



Tesis de Maestría en Química

Influencia del Modo de Administración en la Bioequivalencia de Medicamentos

Departamento de Ciencias Farmacéuticas

Facultad de Química – Universidad de la República

Q.F. Laura Magallanes

Tutor: Prof. Pietro Fagiolino

Supervisora en Universidad de Bath: Prof. Nikoletta Fotaki

Índice de contenidos

Capítulo 1: Introducción, objetivos y metodología general.

Capítulo 2: Ensayos de disolución de comprimidos conteniendo furosemide, simulando el tránsito de éstos a través del tracto gastrointestinal.

Capítulo 3: Bioequivalencia de dos formulaciones de administración oral conteniendo Furosemide en condiciones de ayuno.

Capítulo 4: Correlaciones *in vivo* – *in vitro*.

Capítulo 5: Bioequivalencia de dos formulaciones de administración oral conteniendo Furosemide en condiciones de administración coprandial. Comparación de los modos de administración ensayados.

Capítulo 6: Relación farmacocinética /farmacodinamia (PK/PD) para Furosemide.

Capítulo 7: Influencia del modo de administración en la bioequivalencia de medicamentos: conclusiones generales.

Capítulo 8: Bibliografía.

Agradecimientos

Anexo I: Protocolo de Bioequivalencia.

Anexo II: Procedimiento para la dosificación de furosemide en orina del CEBIOBE.

Capítulo 1: Introducción, objetivos y metodología general

Medicamentos similares

Los medicamentos que contienen el mismo principio activo se ofrecen en el mercado farmacéutico como “similares” o como “alternativas farmacéuticas”. Dentro de los primeros se hallan los que originalmente se comercializaron como innovaciones y los que luego de un tiempo aparecieron como copias. Entre los segundos encontramos aquellos que contienen diferentes ingredientes que rinden el mismo principio activo, y aquellos que conteniendo el mismo ingrediente lo vehiculizan en diferentes formas farmacéuticas. Tanto pacientes como prescriptores se encuentran frente ofertas de similares cuyas biodisponibilidades relativas son desconocidas en nuestro país, en virtud de que la evaluación de las mismas quedó relegada por años, y aunque actualmente existe una base regulatoria ^[1] que intenta subsanar este rezago, el proceso de su elucidación sigue un curso demasiado lento.

Bioequivalencia

Las evaluaciones de bioequivalencia están metodológicamente sustentadas en un ensayo clínico de biodisponibilidad relativa, entre una especialidad dada (Test) y la correspondiente formulación de Referencia. La razón de una disímil biodisponibilidad es comúnmente el reflejo de la diferente velocidad de disolución del fármaco desde ambas formulaciones, o de la diferente entrega del principio activo desde las mismas hasta los sitios donde procede la absorción.

La Bioequivalencia resulta ser un tema de difícil comprensión pública, dada la manera como se evalúa. Por ejemplo, estos estudios se realizan habitualmente en horas de la mañana y en condiciones de ayuno, sin embargo, muchos medicamentos se administran más de una vez al día, otros se administran solo una vez pero a otra hora del día, y algunos se administran junto con la comida en lugar de en ayunas. A su vez, los estudios de bioequivalencia normalmente evalúan la biodisponibilidad tras la administración en única dosis, cuando bien es sabido que la mayoría de los medicamentos se prescriben para tratamientos crónicos. También nos encontramos con que los ensayos de bioequivalencia se llevan a la práctica en individuos sanos, pero los medicamentos se administran a pacientes.

El ensayo de bioequivalencia evalúa *in vivo* la equivalente performance biofarmacéutica (equivalencia biofarmacéutica) de dos productos de diferente origen, es decir, pretende confirmar que la biodisponibilidad en cantidad y en velocidad se verifica en similar extensión desde ambos productos en el ser humano, y por consiguiente podrían ser intercambiados durante el uso clínico con las expectativas de resultar equivalentes terapéuticos. El ensayo en sí es una prueba de calidad del producto copia/alternativo (Test), el cual se compara su rendimiento farmacocinético en el ser humano contra una Referencia. Es un paso muy importante, pero una prueba que está aún lejos de convalidar una intercambiabilidad clínica entre productos.

La bioequivalencia llevada a la práctica con el fin antes mencionado, pasa a ser una herramienta valiosa de progreso industrial, de protección sanitaria para pacientes, y de sustento económico para la sociedad. El concepto poblacional rige de un modo

universal como criterio para determinar cuándo dos medicamentos son bioequivalentes. Para lograrlo, el cociente Test/Referencia de medias poblacionales de aquellos parámetros que refieren a cantidad y a velocidad de absorción, deben comprenderse entre 0,80 y 1,25, con al menos 90% de confiabilidad [2]. Los parámetros más utilizados son el Área bajo la curva de concentraciones plasmáticas (AUC), y la concentración máxima plasmática (C_{max}).

Respecto al sujeto sano que participa de un ensayo de bioequivalencia, y paciente potencial que podría requerir de tales medicamentos en algún momento de su vida, el Grupo de Investigación que integro ha venido estudiando cómo el sexo de los individuos podría diferenciar de distinto modo el rendimiento farmacocinético de los productos Test y Referencia. Un trabajo de tesis de doctorado ha arribado a una firme conclusión de cómo las diferencias gastrointestinales existentes entre hombres y mujeres transformarían a dichos sujetos en medidores disímiles de la biodisponibilidad relativa [3], con lo cual la conclusión de bioequivalencia estaría muy sujeta al sexo de los voluntarios participantes, aun cuando el resultado en el conjunto de individuos daría el fallo determinante de bioequivalencia. Con este resultado por sexo, se estaría dando un importante avance en el pronóstico de bioequivalencia por subgrupos de la población, con la consecuencia que ello traería sobre la seguridad y eficacia del intercambio de medicamentos en cada paciente.

Estudios de disolución *in vitro*

Desde hace mucho tiempo se ha intentado reproducir en el laboratorio los procesos de disolución que acontecen en el tracto digestivo de los individuos. La meta primordial ha sido predecir *in vitro* la biodisponibilidad que se observará *in vivo*. Esta predicción ha tenido un importante impacto en el desarrollo de especialidades farmacéuticas, permitiendo arribar a la más apropiada formulación, con la más conveniente velocidad y cantidad de fármaco absorbido.

Más recientemente se ha avanzado hasta el punto de poder subrogar, en el caso de algunas drogas contenidas en medicamentos de liberación inmediata, los estudios de bioequivalencia, y así poder determinar y convalidar la aceptable biodisponibilidad de un “medicamento copia”, o medicamento similar a una Referencia [2]. La estrategia que se desarrolla para arribar a estos logros consiste en adecuar las condiciones operativas del método de disolución *in vitro* hasta obtener una correlación significativa con los resultados de biodisponibilidad *in vivo*. De este modo, se lograría economizar la puesta en el mercado de un medicamento copia, evitando además costos éticos importantes.

Sin embargo, aún persiste un importante margen de incertidumbre a la hora de bioeximir a un medicamento, es decir eximirle la evaluación de biodisponibilidad mediante el estudio de bioequivalencia. La principal razón es que los actuales métodos de estudio *in vitro* aún pueden fallar en sus pronósticos de biodisponibilidad. Esto se debe probablemente a que los métodos de disolución aplicados en las bioexenciones no contemplan las diferentes circunstancias de administración, las diferencias fisiológicas del tracto digestivo entre hombres y mujeres, o entre diferentes subgrupos de una población, o aquellas que provocadas por el entorno afectan el fenotipo gastrointestinal de los individuos.

Realidad en Uruguay

En nuestro país está vigente desde el 12 de enero de 2007 un decreto que regula la intercambiabilidad de medicamentos ^[1]. El mismo indica que estudios realizar para determinar la bioequivalencia de un medicamento copia frente a uno de referencia o, en caso de ser posible, bioeximirse mediante un ensayo de disolución *in vitro*.

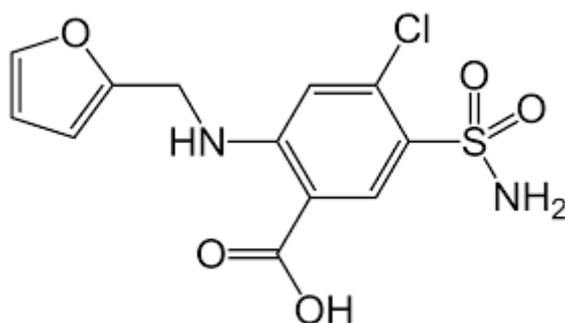
A pesar de contarse con una regulación apropiada, no se ha avanzado prácticamente en el tema desde entonces. El problema radica principalmente en la gran cantidad de especialidades farmacéuticas presentes en nuestro mercado, el costo que implica realizar dichos estudios en su totalidad, además del tiempo que insumiría. Ya que es una necesidad primordial el brindar a la población medicamentos de calidad, seguros y efectivos, resulta fundamental encontrar un modo de acelerar este proceso, y poder realizarlo de forma económica.

Absorción de drogas ácidas:

Cuando un comprimido de liberación inmediata conteniendo un fármaco ácido es administrado por la vía oral, la disolución de este tendrá lugar principalmente en las primeras porciones del intestino. La misma es prácticamente nula a nivel estomacal, ya que el pH del mismo es muy bajo como para que suceda esto. El comprimido se disgregará en el estómago, e irá pasando hacia el duodeno según la velocidad de vaciado gástrico. Una vez en el intestino, a un pH que posibilita la ionización de las moléculas de fármaco, este se encontrará enfrentando dos situaciones: disolución y permeación hacia los enterocitos. Cuando no existe un transporte activo hacia las células, dicha permeación se da por difusión, por lo cual, las moléculas que logran ingresar son las que no tienen carga iónica. Esto genera la presencia de “ventanas de absorción” ya que cuanto más avanzamos en el intestino, al presentarse mayores valores de pH, las drogas ácidas presentarán una relación $[A^-]/[AH]$ mayor, estando la mayor parte de sus moléculas ionizadas. Por tanto, a partir de cierto nivel de pH intestinal, a pesar de que las drogas logren disolverse, no podrán ser absorbidas ^[4, 5, 6, 7].

Fármaco estudiado:

En este trabajo de tesis, se tomó como fármaco modelo de drogas ácidas a la furosemida (o furosemide). La misma presenta una buena correlación PKPD ^[8], se encuentra en el mercado uruguayo bajo diferentes especialidades farmacéuticas, presenta problemas de biodisponibilidad y es una droga cuyo pKa es 3.9 ^[9].



El furosemide es un diurético de techo alto, o de asa, derivado de la sulfonamida. Inhibe el simporte de sodio, cloruro y potasio a nivel de la rama ascendente del asa de Henle y como consecuencia aumenta la excreción renal de sodio y agua, principal acción de la cual derivan sus usos en terapéutica. También aumenta la excreción de potasio, porque al aumentar la cantidad de sodio que llega al túbulo distal se incrementa el intercambio con potasio ^[10, 11].

Estimula la liberación de prostaglandinas renales por lo que produce vasodilatación de la arteria renal. La furosemide está indicada para eliminar los edemas por insuficiencia cardiaca, renal o hepática, y para el edema agudo de pulmón. Se usa en hipertensión arterial leve o moderada cuando la misma está asociada a insuficiencia cardiaca o renal. Su uso por vía parenteral es para los cuadros de crisis hipertensivas y oliguria ^[10].

Farmacocinética de la Furosemide tras su administración por vía oral

Absorción:

La mayor parte se da en el duodeno y primera porción del yeyuno. Esto sucede así debido a que la disolución, requisito previo para la absorción, supera ampliamente el inconveniente de la parcial ionización de la molécula. Furosemide es muy poco soluble a pH gástrico, y por consiguiente su absorción desde el estómago, así como su degradación gástrica, resulta muy improbable ^[12]. Zonas más bajas del intestino reducen sensiblemente su absorción dado que la ionización llega a extremos que dificultan la permeación por las membranas de los enterocitos ^[13, 14, 15]. Asimismo, el transportador de eflujo P-glicoproteína (Pgp) limita su permeación hacia el medio interno de modo progresivo cada vez que se avanza hacia la parte baja del intestino delgado, en virtud de la progresiva expresión de esta proteína de membrana ^[16]. El tiempo de máxima concentración plasmática (T_{max}) para furosemide en comprimidos es de 1,0 a 1,5 horas.

En hombres sanos en ayunas, la biodisponibilidad promedio de furosemide en tabletas es de 64% en relación con una inyección intravenosa del fármaco. La absorción del fármaco es bastante errática y afectada por la comida, si bien esta no alteraría la respuesta diurética. La diuresis se inicia a los 30-60 minutos después de la administración oral. El efecto máximo ocurre dentro de la primera o segunda hora y la duración del efecto diurético es entre 6 a 8 horas ^[17].

Efecto de la comida

En un estudio realizado administrando la furosemide con comidas y en ayunas ^[18], se observó que cuando la furosemide era administrada con el desayuno se reducía la C_{max} de 2.35 ± 0.49 a 0.51 ± 0.19 mg/L y se retrasaba T_{max} de 0.69 ± 0.21 a 1.91 ± 0.93 h. Asimismo, la biodisponibilidad oral del furosemide se reducía en un 30 % aproximadamente cuando se administraba con comidas.

Distribución:

El furosemide se une ampliamente a las proteínas plasmáticas, en especial a la albúmina (91 a 99%). Atraviesa la barrera placentaria y se excreta en la leche materna. El volumen de distribución del furosemide es de 0, 1 a 0,2 L/kg de peso corporal.

