2010, ISSN- 0975-1491, p. 1 - 8.
7. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013.

8. Pardo A., San Martín R. *Análisis de datos en ciencias sociales y de la salud II. Volumen 3 de Metodología de las Ciencias del Comportamiento y de la Salud*. Editorial Síntesis, 2010.
9. Pavelieu M., Bengea S., Pavelieu F. *Generic Substitution Issues: Brand-generic Substitution, Generic-generic Substitution, and Generic Substitution of Narrow Therapeutic Index (NTI)/Critical Dose Drugs*. *Maedica, A Journal of Clinical Medicine*, Volume 6, No. 1, 2011.
10. Del Tacca M., Pasqualetti G., Di Paolo A., et al. *Lack of pharmacokinetic bioequivalence between generic and branded amoxicillin formulations. A post-marketing clinical study on healthy volunteers*. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 68:1, 2009, p. 34–42.
11. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Suplemento para establecimientos dedicados a la venta y suministro de medicamentos y demás insumos para la salud. Secretaría de Salud, 4ª edición, México, 2010.
12. Chow S., Shao J. *Bioequivalence review for drug interchangeability*. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, 9(3), 1999, p. 485–497.
13. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. Temas de Interés. <http://www.cofepris.gob.mx/>
14. *Standards of Medical Care in Diabetes – 2014*. American Diabetes Association *Diabetes Care* Volume 37 , Supplement 1, January 2014.
15. International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas*, 5ª edición. <http://www.idf.org/diabetesatlas/>

16. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, Resultados Nacionales, 2012. Instituto Nacional de Salud Pública, Secretaría de Salud.
17. Brunton L., Chabner B., Knollmann B. *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la Terapéutica*. 12a edición, McGraw Hill, México, 2012.
18. Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010. Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.
19. Qaseem A., Humphrey L., Sweet D., et al. *Clinical Guideline. Oral Pharmacologic Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus: A Clinical Practice Guideline From the American College of Physicians*. Ann Intern Med. 2012;156, p.218-231.
20. Gobierno Federal. Consejo de Salubridad General. Guía de Práctica Clínica. Diagnóstico, metas de control ambulatorio y referencia oportuna de prediabetes y diabetes mellitus tipo 2 en adultos en el primer nivel de atención. SS-093-08.
21. Moffat A., Osselton M., Widdop B. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, 4^a Ed Pharmaceuticals Press, London, 2011.
22. Lacy C. et al. *Drug Information Handbook, a Comprehensive Resource for all Clinicians and Health care Professionals*, Lexi-Comp, APha, 17th Ed, 2008-2009.
23. Gogtay N., Dalvi S., Mhatre R. et al. *A Randomized, Crossover, Assessor-Blind Study of the Bioequivalence of a Single Oral Dose of 200 mg of Four Formulations of Phenytoin Sodium in Healthy, Normal Indian*

Volunteers. *Therapeutic Drug Monitoring* 25:215–220, © 2003 Lippincott Williams & Wilkins, Inc., Philadelphia

24. El-Sayed A., Boraie N., Ismail F. et al. Assessment of the pharmaceutical quality of omeprazole capsule brands marketed in Egypt. *Eastern Mediterranean Health Journal*, Vol. 13, No. 6, 2007

25. Parvez N., Ahmed T., Monif T. et al. *Comparative bioavailability of three oral formulations of sustained release theophylline in healthy human subjects*. *Indian J. Pharmacol.* Vol.1, issue 1, 2004

26. Food and Drug Administration, *Draft Guidance on Metformin Hydrochloride*, 2009.

27. Jun J., Kim J., Kim S., Kim T., et al. *Pharmacokinetics of a Fixed-Dose Combination of Mitiglinide and Metformin versus Concurrent Administration of Individual Formulations in Healthy Subjects. A Randomized, Open-Label, Two-Treatment, Two-Period, Two-Sequence, Single-Dose, Crossover Study*. Published online: 26 October 2012, © Springer International Publishing Switzerland 2012.