Eliminación:

La tasa de biotransformación constituye menos del 25% de la eliminación total de la droga ^[11], lo cual hace improbable una metabolización pre – sistémica como causa de su incompleta biodisponibilidad oral. Se excreta en buen porcentaje hacia la orina, y por tanto puede ser monitoreado a través de su concentración urinaria ^[8]. Entre 6 y 8% de la dosis se excreta a través de las heces. Presenta una semivida de eliminación de 2 horas. En los neonatos se observa una prolongación de la vida media de eliminación y se reduce en pacientes con enfermedad hepática, cardíaca o renal. El furosemide se elimina por la leche materna. Furosemide atraviesa la barrera placentaria y se transfiere lentamente al feto. Se recupera en el feto y en el recién nacido en las mismas concentraciones que en la madre ^[19].

Objetivos de la tesis

Dados los problemas mencionados anteriormente, el presente trabajo de tesis se ha enfocado en investigar si existen correlaciones entre las biodisponibilidades obtenidas bajo diferentes situaciones *in vivo*, y disoluciones *in vitro* según condiciones operativas apropiadas: correlaciones *in vitro* – *in vivo* (*iviv*). Más allá de un pronóstico de bioequivalencia para diferentes situaciones: hombre-mujer; ayuno-comida; se pretende predecir el impacto que tendría una eventual bioinequivalencia en la respuesta clínica de los pacientes, lo cual se evaluará a través de correlaciones entre su farmacocinética y su farmacodinamia (PKPD), relacionando la concentración de fármaco con el efecto que se obtiene en el individuo. Finalmente, se pretende arribar a un modelo que permita a través de ensayos de disolución *in vitro*, predecir la bioequivalencia (*in vivo*) entre medicamentos similares.

Capítulo 2. Ensayos de disolución de comprimidos conteniendo furosemide, simulando el tránsito de éstos a través del tracto gastrointestinal.

2.1 Introducción

Los estudios de disolución *in vitro* pretenden simular las condiciones fisiológicas en las que se dan los diferentes procesos que permiten que un medicamento administrado por vía oral se absorba en el organismo. Existen diferentes metodologías estandarizadas para realizar estos ensayos, dependiendo de qué forma farmacéutica se trate, y cual sea el objetivo del estudio.

2.2 Ensayo de disolución en Aparato II USP – Buffer acetato pH 4.6

En este estudio, el primer paso que se realizó fue el de ensayar la disolución de cuatro marcas comerciales uruguayas conteniendo 40 mg de Furosemide en medio *buffer* acetato pH 4.6, dado que según la bibliografía consultada, lograría diferenciar mejor los perfiles de disolución de tales medicamentos ^[20]. Seis unidades de cada producto fueron ensayados en el sistema de disolución Distek® 2100, configurado con una bomba peristáltica Agilent modelo 89092EO, y acoplado a un espectrofotómetro Agilent modelo 8453. El software ChemStation® (Agilent) controló todo el ensayo de disolución. La temperatura de ensayo fue de (37.0 ± 0.5) °C; el volumen de medio empleado de 900 mL; y velocidad de agitación 50 rpm. El muestreo se estableció a los siguientes tiempos: 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90 y 120 minutos.

La cuantificación de Furosemide se realizó mediante absorción espectrofotométrica a 277 nm. La figura 2.1 muestra los perfiles de disolución obtenidos.

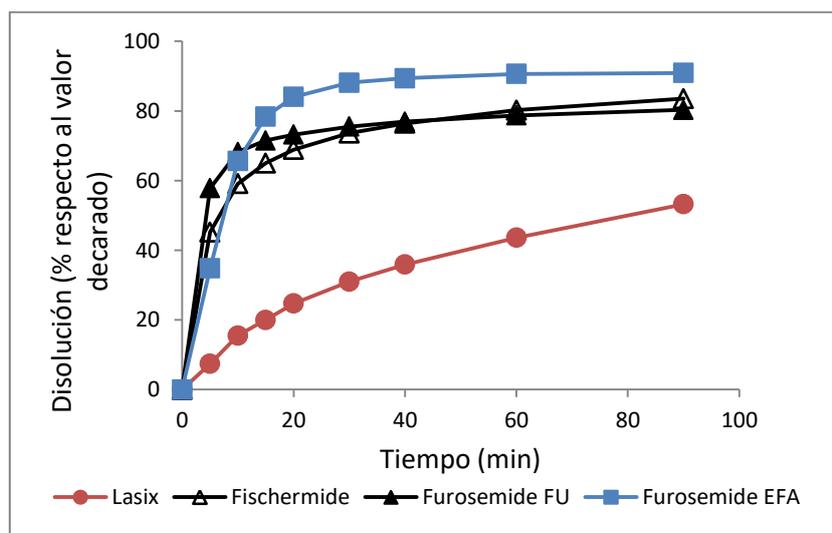


Figura 2.1. Perfiles de disolución obtenidos en Aparato II-USP medio buffer acetato pH 4.6 para cuatro formulaciones comercializadas en el territorio uruguayo.

2.3 Ensayo de disolución en Aparato IV USP – Buffer acetato pH 4.6

Tres unidades de cada producto fueron ensayadas utilizando el aparato de Disolución IV USP – celda de flujo continuo, marca Sotax modelo CE 7 Smart. Se realizó en medio *buffer* acetato pH 4.6 a 37.0 ± 0.5 °C. El flujo fue de 16 mL/min, permitiendo a la formulación durante 60 minutos estar en contacto con aproximadamente el mismo volumen de solvente que en el ensayo con el aparato II USP (960 mL). Se colectaron las muestras cada 15 minutos durante 3 horas. La cuantificación de Furosemide se realizó mediante absorción en el espectro UV a 277 nm. Los perfiles de disolución obtenidos se muestran en la figura 2.2:

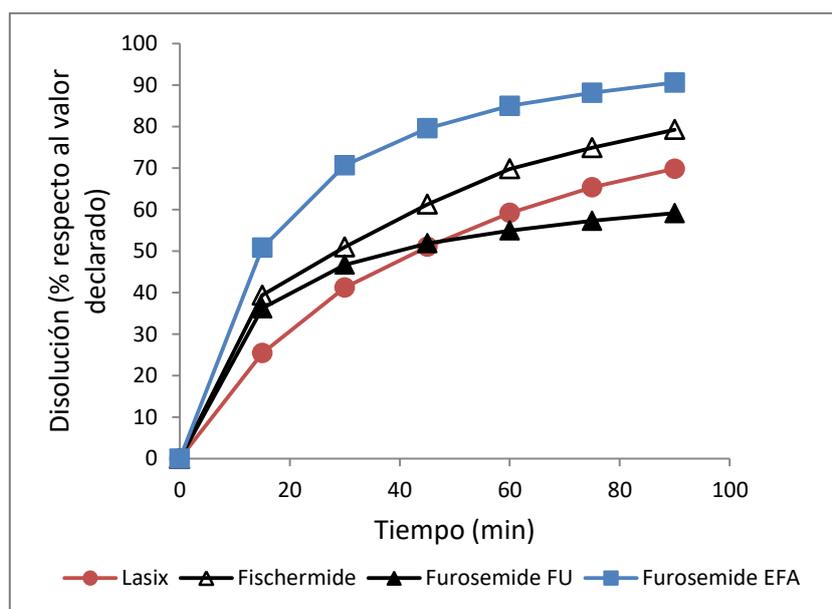


Figura 2.2. Perfiles de disolución obtenidos en aparato IV-USP medio buffer acetato pH 4.6 – flujo 16 mL/min, para cuatro formulaciones comercializadas en el territorio uruguayo.

Los perfiles de disolución obtenidos en los ensayos realizados utilizando los aparatos USP II y USP IV bajo las condiciones operativas antedichas, muestran que las formulaciones que presentan una mayor diferencia entre si son Lasix y Furosemide EFA. Los demás experimentos *in vitro* e *in vivo* que se realizaron para esta tesis, involucraron el uso de estas dos formulaciones, ya que al ser las que más difieren en estos perfiles de disolución *in vitro*, son las que presentan mayores probabilidades de ser bioinequivalentes.

2.4 Ensayo de disolución en Aparato IV USP – Disoluciones a pH variable desde 1.6 a 6.5 en Medios Biorrelevantes

Se realizaron estudios de disolución para las formulaciones Lasix y furosemide EFA en un medio que simula el fluido gástrico en condiciones de ayunas (Fasted State Simulated Gastric Fluid [FaSSGF] pH 1.6), durante 60 minutos a un flujo de 8 mL/min, con cambio secuencial a un medio que simula el fluido intestinal también en condiciones de ayuno (Fasted State Simulated Intestinal Fluid versión 2 [FaSSIF – V2])

pH 6.5), a un flujo de 4 mL/min durante 210 minutos. Estas condiciones de ensayo fueron establecidas a modo de simular la disolución *in vivo* de ambas formulaciones tras su administración en condiciones de ayuno en hombres ^[21, 22].

La cuantificación de furosemide fue realizada mediante Cromatografía líquida de alta performance acoplada a detector UV (HPLC-UV), con detección a 280 nm. El equipo utilizado fue Agilent 1200 Series, con software Chemstation (Agilent technologies, Santa Clara, Estados Unidos). Se utilizó una columna cromatográfica Thermo Hypersil BDS C18, 300 Å, 250 x 4.6 mm, 5 µm. Los resultados obtenidos se observan en la figura 2.3.

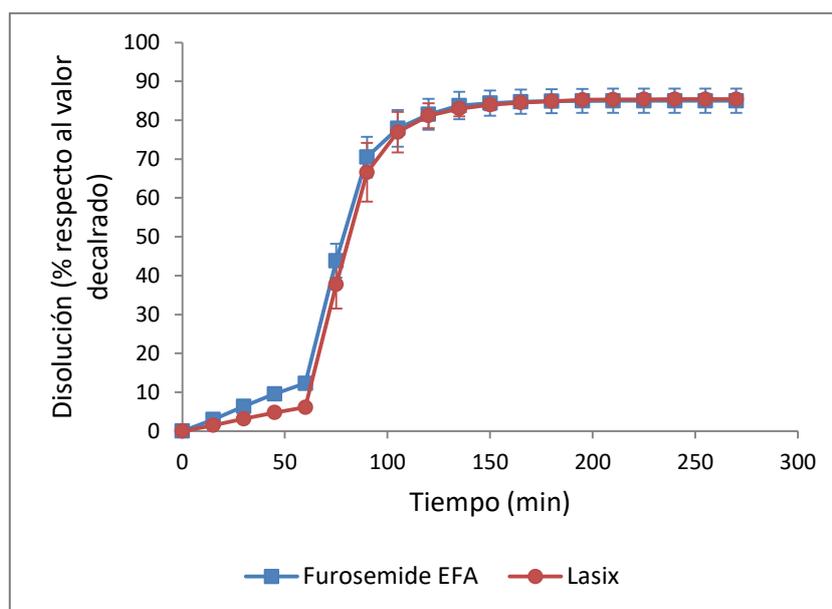


Figura 2.3. Perfiles de disolución obtenidos en aparato IV-USP pH variable en medios biorrelevantes, desde FaSSGF hacia FaSSIF-V2, para las formulaciones Lasix y Furosemide EFA, simulando hombres en condiciones de ayuno.

El mismo ensayo, pero simulando el pasaje del medicamento a través del TGI bajo condiciones de ayuno en mujeres, fue realizado para la formulación Lasix. Tres unidades del medicamento fueron ensayadas. Las condiciones del ensayo fueron: medio FaSSGF de pH 2.5 en lugar de 1.6, durante 90 minutos a un flujo de 6 mL/min, con cambio secuencial FaSSIF – V2 pH 6.5, el cual es igual para ambas simulaciones (hombre y mujer), a un flujo de 4 mL/min durante 180 minutos.

Los variaciones realizadas para simular las condiciones en mujeres, se establecieron basado en la bibliografía existente que indica que en condiciones de ayuno: 1) el vaciado gástrico en mujeres es más lento que en hombres, razón por la cual el tiempo de permanencia en FaSSGF pasó de 60 a 90 minutos; y 2) El fluido gástrico en hombres es más ácido que en mujeres, entonces se cambió el pH de FaSSGF de 1.6 a 2.5 ^[23, 24, 25].

En el gráfico de la figura 2.4 se muestra la comparación de perfiles obtenidos para la formulación Lasix, obtenidos tras la simulación del proceso de disolución en el TGI cuando se administran por vía oral en hombres y mujeres.

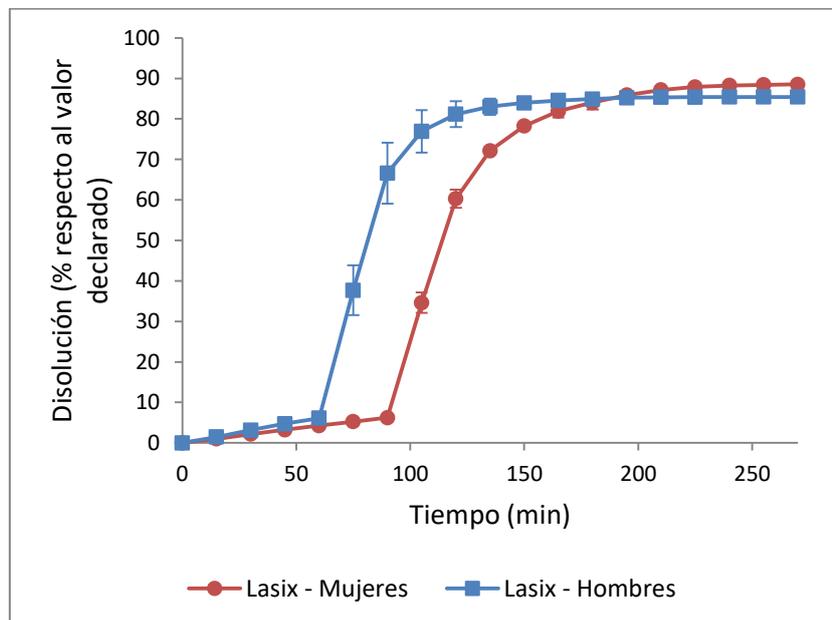


Figura 2.4. Perfiles de disolución obtenidos en aparato IV-USP pH variable en medios biorrelevantes, desde FaSSGF hacia FaSSIF-V2, para la formulación Lasix simulando su pasaje a través del TGI en hombres y mujeres bajo condiciones de ayuno.