28. Chen L., Zhou Z., Shen M., Ma A. *Simultaneous Determination and Pharmacokinetic Study of Metformin and Rosiglitazone in Human Plasma by HPLC-ESI-MS*. *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 49, 2011.

29. Hoelscher D., Chu P., Lyness W. *Fixed-Dose Combination Tablet of Repaglinide and Metformin is Bioequivalent to Concomitantly Administered Individual Tablets of Repaglinide and Metformin*,

Randomized, Single-Blind, Three Period Crossover Study in Healthy Subjects. Clin. Drug Invest. 2008, 28 (9).

30. Kandhwal K. Dey S., Nazarudheen S., *et al.* *Pharmacokinetics of a Fixed-DoseCombination of Atorvastatin and Metformin Extended Release versus Concurrent Administration of Individual Formulations. A Randomized, Open-Label, Two-Treatment, Two-Period, Two-Sequence, Single-Dose, Crossover, Bioequivalence Study.*Clin. Drug Investig. 2011:31 (12): 853-863.

31. Harahap Y., Purnasari S., Hayun H., *et al.* *Bioequivalence Study of Metformin HCl XR Caplet Formulations in Healthy Indonesian Volunteers.* J.Bioequiv. Availab., 2011, Volume 3(1): 016-019.

32. Skoog D., Holler J., Crouch S. *Principios de Análisis Intrumental.* Cengage Learning, 6ª edición, México, 2011.

33. Chow S., Liu J. *Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies.* Marcel Dekker, Inc. New York. (1992). 1-161; 217-252.

34. Bolton S. *Pharmaceutical Statistics. Practical and clinical Applications.* 3rd. ed. Marcel Dekker, Inc. New York. (1997). 355-443.

35. Westlake W., *Simmetrical confidence intervals for bioequivalence trials.* Biometrics. 1976; 32:741-744.

36. Schuirmann, D. *A comparison of the two one-sided tests procedure and the power approach for assessing the equivalence of average*

bioavailability. J. Pharmacokinetics and Biopharmaceutics; 1987, 715:657-680.

37. Brown Jr. B. W.: *The crossover experiment for clinical trials*. Biometrics 36: 69-79, 1980

38. Madhukar A., Prince A., Vijay Kumar R., *et al.* *Simple and sensitive analytical method development and validation of metformin hydrochloride by RP-HPLC*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. Vol. 3, issue 3, 2011. ISSN- 0975-1491.

39. Patel D., Patel L., Patel M. *Stability Indicating HPLC Method for Simultaneous Determination of Repaglinide and Metformin Hydrochloride in Pharmaceutical Dosage Form*. Asian J. Research Chem. 4(3): March 2011. ISSN 0974-4169.

40. Tache F., *et al.* *HPLC-DAD determination of Metformin in human plasma using derivatization with p-nitrobenzoyl chloride in a biphasic system*. Microchemical Journal, 2001. 68(1): p. 13-19.

41. WuX. *et al.* *Optimization of a solid phase extraction and hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of metformin in dietary supplements and herbal medicines*. Food Chemistry, 2012. 133(2): p. 482-488.

42. Lai E., Feng S. *Solid phase extraction—Non-aqueous capillary electrophoresis for determination of metformin, phenformin and glyburide in human plasma*. Journal of Chromatography B, 2006. 843(1): p. 94-99.