Todos los ensayos realizados en el Aparato IV USP se llevaron a cabo en la Universidad de Bath – UK.

2.5 Ensayo de disolución en Aparato II USP – Disoluciones a pH variable

Posteriormente, se procedió a ensayar la disolución de ambas formulaciones Furosemide EFA y Lasix a pH variable en el Aparato II USP a 75 rpm, variando el pH del medio de disolución, intentando simular nuevamente el pasaje de las mismas a través del TGI, diferenciando por sexo en condiciones de ayuno. En este caso, en lugar de utilizar medios biorrelevantes, se utilizaron soluciones buffer que según su pH representarían el contenido estomacal y de las primeras porciones del intestino delgado. Se obtuvieron muestras cada 15 minutos a lo largo de todo el experimento.

Los aparatos e instrumentos utilizados para llevar a cabo el experimento fueron los mismos que los mencionados en el apartado 2.2.

Hombres

La disolución inicia en 500 mL de medio “A”, compuesto por ácido clorhídrico y cloruro de potasio, de pH 1.20 durante 30 minutos. Luego de cumplido el tiempo se agregan 200 mL de una solución “B” compuesta por acetato de sodio, ácido acético e hidróxido de sodio, obteniéndose un medio de disolución de pH 4.50. El ensayo prosigue durante

15 minutos más. Al cabo de este tiempo, se agregan 200 mL de una solución "C" compuesta por acetato de sodio e hidróxido de sodio, generándose un medio de pH 5.50. El ensayo continúa hasta completar 90 minutos.

La cuantificación de Furosemide se realizó mediante absorción en el espectro UV a 277 nm. Los resultados obtenidos pueden verse en la figura 2.5.

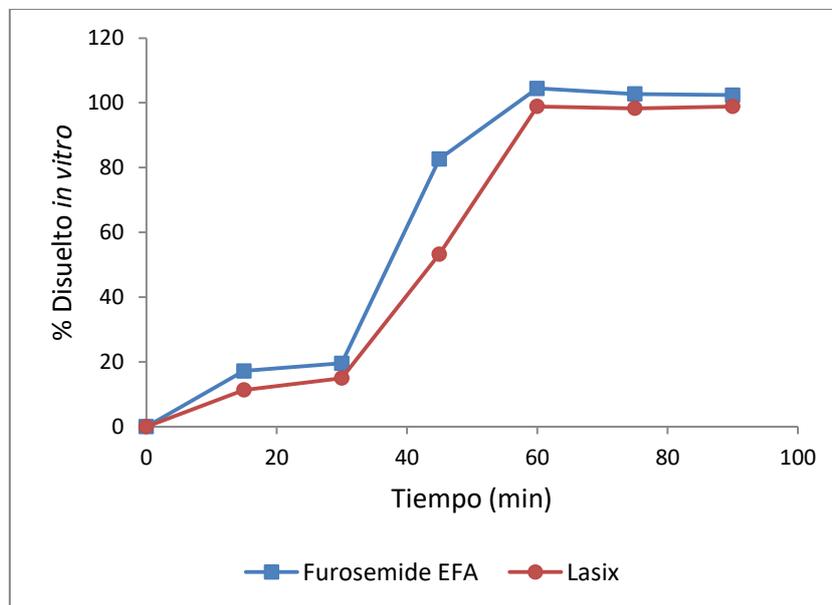


Figura 2.5. Perfiles de disolución obtenidos en aparato II-USP para ambas formulaciones a pH variable simulando el contenido gastrointestinal en hombres en condiciones de ayuno.

Mujeres

La disolución inicia en 500 mL de medio "A", compuesto por ácido clorhídrico y cloruro de potasio de pH 2.50, durante 30 minutos. Luego de cumplido el tiempo se agregan 200 mL de una solución "B" compuesta por acetato de sodio, ácido acético e hidróxido de sodio, obteniéndose un medio de disolución de pH 5.00. El ensayo prosigue durante 15 minutos más. Al cabo de este tiempo, se agregan 200 mL de una solución "C" compuesta por Acetato de sodio e Hidróxido de sodio, generándose un medio de pH 6.00. El ensayo continúa hasta completar 90 minutos.

La cuantificación de Furosemide se realizó mediante absorción en el espectro UV a 277 nm. Los resultados se muestran en la figura 2.6.

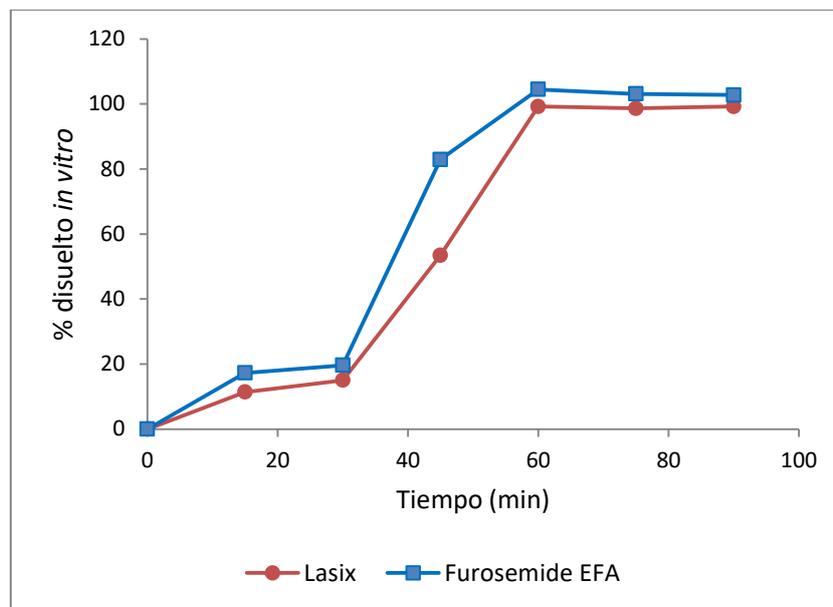


Figura 2.6. Perfiles de disolución obtenidos en aparato II-USP para ambas formulaciones a pH variable simulando el contenido gastrointestinal en mujeres en condiciones de ayuno.

Los datos obtenidos en estos ensayos de disolución *in vitro*, se intentaran correlacionar posteriormente con los resultados obtenidos en los estudios *in vivo*, lo cual se presentará en el capítulo 4 de este trabajo de tesis.

Capítulo 3. Bioequivalencia de dos formulaciones de administración oral conteniendo Furosemide en condiciones de ayuno.

3.1 Metodología

3.1.1 Fase clínica

Se realizó un estudio *in vivo*, administrando a voluntarios sanos, de ambos sexos, furosemide en dosis únicas de 40 mg para Referencia (Lasix®), y 40 mg para Test (Furosemide EFA), en forma aleatoria, cruzada y compensada. Cada voluntario recibió 2 dosis (una de cada producto) en la mañana (08:00), separadas al menos por 7 días. En el estudio participaron doce individuos, cuatro hombres y 8 mujeres. El fármaco inalterado fue monitoreado en orina durante 12 horas post-dosis.

La administración de la dosis fue realizada en la mañana, luego de 8 horas de ayuno. El ayuno fue mantenido hasta 5 horas de administrados los medicamentos. Al cabo de dicho ayuno, se les administró un almuerzo, una merienda (8 h- post-dosis), y una cena (12 h-post – dosis). Todas las comidas fueron estandarizadas, así como las ingestas de líquidos.

A los efectos de ocasionar el menor inconveniente a los voluntarios y proporcionarles el mayor confort, el monitoreo de la droga fue realizado midiendo la concentración en orina, la cual se obtuvo por micción espontánea a tiempos estandarizados, evitándose así el muestreo sanguíneo. Esto fue posible dada la acción diurética de la droga y su elevada tasa de excreción renal, lo cual permitió obtener un volumen suficiente con concentraciones cuantificables. Asimismo, la buena correlación reportada entre los datos urinarios y plasmáticos avaló conducir la investigación de este modo.

Después de cada muestra urinaria, desde los 40 min hasta las 3 hs post dosis, los voluntarios recibieron 67 mL de una solución de rehidratación para reposición de electrolitos (REHIDROMS®). Luego de las 3 hs post dosis, los voluntarios recibieron 100 mL de la solución de rehidratación antedicha tras cada micción. La composición de la misma se ajustó a los siguientes valores: sodio 15 mmol/L, potasio 4 mmol/L, cloruro 13 mmol/L, glucosa 15 mmol/L, citrato 2 mmol/L.

Los tiempos de muestreo fueron: 0 (predosis) – 20 – 40 – 60 – 80 – 100 – 120 – 140 – 160 – 180 – 240 – 300 – 360 – 420 – 480 – 600 – 720 min– post-dosis, registrándose los volúmenes de las muestras de orina. Dos alícuotas de lo orinado (muestra y contramuestra) se guardaron en el freezer (-25°C) hasta el momento del análisis y otra alícuota se almacenó en heladera (menor a 8°C) para análisis de electrolitos en orina.

3.1.2. Fase analítica

La determinación de concentraciones urinarias de furosemide se realizó mediante técnica HPLC, fase reversa, detección UV, validada en el laboratorio del CEBIOBE. El procedimiento analítico desarrollado para este estudio es una adaptación de la metodología analítica descrita previamente para su aplicación en estudios farmacocinéticos ^[26]. El equipo utilizado fue Dionex[®] Ultimate 3000 System, acoplado a detector UV. La columna utilizada fue Phenomenex[®] Luna C18, 150 x 4.6 mm, 5 µm.

El furosemide se extrajo de la orina mediante un procedimiento líquido-líquido que se describe a continuación. A un volumen dado de muestra de orina se le añade un volumen exactamente conocido de estándar interno, en este caso, fenitoína. A la mezcla se agrega ácido fosfórico para revertir la eventual ionización de los compuestos de interés (furosemide y fenitoína). Estos se extraen de la orina con una mezcla de solventes orgánicos. Posteriormente se evapora la solución a sequedad y se retoma el residuo seco con fase móvil acetonitrilo-*buffer* fosfato pH 3.5 (35:65), solución que se inyecta en el sistema de HPLC. Se anexa el protocolo de procesamiento para la dosificación de furosemide en orina (PA 0037/01 del CEBIOBE).

La determinación de electrolitos (sodio, potasio y cloruro), fue realizada a través del sistema Cobas C311 (Cobas[®] 4000 analyzer series, Roche / Hitachi), en el Laboratorio de Emergencias del Hospital de Clínicas Dr. Manuel Quintela. En este caso, la muestra de orina se coloca directamente en el aparato, sin procesamiento previo.

Para este análisis, un electrodo selectivo de iones (*Ion Selective Electrode* [ISE]) utiliza las propiedades especiales de ciertas membranas para crear un potencial eléctrico (fuerza electromotriz [FEM]) que permite medir los iones en solución. El electrodo cuenta con una membrana selectiva que está en contacto con la solución analizada y con una solución interna. La solución interna contiene el ion analizado en una concentración fija. Dicho ion se fija estrechamente a ambos lados de la membrana. La FEM de la membrana se determina como la diferencia entre la concentración del ion de test en la solución analizada y en la solución interna. La FEM se desarrolla según la ecuación de Nernst para un ión específico en solución:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln\left(\frac{f \cdot C_a}{f \cdot C_i}\right)$$

E= FEM del electrodo, E₀= FEM estándar, R= constante de los gases, T= temperatura absoluta, n=carga del ion, F= constante de Faraday, f= coeficiente de actividad, C_a= concentración del ion en la solución analizada, C_i = concentración del ion en la solución interna. Ya que los iones sodio, potasio y cloruro solo tienen una carga, R, T, n y F se combinan en un valor único que representa la pendiente (S). Los coeficientes de actividad son esencialmente constantes, al igual que la C_i. Estas constantes se combinan con el término E₀, el cual es específico para el tipo de electrodo de referencia utilizado. De este modo, la ecuación anterior puede describirse como:

$$E = E'_0 + S \cdot \ln(C_a)$$

Los electrodos para el sodio y el potasio se basan en portadores neutros, mientras que el electrodo de cloruro se basa en un intercambiador de iones.

Las concentraciones obtenidas se transformaron a cantidades, de modo que la cantidad excretada en el intervalo de tiempo transcurrido entre dos micciones consecutivas se expresa en términos de velocidad de excreción urinaria de la droga, la cual corresponde con el tiempo transcurrido hasta la mitad de dicho intervalo. Se graficó velocidad de excreción urinaria (dU/dt) en función del tiempo (t). El área bajo la curva de éste gráfico corresponde al valor de la cantidad acumulada excretada desde tiempo cero hasta infinito en función del tiempo ($U[\infty]$). Esta área presenta directa relación con la dosis absorbida de fármaco, por lo que fue utilizada para medir la biodisponibilidad en cantidad.

La velocidad de excreción urinaria (dU/dt) tiene un perfil directamente proporcional al que registraría las concentraciones plasmáticas del fármaco. Pueden así establecerse paralelismos entre ambos fluidos, y lo que habitualmente se determina como concentración plasmática máxima (C_{max}), este procedimiento lo subroga por $(dU/dt)_{max}$, al igual que el tiempo de máxima concentración por el tiempo de máxima velocidad de excreción (T_{max}).

3.1.3. Fase de Análisis estadístico

Se analizó la distribución estadística de los parámetros farmacocinéticos $(dU/dt)_{max}$ y $U[\infty]$. Dado que la distribución resultó ser normal, se realizó posteriormente un análisis de la varianza (ANOVA). El mismo tomó en cuenta como fuentes de variación a los sujetos, los 2 períodos en que se ensayen cada tratamiento, y los 2 tratamientos propiamente. Aplicando ANOVA sobre dichos parámetros transformados logarítmicamente, se determinaron luego los intervalos de confianza 90% (IC90 %) del cociente de medias geométricas Test/Referencia (Furosemide EFA / Lasix). La varianza residual del ANOVA se utilizó para el cálculo de dicho intervalo de confianza.

Para evaluar T_{max} se aplicó un test no paramétrico llamado T-Wilcoxon. El mismo es similar al test t-Student para series apareadas cuando la distribución es no normal.

Independientemente del análisis estadístico utilizado para concluir sobre la bioequivalencia entre Test y Referencia, se estimaron las medias, desviaciones estándares y coeficientes de variación, para cada parámetro y forma farmacéutica ensayada. La bioequivalencia (equivalencia biofarmacéutica) entre formulaciones se concluye cuando los IC90% para el cociente Test/Referencia de medias geométricas de los parámetros farmacocinéticos $(dU/dt)_{max}$ y $U[\infty]$, se encuentren comprendidos entre 0,80 y 1,25.

3.2. Resultados

Las tablas 3.2.1 y 3.2.2 y los gráficos de las figuras 3.2.1 y 3.2.2 muestran los resultados medios obtenidos para los 12 voluntarios que participaron del estudio

Parámetros	Lasix										
	Furosemide dE/dt (ug/min)		Cloruro dE/dt (mmol/h)		Orina dE/dt (5xmL/min)		Sodio dE/dt (mmol/h)		Potasio dE/dt (mmol/h)		
	t (h)	media	SE	media	SE	media	SE	media	SE	media	SE
0.00	0.00	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.17	0.78	0.29	11.35	2.27	7.56	1.75	9.60	2.16	4.07	0.67	
0.50	29.47	11.63	52.74	12.65	38.77	8.52	48.59	12.39	7.03	1.11	
0.83	63.56	11.86	110.11	14.94	82.08	7.31	104.48	14.10	10.65	1.22	
1.17	71.42	15.84	95.39	15.24	71.00	8.66	89.64	14.27	11.14	1.05	
1.50	55.97	10.86	81.95	9.81	59.27	6.53	74.14	8.85	11.10	0.91	
1.83	48.84	5.73	65.23	8.37	45.54	6.90	57.95	8.07	9.45	0.79	
2.17	41.31	4.74	50.93	7.88	34.06	5.53	44.28	7.59	8.28	0.84	
2.50	31.12	3.34	36.38	7.12	25.40	4.83	30.84	6.82	7.29	0.68	
2.83	22.90	3.20	28.65	5.64	22.10	4.00	24.13	5.49	6.61	0.57	
3.50	15.65	2.38	17.57	3.57	15.29	2.52	14.60	3.41	5.16	0.50	
4.50	12.55	1.07	8.98	1.52	7.95	1.27	7.73	1.40	3.54	0.42	
5.50	9.52	1.34	4.50	0.97	3.57	0.51	4.10	0.91	2.33	0.20	
6.50	7.50	1.16	4.02	0.80	10.13	2.25	4.88	0.85	2.49	0.87	
7.50	5.49	1.12	3.22	0.61	5.33	0.80	4.93	0.88	1.53	0.12	
9.00	5.34	2.55	2.26	0.36	4.97	0.98	4.40	0.71	1.50	0.12	
11.00	3.05	1.24	2.29	0.45	4.67	1.00	4.36	0.76	1.50	0.17	
To (h)	0.25	0.06	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tmax (h)	1.17	0.12	1.03	0.10	1.00	0.10	1.00	0.10	1.14	0.10	
dU/dt max	87.26	13.07	129.90	9.17	93.75	5.81	123.11	8.66	13.34	0.87	
U [12 h]	11356.20*	1365.44	224.68**	20.11	2281.92***	144.13	214.65	18.85	46.15	2.56	

Tabla 3.2.1. Resultados medios de velocidades de excreción obtenidos para la formulación **Lasix**.

* ug; ** mmol; *** mL.

Parámetros	Furosemide EFA										
	Furosemide dE/dt (ug/min)		Cloruro dE/dt (mmol/h)		Orina dE/dt (5x/mL/min)		Sodio dE/dt (mmol/h)		Potasio dE/dt (mmol/h)		
	t (h)	media	SE	media	SE	media	SE	media	SE	media	SE
0.00	0.00	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.17	1.56	0.70	9.16	2.41	5.63	1.38	7.13	2.31	3.08	0.43	
0.50	27.56	6.54	55.17	13.46	37.90	9.09	51.56	13.47	6.85	0.94	
0.83	56.96	10.88	91.28	13.79	66.67	9.30	85.82	13.91	9.74	0.97	
1.17	72.41	13.07	101.40	8.16	73.42	5.73	94.58	8.34	11.42	0.68	
1.50	60.55	9.28	86.81	6.85	63.50	5.07	79.85	6.90	10.95	0.60	
1.83	49.38	7.63	61.20	6.07	43.60	4.93	54.21	5.84	9.21	0.70	
2.17	38.93	5.12	45.69	5.42	32.04	3.94	39.17	4.90	8.00	0.77	
2.50	31.13	2.84	34.83	6.01	25.33	3.89	29.20	5.33	7.04	0.70	
2.83	29.14	3.54	27.76	5.94	22.73	3.93	22.86	5.30	6.56	0.71	
3.50	22.11	3.28	19.08	4.21	16.01	2.60	16.56	3.91	5.30	0.62	
4.50	14.33	1.91	9.20	2.24	8.57	1.61	7.54	1.98	3.52	0.32	
5.50	9.31	1.47	3.62	0.85	3.25	0.41	2.92	0.67	2.26	0.25	
6.50	7.78	1.10	2.85	0.55	7.94	1.82	3.50	0.59	1.68	0.22	
7.50	4.60	0.68	2.27	0.39	6.05	1.68	3.71	0.76	1.50	0.20	
9.00	5.32	2.41	2.14	0.38	3.47	0.15	3.92	0.66	1.42	0.15	
11.00	3.14	1.03	2.16	0.45	3.94	0.57	3.82	0.65	1.61	0.16	
To (h)	0.31	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tmax (h)	1.36	0.16	1.22	0.16	1.17	0.11	1.22	0.16	1.33	0.15	
dU/dt max	92.89	12.04	117.74	7.87	80.92	5.90	110.84	8.63	12.61	0.59	
U [12 h]	11974.8*	1180.91	216.42**	15.33	2170.25***	141.10	204.33	15.06	44.60	1.94	

Tabla 3.2.2 Resultados medios de velocidades de excreción obtenidos para la formulación **Furosemide EFA**.

* ug; ** mmol; *** mL.

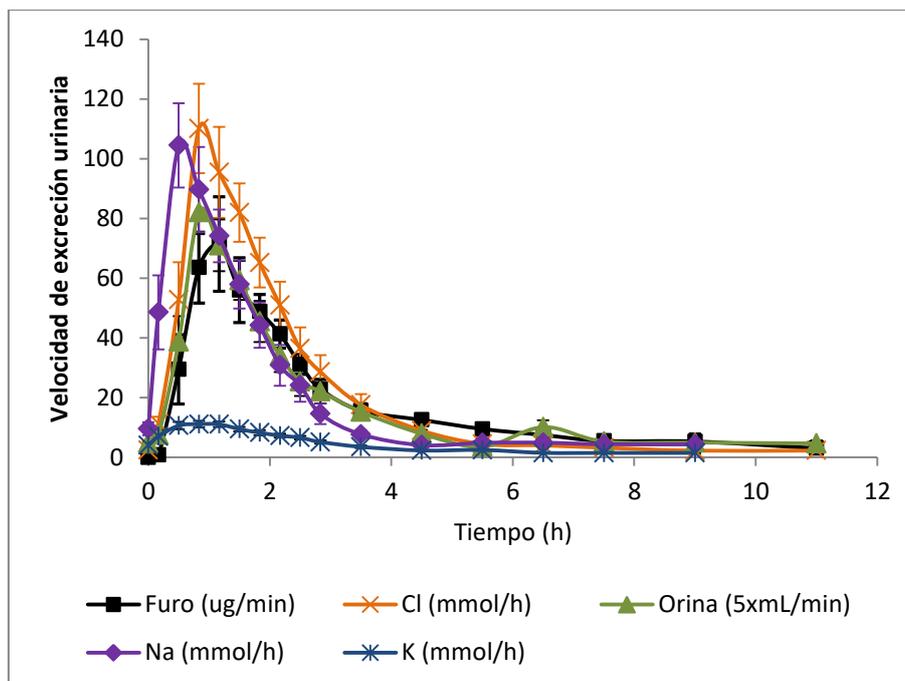


Figura 3.2.1. Perfiles medios de velocidades de excreción de: furosemide, cloruro, sodio, potasio y orina, obtenidas para la formulación **LASIX**.

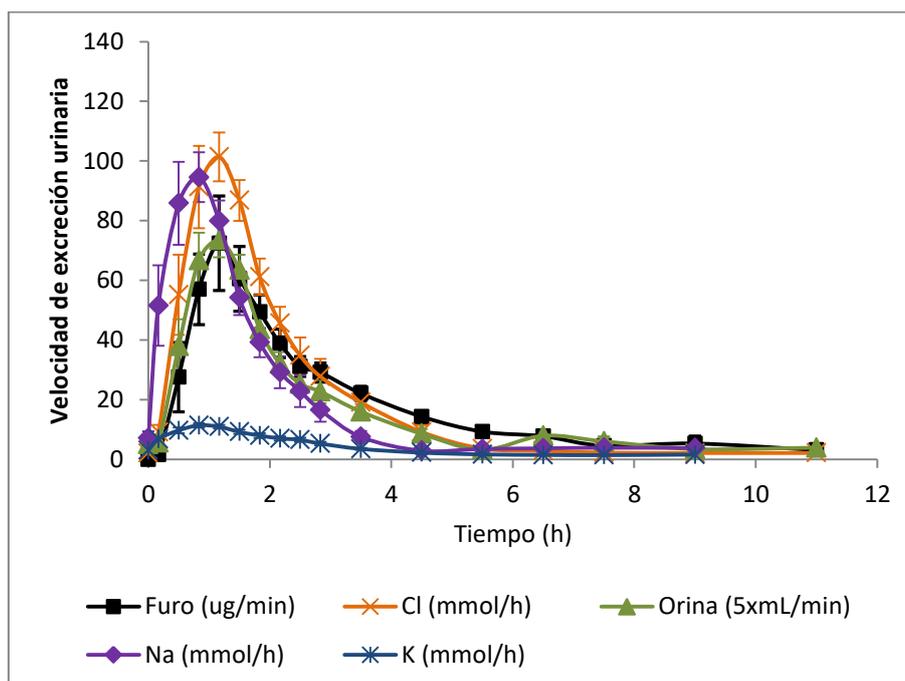


Figura 3.2.2. Perfiles medios de velocidades de excreción de: furosemide, cloruro, sodio, potasio y orina, obtenidas para la formulación **Furosemide EFA**.

Como se puede observar en los gráficos, el perfil de velocidad de excreción de cloruros es el que mayor relación guarda con el de velocidad de excreción de furosemide, junto con la orina. Esto es lógico, ya que el bloqueo de la reabsorción de cloruros es parte del mecanismo de acción del fármaco. Por lo tanto, para el análisis farmacodinámico, se utilizó solo el perfil de velocidad de excreción de cloruro en función del tiempo.

Los resultados medios considerando el sexo de los individuos se muestran en las tablas 3.2.3 a 3.2.6.