43. AbuRuz, S., Millership J., McElroy J. *Determination of metformin in plasma using a new ion pair solid phase extraction technique and ion pair liquid chromatography.* Journal of Chromatography B, 2003. 798(2): p. 203-209.
44. Flanagan R., et al. *Fundamentals of Analytical Toxicology.* 2008: Wiley.
45. Almeida, A., Castel-Branco M., Falcao A. *Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002. 774(2): p. 215-22.
46. Zeng Q.C., et al. *Weighted least squares in calibration: estimating data variance functions in high-performance liquid chromatography.* J Chromatogr A, 2008. 1206(2): p. 147-52.
47. Kingback M., et al. *Stereoselective determination of venlafaxine and its three demethylated metabolites in human plasma and whole blood by liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometric detection and solid phase extraction.* J Pharm Biomed Anal, 2010. 53(3): p. 583-90.
48. Hishinuma T., et al. *Simple quantification of lansoprazole and rabeprazole concentrations in human serum by liquid chromatography/tandem mass spectrometry.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008. 870(1): p. 38-45.
49. Fortuna A., et al. *Development and validation of an HPLC-UV method for the simultaneous quantification of carbamazepine,*

oxcarbazepine, eslicarbazepine acetate and their main metabolites in human plasma. Anal Bioanal Chem, 2010. 397(4): p. 1605-15.

50. Campanero M., et al. Improved selectivity in detection of polar basic drugs by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. Illustration using an assay method for the determination of famotidine in human plasma. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2001. 763(1-2): p. 21-33.

51. Leung K., Fong B. *LC-MS/MS in the routine clinical laboratory: has its time come?* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014. 406(9-10)

52. Tache F., et al. *HPLC-DAD determination of Metformin in human plasma using derivatization with p-nitrobenzoyl chloride in a biphasic system*. Microchemical Journal, 2001. 68(1): p. 13-19.

53. Porta V., et al. *HPLC-UV determination of metformin in human plasma for application in pharmacokinetics and bioequivalence studies*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008. 46(1)

54. Chhetri H., Thapa P., Van Schepdael A. *Simple HPLC-UV method for the quantification of metformin in human plasma with one step protein precipitation*. Saudi Pharmaceutical Journal.

55. Smeraglia J., Baldrey S., Watson D. *Matrix effects and selectivity issues in LC-MS-MS*. Chromatographia, 2002. 55(1): p. S95-S99.

56. Gong L., et al. *Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics*. Pharmacogenet Genomics, 2012. 22(11).

57. Santos N. *Comparative Pharmacokinetic Study between Metformin Alone and Combined with Orlistat in Healthy Mexican Volunteers*. *Pharmacology & Pharmacy*, 2002. 3: p. 300-306.
58. Yoon H., *et al.* *Influences of Organic Cation Transporter Polymorphisms on the Population Pharmacokinetics of Metformin in Healthy Subjects*. *The AAPS Journal*, 2013. 15(2): p. 571-580.
59. Association, A.D., *Generic Drugs*. *Diabetes Care*, 2007. 30(1)

GLOSARIO.

De acuerdo a los términos establecidos por la NOM-177-SSA1-2013.

Biodisponibilidad. Proporción de fármaco que se absorbe a la circulación general después de la administración de un medicamento y el tiempo que requiere para hacerlo.

Bioequivalencia. Relación entre dos equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuando al ser administrados bajo condiciones similares producen biodisponibilidades semejantes.

Consentimiento informado. Acuerdo por escrito, mediante el cual el sujeto de investigación o, en su caso, su representante legal autoriza su participación en la investigación, con pleno conocimiento de la naturaleza de los procedimientos y riesgos a los que se someterá, con la capacidad de libre elección y sin coacción alguna.

Control de calidad. Sistema de actividades operacionales rutinarias puestas en el lugar donde se desarrollan los procesos para identificar y corregir las desviaciones de los requisitos establecidos.

Corrida analítica. Conjunto de muestras analizadas en forma continua, bajo las mismas condiciones experimentales.

Curva de calibración. Conjunto de concentraciones que describen el intervalo en el cual se cuantifica el compuesto por analizar.

Denominación Común Internacional. Nombre que identifica una sustancia farmacéutica o principio activo farmacéutico mediante un nombre único que es reconocido a nivel mundial y es de dominio público.