Parámetros	Lasix - Hombres										
	Furosemide dE/dt (ug/min)		Cloruro dE/dt (mmol/h)		Orina dE/dt (5xmL/min)		Sodio dE/dt (mmol/h)		Potasio dE/dt (mmol/h)		
	t (h)	media	SE	media	SE	media	SE	media	SE	media	SE
0.00	0.00	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.17	1.25	0.74	14.75	5.22	6.31	1.71	13.82	4.99	3.64	0.87	
0.50	59.77	31.34	92.76	26.43	57.25	22.87	86.28	27.02	9.64	2.20	
0.83	104.03	12.86	144.07	20.44	94.06	11.39	134.48	17.23	12.66	1.52	
1.17	123.87	24.93	138.12	23.27	92.19	11.88	129.08	20.01	13.26	1.80	
1.50	95.38	19.28	104.36	15.90	68.31	7.28	95.01	13.95	11.77	1.39	
1.83	64.13	5.11	68.20	11.48	44.69	7.13	60.13	12.33	9.34	0.72	
2.17	50.19	3.04	51.00	8.86	33.06	5.97	43.55	8.98	8.40	0.83	
2.50	38.80	2.40	33.98	7.26	22.81	4.51	27.88	7.06	6.82	0.71	
2.83	26.67	8.50	28.16	7.75	17.88	4.66	22.85	7.42	6.12	0.87	
3.50	16.56	4.69	18.68	4.95	14.83	4.17	15.35	4.82	5.56	0.86	
4.50	14.88	0.69	11.91	2.96	11.02	2.87	10.39	2.62	4.65	0.58	
5.50	9.10	0.37	3.82	0.77	3.54	0.62	3.59	1.04	2.72	0.37	
6.50	5.37	1.77	4.70	1.91	6.90	2.21	5.80	1.89	1.83	0.31	
7.50	3.82	0.97	3.50	1.33	3.67	0.35	5.12	1.45	1.80	0.31	
9.00	10.03	7.73	2.70	0.50	5.58	1.46	4.66	0.35	1.62	0.28	
11.00	5.49	3.67	2.37	0.33	3.02	0.17	4.14	0.23	1.63	0.19	
To (h)	0.17	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tmax (h)	0.92	0.16	0.92	0.16	0.92	0.16	0.92	0.16	1.08	0.21	
dU/dt max	132.62	24.16	157.37	17.97	105.13	11.52	148.73	14.92	14.03	1.93	
U [12 h]	16128.0*	2267.76	277.75**	34.76	2432.25***	119.77	262.25	30.03	50.26	2.84	

Tabla 3.2.3 Resultados medios de velocidades de excreción obtenidos para la formulación **Lasix** en Hombres.

* ug; ** mmol; *** mL.

Parámetros	Lasix - Mujeres										
	Furosemide dE/dt (ug/min)		Cloruro dE/dt (mmol/h)		Orina dE/dt (5xmL/min)		Sodio dE/dt (mmol/h)		Potasio dE/dt (mmol/h)		
	t (h)	media	SE	media	SE	media	SE	media	SE	media	SE
0.00	0.00	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.17	0.55	0.24	9.41	2.12	8.19	2.53	7.19	1.77	4.31	0.96	
0.50	14.32	3.19	32.73	7.49	29.53	4.74	29.74	7.29	5.73	1.07	
0.83	43.33	10.98	93.14	17.70	76.09	9.10	89.48	17.56	9.65	1.60	
1.17	45.19	12.79	74.03	15.36	60.41	9.93	69.92	15.08	10.09	1.19	
1.50	36.27	5.65	70.75	10.90	54.75	8.96	63.70	9.80	10.76	1.21	
1.83	41.19	6.83	63.74	11.66	45.97	10.06	56.86	10.96	9.50	1.17	
2.17	36.86	6.52	50.89	11.38	34.56	8.01	44.64	10.89	8.22	1.24	
2.50	27.27	4.33	37.58	10.38	26.69	7.06	32.32	9.90	7.52	0.98	
2.83	21.02	2.68	28.89	7.88	24.22	5.58	24.76	7.69	6.85	0.76	
3.50	15.19	2.92	17.02	4.97	15.52	3.34	14.22	4.73	4.96	0.64	
4.50	11.38	1.41	7.51	1.62	6.42	1.01	6.39	1.54	2.98	0.46	
5.50	9.73	2.04	4.84	1.43	3.58	0.74	4.36	1.29	2.13	0.23	
6.50	8.57	1.42	3.68	0.82	11.75	3.13	4.42	0.92	2.82	1.31	
7.50	6.32	1.57	3.08	0.70	6.17	1.09	4.83	1.17	1.39	0.09	
9.00	2.99	0.32	2.04	0.48	4.66	1.34	4.26	1.08	1.45	0.13	
11.00	1.83	0.33	2.25	0.67	5.50	1.44	4.47	1.17	1.44	0.25	
To (h)											
Tmax (h)	0.29	0.09	-	-	-	-	-	-	-	-	
dU/dt max	1.29	0.15	1.08	0.14	1.04	0.14	1.04	0.14	1.17	0.13	
U [12 h]	64.58*	7.56	116.16**	6.95	88.06***	6.10	110.30	7.67	12.99	0.96	

Tabla 3.2.4 Resultados medios de velocidades de excreción obtenidos para la formulación **Lasix** en Mujeres.

* ug; ** mmol; *** mL.

Parámetros	Furosemide EFA - Hombres										
	Furosemide dE/dt (ug/min)		Cloruro dE/dt (mmol/h)		Orina dE/dt (5xmL/min)		Sodio dE/dt (mmol/h)		Potasio dE/dt (mmol/h)		
	t (h)	media	SE	media	SE	media	SE	media	SE	media	SE
0.00	0.00	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.17	0.10	0.08	4.32	1.67	2.88	1.04	2.46	0.88	2.93	1.24	
0.50	27.56	15.22	29.75	14.97	16.19	7.43	27.29	14.18	5.10	1.54	
0.83	70.41	25.36	79.97	25.98	55.88	20.46	75.33	26.40	7.82	1.59	
1.17	100.16	33.59	104.86	18.48	72.81	15.32	99.19	18.85	10.50	1.49	
1.50	87.27	16.82	102.05	13.50	70.31	12.60	95.39	14.03	11.37	1.64	
1.83	75.56	13.68	77.44	7.15	52.44	7.40	69.85	7.45	10.42	1.19	
2.17	54.12	8.83	53.61	6.74	35.75	4.30	47.21	6.89	8.39	0.82	
2.50	35.85	6.59	32.34	2.54	22.69	1.04	27.23	3.21	6.57	0.49	
2.83	34.34	3.66	26.48	1.28	21.94	4.39	21.64	1.59	6.61	0.84	
3.50	29.19	3.08	19.43	3.38	16.81	2.79	18.74	5.08	5.71	0.85	
4.50	17.72	2.21	10.61	4.55	10.52	3.86	8.82	4.30	3.73	0.27	
5.50	12.34	2.03	5.01	1.91	3.88	0.77	3.78	1.53	2.94	0.41	
6.50	8.82	1.27	3.84	1.20	3.85	0.53	4.62	1.51	1.97	0.35	
7.50	5.34	0.56	2.96	0.99	3.15	0.56	4.16	1.48	2.03	0.37	
9.00	10.44	7.01	2.90	0.80	3.46	0.22	4.75	1.45	1.77	0.28	
11.00	5.07	3.04	2.98	0.83	3.69	0.34	4.92	1.46	1.76	0.23	
To (h)	0.33	0.10	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tmax (h)	1.42	0.16	1.33	0.22	1.50	0.14	1.33	0.22	1.42	0.21	
dU/dt max	116.38	24.50	113.56	16.72	72.81	14.16	107.15	18.14	11.99	1.30	
U [12 h]	15973.0*	2182.16	223.50**	28.19	2056.00***	250.85	214.50	30.76	46.67	2.58	

Tabla 3.2.5 Resultados medios de velocidades de excreción obtenidos para la formulación **Furosmide EFA** en **Hombres**.

* ug; ** mmol; *** mL.

Parámetros	Furosemide EFA - Mujeres										
	Furosemide dE/dt (ug/min)		Cloruro dE/dt (mmol/h)		Orina dE/dt (5xmL/min)		Sodio dE/dt (mmol/h)		Potasio dE/dt (mmol/h)		
	t (h)	media	SE	media	SE	media	SE	media	SE	media	SE
0.00	0.00	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.17	2.28	0.96	10.97	3.22	7.00	1.86	9.47	3.17	3.15	0.34	
0.50	27.56	7.16	67.87	17.60	48.75	11.52	63.70	17.93	7.73	1.11	
0.83	50.24	11.05	96.93	17.03	72.06	10.08	91.06	17.17	10.70	1.13	
1.17	58.53	8.85	99.67	9.08	73.72	5.21	92.28	9.24	11.88	0.73	
1.50	47.19	8.12	79.19	6.82	60.09	4.65	72.08	6.64	10.74	0.51	
1.83	36.29	4.85	53.08	6.90	39.19	6.10	46.39	6.51	8.61	0.83	
2.17	31.34	4.51	41.72	7.26	30.19	5.58	35.15	6.28	7.80	1.12	
2.50	28.76	2.69	36.08	9.12	26.66	5.89	30.19	8.02	7.27	1.04	
2.83	26.55	4.88	28.41	9.09	23.13	5.67	23.47	8.10	6.54	1.02	
3.50	18.57	4.23	18.90	6.27	15.60	3.76	15.47	5.48	5.09	0.85	
4.50	12.64	2.52	8.50	2.67	7.59	1.58	6.90	2.25	3.42	0.47	
5.50	7.80	1.80	2.92	0.85	2.94	0.48	2.49	0.69	1.92	0.25	
6.50	7.26	1.55	2.36	0.56	9.99	2.44	2.95	0.46	1.54	0.28	
7.50	4.23	0.99	1.92	0.32	7.50	2.39	3.48	0.94	1.23	0.18	
9.00	2.76	0.57	1.77	0.37	3.47	0.20	3.50	0.71	1.25	0.15	
11.00	2.17	0.32	1.75	0.50	4.06	0.86	3.28	0.63	1.53	0.22	
To (h)	0.29	0.06	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tmax (h)	1.33	0.24	1.17	0.22	1.00	0.11	1.17	0.22	1.29	0.20	
dU/dt max	81.14	12.41	119.84	9.18	84.97	5.66	112.69	10.17	12.92	0.66	
U [12 h]	9975.8*	744.34	212.88**	19.45	2227.38***	179.01	199.25	17.90	43.56	2.65	

Tabla 3.2.6 Resultados medios de velocidades de excreción obtenidos para la formulación **Furosmide EFA en Mujeres.**

* ug; ** mmol; *** mL.

A continuación se presentan los gráficos que comparan la farmacocinética y farmacodinamia entre las dos formulaciones en estudio (figuras 3.2.3 y 3.2.4).

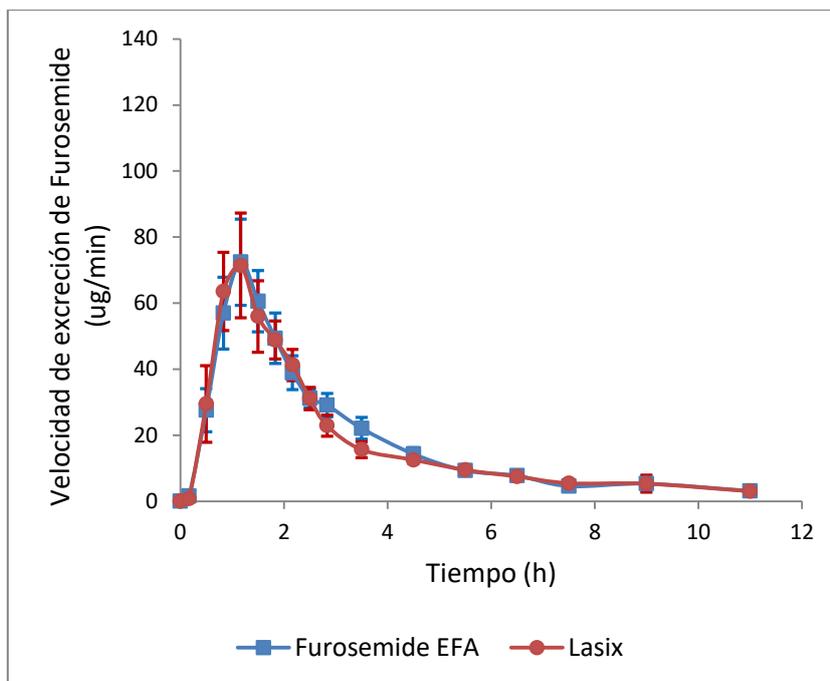


Figura 3.2.3. Perfil medio de velocidad de excreción de Furosemide en función del tiempo para Test y Referencia, tomando en cuenta la totalidad de individuos.

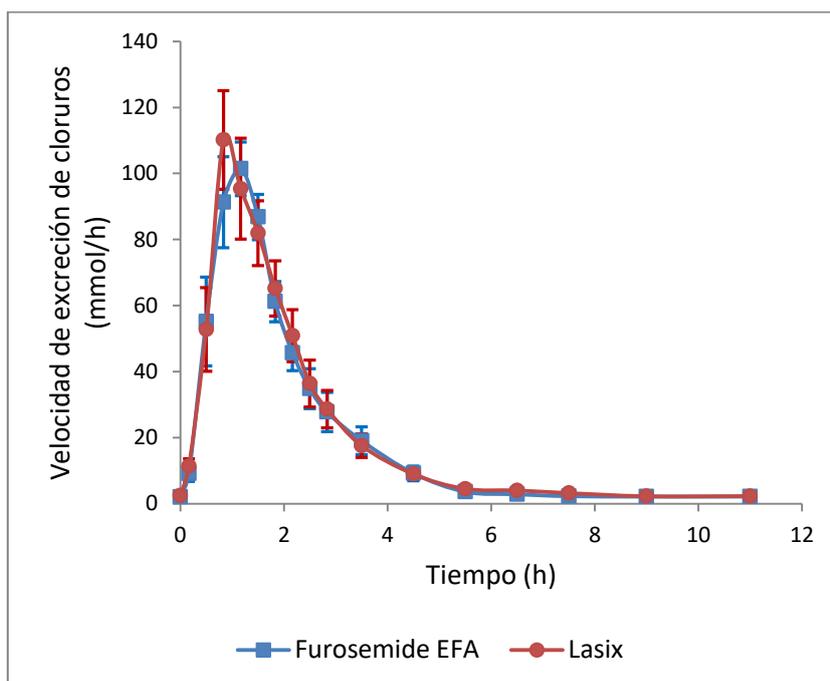


Figura 3.2.4. Perfil de velocidad de excreción de Cloruros en función del tiempo para Test y Referencia, tomando en cuenta la totalidad de individuos.

Se observa una clara similitud entre los perfiles PK y PD a lo largo del tiempo. A los efectos de correlacionarlos se grafica velocidad de excreción de cloruros en función de la velocidad de excreción de furosemide (figura 3.2.5)

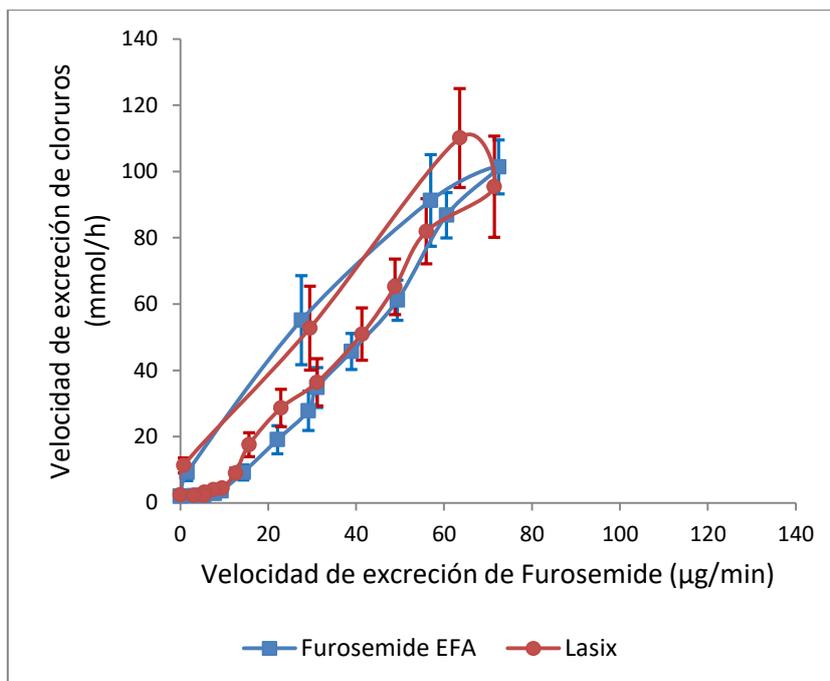


Figura 3.2.5 Perfil medio de velocidad de excreción de Cloruros en función de velocidad de excreción de Furosemide para Test y Referencia, tomando en cuenta la totalidad de individuos.

Posteriormente, se realizaron los mismos gráficos, separando los resultados obtenidos según el sexo de los voluntarios (figuras 3.2.6 a 3.2.11)

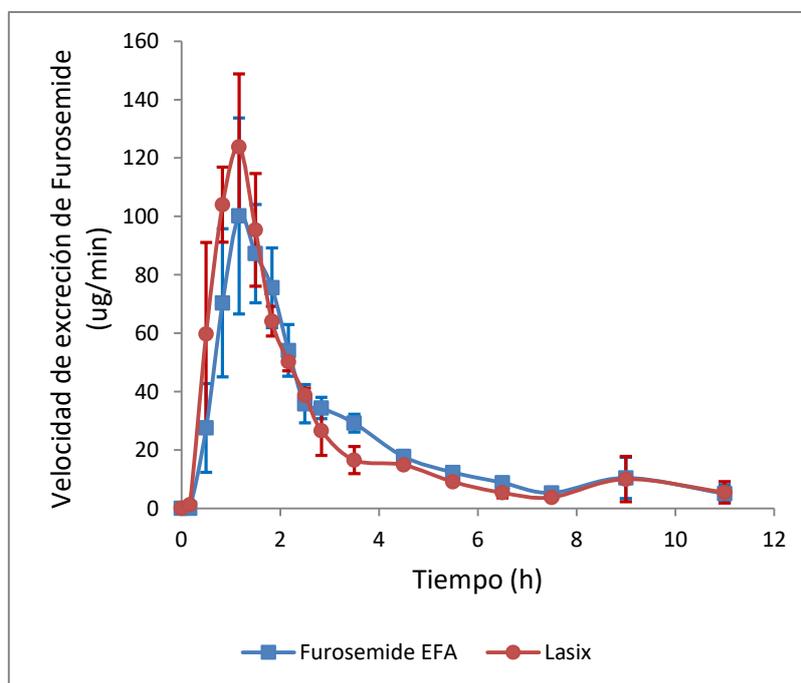


Figura 3.2.6 Perfil medio de velocidad de excreción de Furosemide en función del tiempo para Test y Referencia en **HOMBRES**

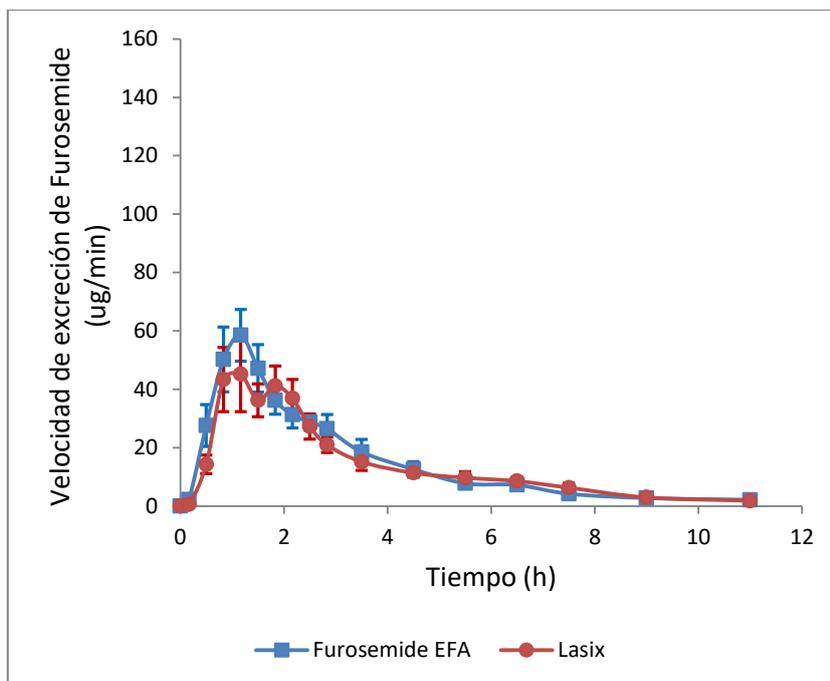


Figura 3.2.7. Perfil medio de velocidad de excreción de Furosemide en función del tiempo para Test y Referencia en **MUJERES**

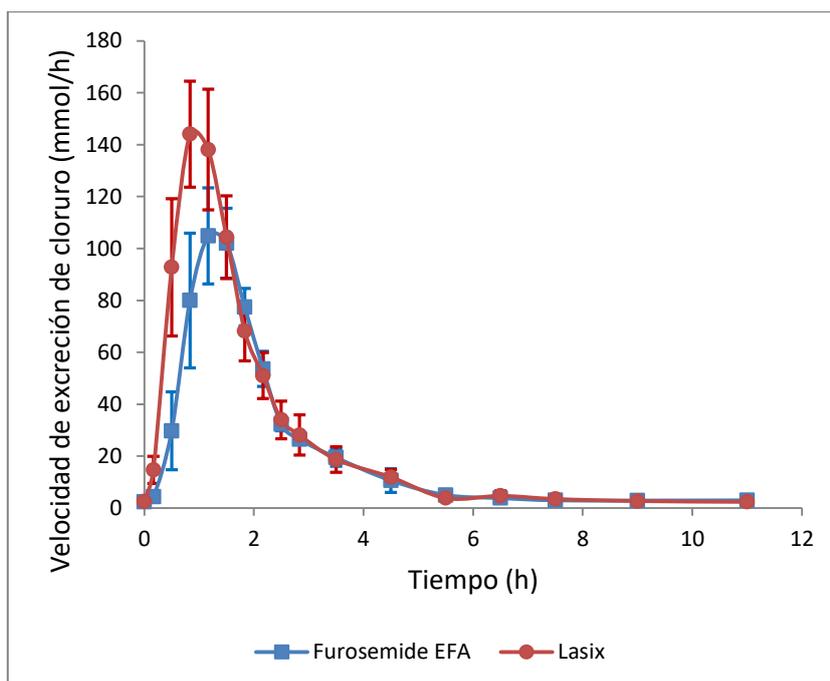


Figura 3.2.8 Perfil medio de velocidad de excreción de cloruro en función del tiempo para Test y Referencia en **HOMBRES**.

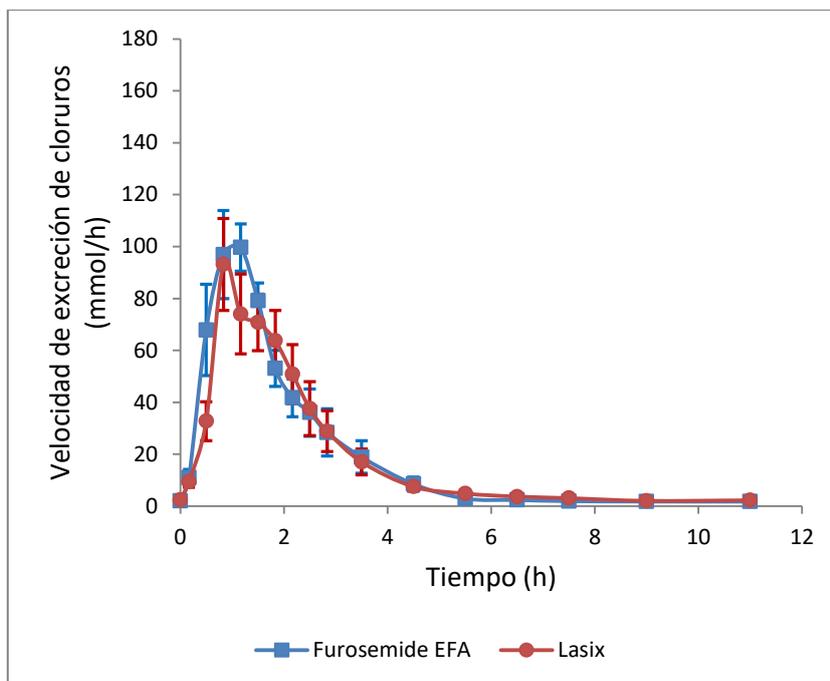


Figura 3.2.9. Perfil medio de velocidad de excreción de cloruro en función del tiempo para Test y Referencia en **MUJERES**

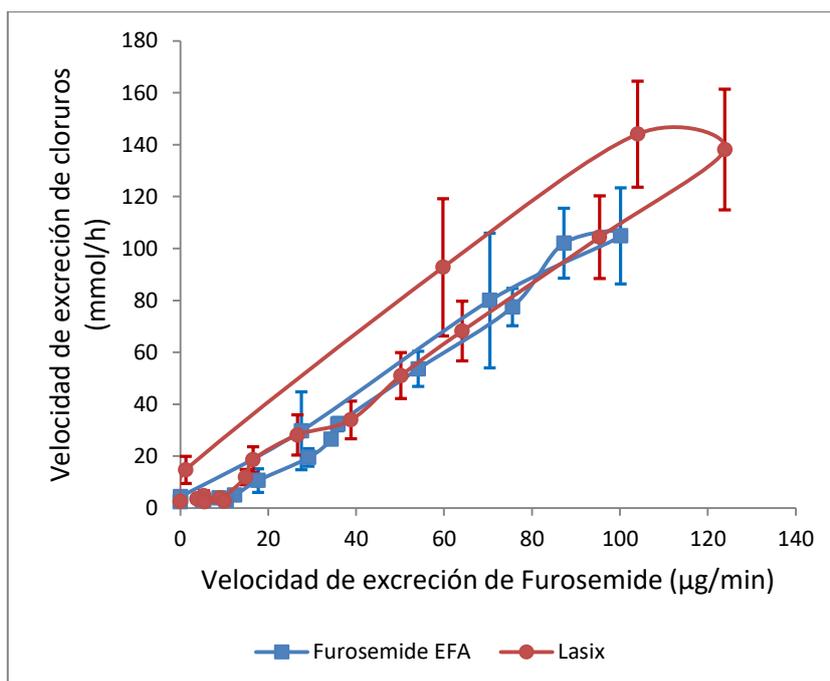


Figura 3.2.10. Perfil medio de velocidad de excreción de cloruro en función de velocidad de excreción de Furosemide para Test y Referencia en **HOMBRES**.

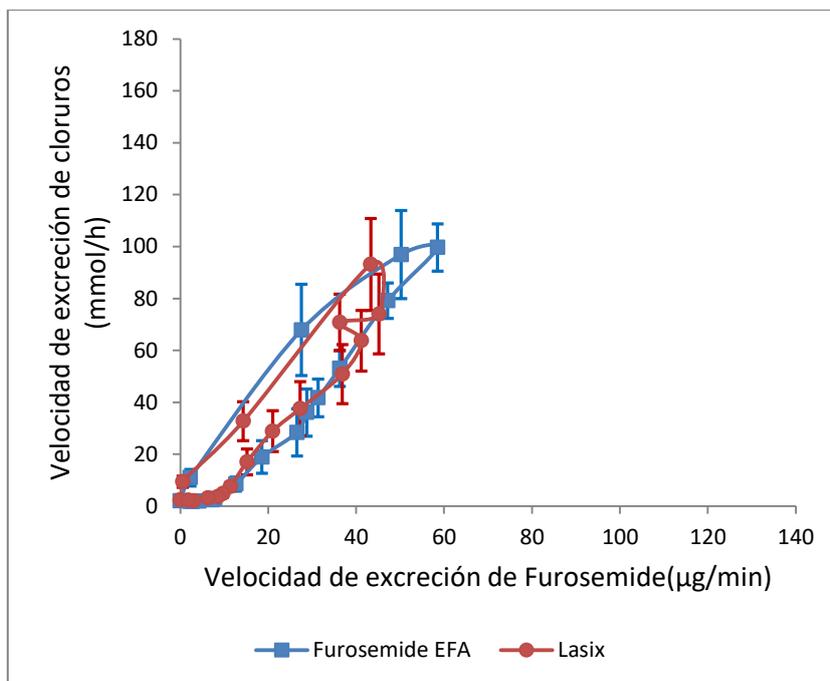


Figura 3.2.11 Perfil medio de velocidad de excreción de cloruro en función de velocidad de excreción de Furosemide para Test y Referencia en **MUJERES**

También se superpusieron los perfiles PK-vs-tiempo y PD-vs-tiempo para cada formulación y grupo de voluntarios (figuras 3.2.12 a 3.2.15).