Efecto de acarreo. Efecto generado por la aparición o aumento de la señal del analito causado por la contaminación de muestras anteriores.

Equivalente farmacéutico. Especialidad farmacéutica con el mismo fármaco y forma farmacéutica, con igual concentración o potencia, que utiliza la misma vía de administración y que cumple con especificaciones farmacopeicas u otros estándares internacionales. Los aditivos pueden ser diferentes que los del medicamento de referencia.

Estabilidad a largo plazo. Propiedad del compuesto por analizar en una matriz biológica, de conservar sus características, desde el

momento del muestreo hasta el análisis de todas las muestras así como reanálisis (en caso de realizarse este último).

Exactitud. Concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

Intervalo de trabajo. Intervalo de un método analítico definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior del compuesto, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

Linealidad. Capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener una respuesta proporcional a la concentración del compuesto en la muestra.

Límite inferior de cuantificación. Concentración más baja del analito que puede medirse cumpliendo con la precisión y exactitud, determinada en función de las necesidades de cuantificación del estudio.

Límite superior de cuantificación. Concentración más alta del analito que puede medirse con la precisión y exactitud, determinada en función de las necesidades de cuantificación del estudio.

Lote. Cantidad de un fármaco o un medicamento, que se produce en un ciclo de fabricación y cuya característica esencial es su homogeneidad.

Material de referencia. Material o sustancia, en la cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y bien definidos, para ser utilizados para calibración de aparatos, la evaluación de un método de medición o para asignar valores a materiales.

Matriz biológica. Material de origen biológico en el cual se encuentra el analito o fármaco de interés.

Medicamento de prueba. Medicamento proveniente de un lote de producción o de un tamaño no menor al 10% del mismo cuando éste sea mayor a 100, 000 unidades, manteniendo el equipo y el proceso de manufactura, que se fabrique conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013 y que cumpla con los estándares de calidad oficiales establecidos en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

Medicamento de referencia. Medicamento indicado por la Secretaría como tal, que cuenta con el registro de dicha dependencia, que se

encuentra disponible comercialmente y es seleccionado conforme a los criterios establecidos en las Normas.

Muestras control. Muestras de matriz adicionada con el analito en concentración específica usada para validar y monitorear el desempeño de un método analítico.

Muestra control baja. Muestra de la matriz adicionada de analito en concentración equivalente hasta 3 veces el límite inferior de cuantificación.

Muestra control media. Muestra de la matriz adicionada de analito en concentración intermedia entre muestra control baja y la muestra control alta.

Muestra control alta. Muestra de la matriz adicionada de analito en concentración entre el 75-85% de la concentración del límite superior de cuantificación.

Muestra control diluida. Muestra de la matriz adicionada de analito en concentración mayor al límite superior de cuantificación de la curva de calibración, que se diluye con matriz exenta del analito a una concentración dentro del intervalo de la curva de calibración.

Precisión. Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea; se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.

Productos bioequivalentes. Equivalentes farmacéuticos en los cuales no se observa diferencia significativa en la velocidad y cantidad absorbida del fármaco, cuando son administrados ya sea en dosis única o dosis múltiple bajo condiciones experimentales similares.

Reacción adversa. Cualquier efecto perjudicial y no deseado que se presenta a las dosis empleadas en el hombre para la profilaxis, el diagnóstico, la terapéutica o la modificación de la función fisiológica.

Repetibilidad. Precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo.

Reproducibilidad intralaboratorio. Precisión bajo las variaciones que comúnmente pueden ocurrir dentro del laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos.

Selectividad. Capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos en la muestra.

Sujeto de investigación. Sujeto sano o paciente de investigación que haya expresado libremente y por escrito su consentimiento informado para participar en el estudio.

Verificación del Sistema. Verificación de que el sistema analítico opera con base en criterios preestablecidos, que permitan asegurar su desempeño óptimo.