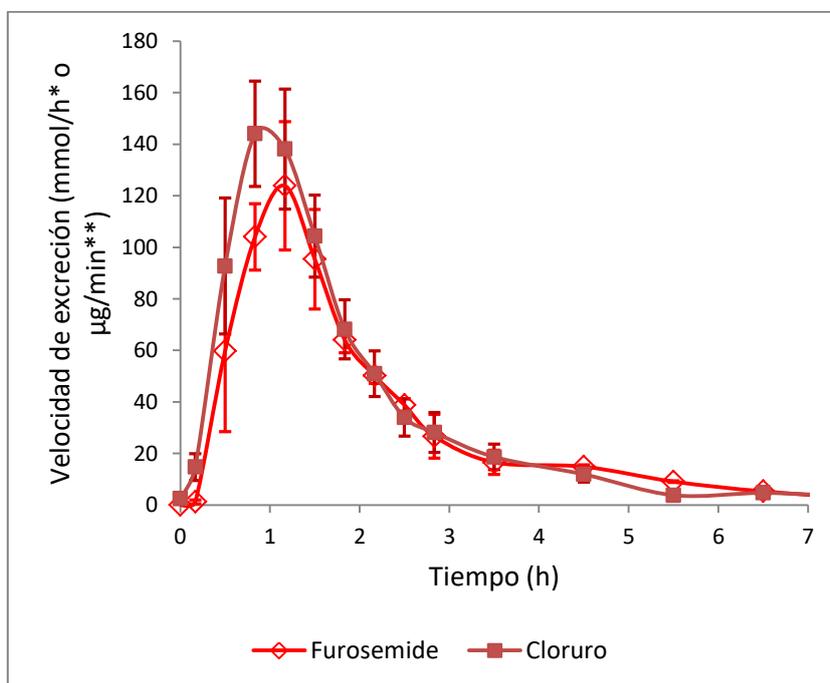


Figura 3.2.12 Perfil medio de velocidad de excreción de cloruro y furosemide en función del tiempo para **Lasix** en **Hombres**. *mmol/h para cloruros; **µg/min para furosemide.

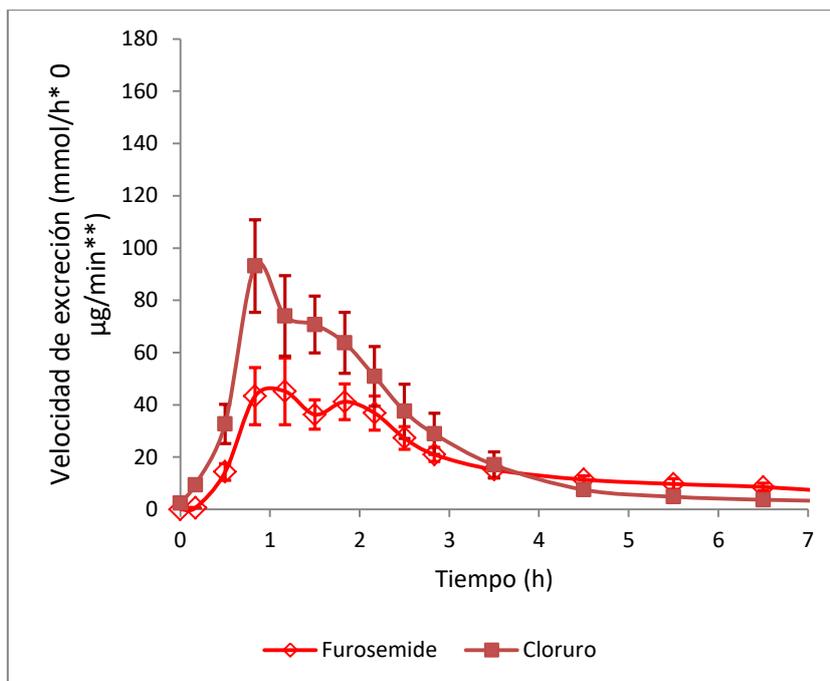


Figura 3.2.13 Perfil medio de velocidad de excreción de cloruro y furosemide en función del tiempo para **Lasix en Mujeres**. *mmol/h para cloruros; **µg/min para furosemide

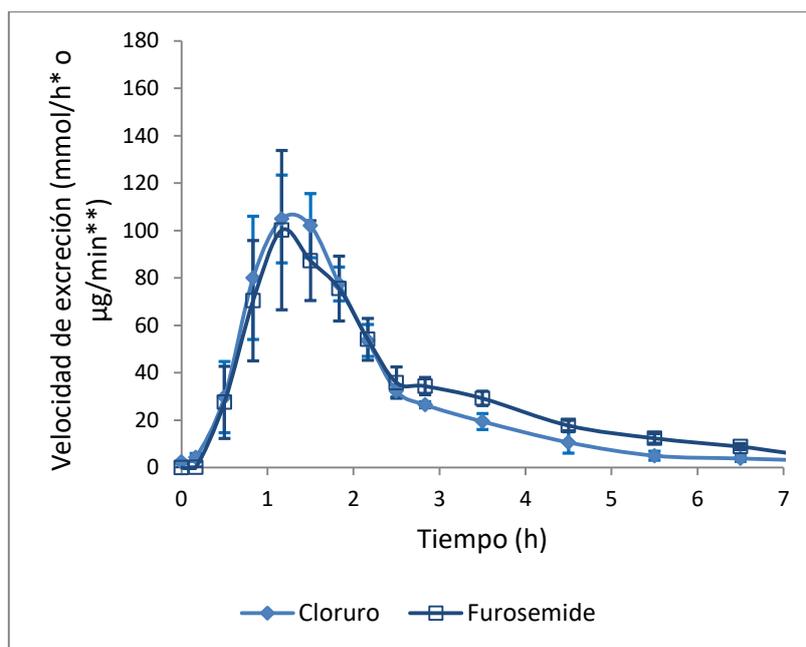


Figura 3.2.14 Perfil medio de velocidad de excreción de cloruro y furosemide en función del tiempo para **Furosemide EFA en Hombres**. *mmol/h para cloruros; **µg/min para furosemide.

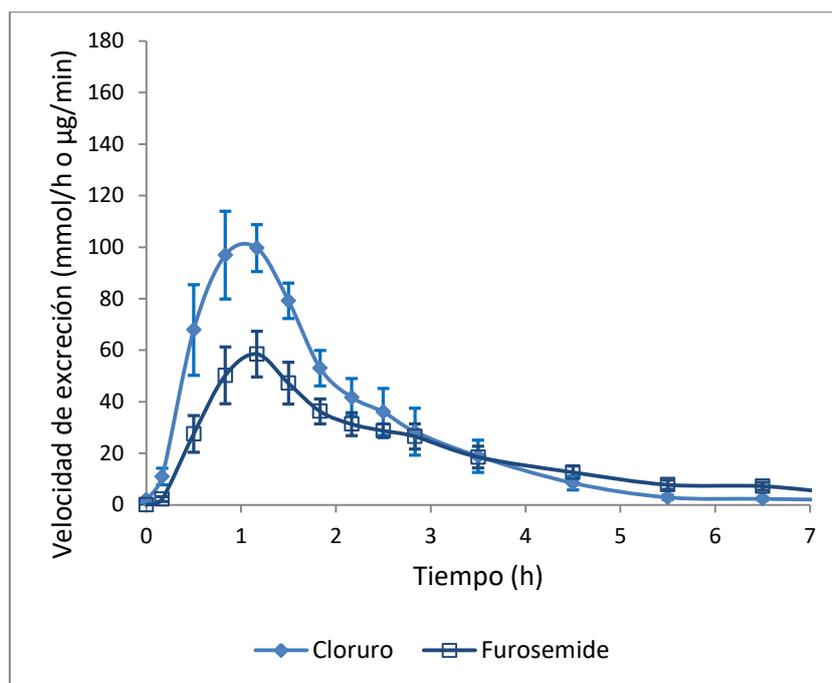


Figura 3.2.15 Perfil medio de velocidad de excreción de cloruro y furosemide en función del tiempo para Furosemide EFA en Mujeres. *mmol/h para cloruros; **µg/min para furosemide

ANOVA – Análisis estadístico de los resultados obtenidos:

En la tabla 3.2.7 se resumen los resultados para la totalidad de los sujetos, y separándolos por sexo.

Parámetro	ANOVA					CV _{res} (%)
	Test*	Referencia*	T/R	IC90%		
Total						
U [∞] (µg)	11700	11040	1.062	0.974	1.159	11.8
dU/dt _{max} (µg/h)	4884	4662	1.047	0.896	1.224	21.3
T _{max} (h)	1.17	1.17	0.00	-0.33	1.00	1.33
Hombres						
U [∞] (µg)	14640	14880	0.985	0.841	1.154	7.65
dU/dt _{max} (µg/h)	6516	7524	0.866	0.521	1.441	25.01
T _{max} (h)	1.33	1.00	0.50	-0.33	1.00	1.33
Mujeres						
U [∞] (µg)	9300	8460	1.097	0.966	1.248	13.2
dU/dt _{max} (µg/h)	4230	3672	1.151	1.011	1.311	13.4
T _{max} (h)	1.17	1.17	0.00	-0.33	0.67	1.00

Tabla 3.2.7 Resumen de resultados de bioequivalencia entre comprimidos conteniendo Furosemide, tomando en cuenta el total de los individuos, y separando por sexo. *Se informa la media geométrica de todos los parámetros, excepto para el T_{max}, del cual se informa la mediana. Para T_{max} se informa bajo la columna T/R la mediana de la diferencia T-R, bajo IC90% el rango entre el mínimo y máximo valor, y bajo CV_{res} la correspondiente amplitud del rango

El IC90% para el parámetro $U[\infty]$ se encuentra dentro de las especificaciones de bioequivalencia, tanto para el caso en que se analiza la totalidad de los individuos como cuando el análisis se hace separando a los mismos según el sexo. Esto significaría que la biodisponibilidad en términos de cantidad sería equivalente para ambas formulaciones. Sin embargo, en el caso del parámetro dU/dt_{max} , los resultados solo permiten afirmar equivalencia de velocidad de absorción cuando se analiza en el total de sujetos. Cuando se evalúa el subgrupo de mujeres, el IC90% para este parámetro se encuentra fuera de las especificaciones para concluir bioequivalencia. En el caso de los hombres no se puede concluir nada respecto a este parámetro ya que presenta una gran variabilidad. Aumentando el número de individuos hombre se lograría obtener un resultado que permitiese concluir al respecto.

No obstante, es interesante constatar que el desvío hacia la derecha que producen las mujeres en el cociente T/R de la máxima velocidad de excreción urinaria (reflejo de la velocidad de absorción) sería contrarrestado por el desvío hacia la izquierda que producen los hombres, y por lo tanto aun cuando las formulaciones resultasen bioequivalentes en el conjunto de la población, las relativas de velocidad de absorción mostrarían opuestos apartamientos entre hombres y mujeres.

Se realizó una comparación por sexo de los parámetros farmacocinéticos $U[\infty]$ y dU/dt_{max} . Para esto se llevó a cabo una prueba t de Student para ambas formulaciones juntas y por separado. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Comparación de parámetros Hombre vs Mujer			
Parámetro	Test	Referencia	Test + Referencia
dU/dt_{max}	$p = 0,0489$	$p = 0,0032$	$p = 0,0097$
$U[\infty]$	$p = 0,0026$	$p = 0,0030$	$p = 0,0032$

Tabla 3.2.8 Comparación de parámetros farmacocinéticos a través de la prueba t de student.

A pesar de que no se puede concluir estadísticamente debido al bajo número de sujetos del subgrupo hombres, en todos los casos el valor de $p < 0.05$ refleja una diferencia apreciable en los valores de los parámetros farmacocinéticos dU/dt_{max} y $U[\infty]$ entre hombres y mujeres. Esto confirmaría la existencia de diferencias a nivel gastrointestinal entre ambos sexos, lo cual definiría una farmacocinética diferenciada de acuerdo al sexo, al punto tal que hombres y mujeres discriminarían diferente las biodisponibilidades de las formulaciones ensayadas. Especialmente la velocidad de absorción de las formulaciones estaría siendo diferenciada en direcciones opuestas según sean hombres o mujeres los sujetos que las reciban.

3.3. Conclusiones

- No existen diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de fármaco absorbido desde las formulaciones Lasix y Furosemide EFA, y además el IC90% del cociente de medias para el total de individuos, así como para los dos subgrupos que lo conforman, se encuentra dentro del rango especificado (0.80-

1.25) para la bioequivalencia. También la velocidad de absorción muestra bioequivalencia entre las formulaciones cuando se analiza el total de sujetos.

- En cambio, aun cuando no existen diferencias significativas de la velocidad de absorción de Furosemide entre las formulaciones ensayadas, el IC90% en el subgrupo de mujeres para el parámetro dU/dt_{max} no se encuentra dentro del rango especificado, y por tanto la bioequivalencia no puede ser afirmada definitivamente con el ensayo llevado a cabo.
- Existen diferencias apreciables en la cantidad y velocidad de absorción de furosemide entre hombres y mujeres, ya que al realizar la prueba t de student para los parámetros dU/dt_{max} y $U[\infty]$ comparando los resultados obtenidos con las dos formulaciones entre ambos subgrupos, se obtuvieron valores de $p < 0.05$. Estos resultados pueden deberse a la existencia de diferencias a nivel gastrointestinal como ser velocidad de vaciado gástrico, pH intestinal y pH estomacal entre hombres y mujeres. Estas diferencias afectarían a la velocidad de desintegración del medicamento y posterior disolución del fármaco en los fluidos gastrointestinales. Este punto será especialmente explotado cuando nos refiramos a las correlaciones *iviv*, tras lo cual surgirán evidencias respecto a la posibilidad de subrogar los ensayos de bioequivalencia *in vivo* mediante ensayos de disolución *in vitro*.

Capítulo 4. Correlaciones *in vivo* - *in vitro*

Una vez obtenidos los datos farmacocinéticos *in vivo* a partir de los estudios de bioequivalencia realizados en condiciones de ayuno, y los datos de disolución *in vitro*, obtenidos a través de diferentes metodologías, se procedió a correlacionar estos datos entre sí, a modo de lograr un modelo que permita predecir la absorción de este fármaco *in vivo* a partir de datos de disolución *in vitro*, correspondiéndose esto a uno de los objetivos principales del trabajo de tesis.

Dado que en los ensayos realizados en el aparato IV-USP con medios FaSSGF-FaSSIF-V2 no se evaluó el perfil de disolución para la formulación Furosemide EFA en mujeres, pero si se realizó en los ensayos a pH variable en USP II, se comenzó la búsqueda de correlación *iviv* con estos datos.

En la monografía de bioexención realizada por Granero et al. ^[27] se brindan datos de los logaritmos del coeficiente de distribución (logD) de Furosemide a diferentes pH. Los mismos se muestran en la tabla 4.1. Se determinó la función lineal que relaciona logD en función del pH, obteniéndose la curva de regresión mostrada en la Ecuación 4.1

$$y = -0.612x + 3.39 \quad r^2 = 0.9967$$

Ecuación 4.1 Función de regresión lineal que vincula el log D con el pH para Furosemide

pH	log D(n-octanol/agua)
2.58	1.78
5.86	-0.1
7.39	-1.2

Tabla 4.1. Datos bibliográficos de coeficiente de distribución en función del pH para Furosemide (Granero et al., 2010)

A partir de esta función matemática, se calcularon los valores de coeficientes de distribución D, para los valores de pH de los buffer utilizados en el ensayo de disolución: 2.50, 4.80 y 6.15, en mujeres; 1.46, 5.01 y 5.62, en hombres; así como para pH 6.8, común a ambos sexos. Este valor de pH se incluye debido a que más allá de que no fue empleado en el ensayo de disolución, se puede asumir que se alcanzará cierto tiempo después de haber ingresado el fármaco al intestino. Los valores de D calculados de este modo se presentan en la tabla 4.2.

Hombres			Mujeres		
pH	log [D]	D	pH	log [D]	D
1.46	2.50	314	2.50	1.86	72.4
5.01	0.323	2.11	4.80	0.452	2.83
5.62	-0.050	0.891	6.15	-0.375	0.422
6.80	-0.773	0.169	6.80	-0.773	0.169

Tabla 4.2. Valores de coeficientes de distribución D calculados a partir de la función 4.1 para los valores de pH de los buffer utilizados en los ensayos de disolución a pH variado, simulando los fluidos gastrointestinales bajo condiciones de ayuno en hombres y mujeres, así como para pH 6.8.

A partir de los valores de coeficiente de distribución calculados, se estimó que cantidad de Furosemide se absorbería a cada pH, según el porcentaje disuelto medido. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.3 y en los gráficos de las figuras 4.1 y 4.2, para hombres y mujeres respectivamente. Para los dos puntos correspondientes al tiempo en que el fármaco se encuentra en el estómago, se asume que el porcentaje absorbido de Furosemide es cero, ya que dicho órgano no presenta una membrana suficientemente extensa que permita una significativa absorción de la droga. Los cálculos de los porcentajes de absorción *in vitro* se realizan según Ecuación 4.2.

$$\%A_t = \%A_{(t-1)} + [\%Dis_t - \%A_{(t-1)}] * D / (D+1)$$

Ecuación 4.2 $\%A_t$ = porcentaje absorbido *in vitro* a un tiempo t; $\%A_{t-1}$ = porcentaje absorbido al tiempo anterior; $\%Dis_t$ = porcentaje disuelto a un tiempo t; D = coeficiente de distribución octanol / agua para furosemide correspondiente al pH del medio en que se encuentra a tiempo t.

Esta ecuación se deduce, considerando solo un intervalo de tiempo (Δt) comprendido entre (t-1) y t, de la siguiente manera: $\%A_{\Delta t} + \%NA_{\Delta t} = \%Dis_t - \%A_{(t-1)}$

Es decir lo absorbido más lo no absorbido debe ser igual al total existente en solución al tiempo t antes de distribuirse entre los dos solventes. Al mismo tiempo se cumple que: $\%A_{\Delta t} = \%NA_{\Delta t} * D$.

Despejando $\%A_{\Delta t}$, se obtiene el segundo sumando del segundo miembro de la ecuación 4.2, al cual se agrega lo absorbido al inicio del intervalo Δt para obtener de modo acumulativo lo absorbido hasta el tiempo t.

Hombres			Mujeres		
Tiempo (min) – pH	Lasix (%)	EFA (%)	Tiempo (min) – pH	Lasix (%)	EFA (%)
0 – 1.46	0	0	0 – 2.50	0	0
0 – 1.46	0	0	0 – 2.50	0	0
30 – 5.01	10.83	14.03	30 – 4.80	10.99	14.33
45 – 5.62	40.27	49.00	45 – 6.15	23.42	34.42
60 – 5.62	65.39	80.54	60 – 6.15	45.59	55.22
75 – 6.80	69.93	83.41	75 – 6.80	53.09	61.97
90 – 6.80	73.95	85.72	75 – 6.80	59.59	67.69

Tabla 4.3. Porcentaje de dosis absorbida estimada a partir de los porcentajes de disolución y los valores de coeficiente de distribución calculados para hombres y mujeres. Se indica a que pH corresponde el medio en el que se encontraría el fármaco.

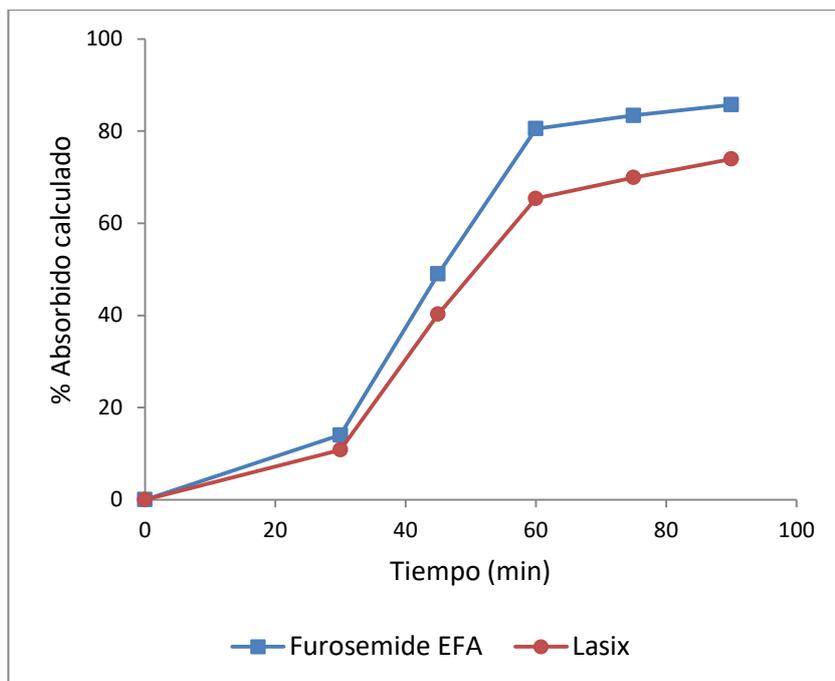


Figura 4.1. Gráfico de absorción *in vitro* en función del tiempo construido a partir de los datos de disolución de Furosemide a pH variable en USP II para hombres, y los datos bibliográficos de Distribución en función del pH.

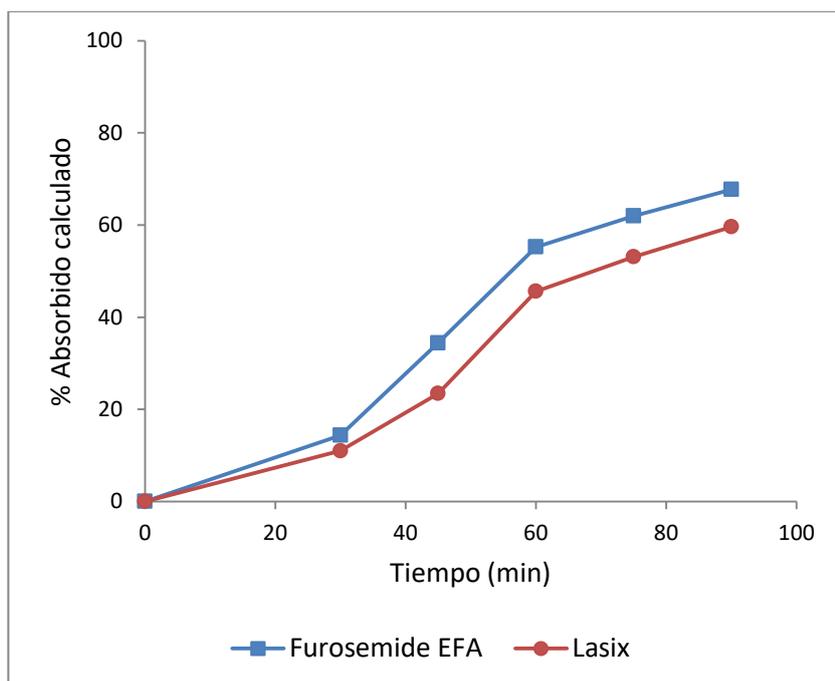


Figura 4.2. Gráfico de absorción *in vitro* en función del tiempo construido a partir de los datos de disolución de Furosemide a pH variable en USP II para mujeres, y los datos bibliográficos de Distribución en función del pH.

El cociente T/R calculado a partir de las estimaciones realizadas con los datos *in vitro*, no se asemeja al obtenido utilizando los datos *in vivo* en el subgrupo Hombres. Según la estimación *in vitro*, la biodisponibilidad del producto Test sería mayor a la de la Referencia, mientras que los resultados *in vivo* muestran similares biodisponibilidades.

Sin embargo, para el subgrupo Mujeres, coinciden las observaciones *in vivo* e *in vitro*. Estos resultados son informados en la tabla 4.4^a.

Por otro lado, al comparar las diferencias en la absorción entre hombres y mujeres para ambas formulaciones, los resultados muestran que *in vitro* hay una subestimación de estas diferencias, lo cual se observa en la tabla 4.4^b.

	Test/Referencia ^a		Hombres/Mujeres ^b	
	Hombres	Mujeres	Test	Referencia
<i>In vitro</i>	1.159	1.136	1.266	1.241
<i>In vivo</i>	0,9846	1,097	1,461	1,628

Tabla 4.4. Tabla comparativa de cocientes de los porcentajes de dosis absorbidos *in vitro* con los *in vivo*. En ^a se informan los cocientes para cada subgrupo (hombres y mujeres). En ^b se informan los cocientes para el Test y la Referencia, entre hombres y mujeres.

Se realizaron cambios en el procedimiento para estimar los porcentajes de absorción a partir de los datos *in vitro*, buscando encontrar una mejor aproximación con los datos *in vivo*. En el ensayo de disolución se observó una diferencia en las velocidades con que se desintegraban los comprimidos de ambas formulaciones. Sospechando que esta diferencia, de darse en el estómago (ya que la observación de este hecho fue en el medio que respresenta dicho órgano), podría tener una gran influencia sobre el tránsito gastrointestinal, y consecuentemente sobre la velocidad de absorción del fármaco. Se procedió a realizar un estudio de desintegración *in vitro*, a los dos pH que simularon el fluido gástrico, para hombres y mujeres. La determinación de los tiempos de desintegración *in vitro* se realizaron mediante aparato de desintegración USP suministrado por la Empresa TecnoLab, sin discos. Los tiempos de desintegración para cada comprimido fueron registrados manualmente, una vez que el comprimido desapareció por completo. Seis unidades de cada producto fueron ensayados de acuerdo a la farmacopea americana (USP30-NF25 capítulo <701> - Métodos fisicoquímicos). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.5.

N	Tiempo de desintegración (min)			
	Medio pH 1.2		Medio pH 2.5	
	Lasix	Furosemide EFA	Lasix	Furosemide EFA
1	0.317	2.03	0.500	3.42
2	0.367	2.08	0.400	3.00
3	0.367	2.05	0.533	3.42
4	0.350	2.08	0.500	3.40
5	0.367	2.03	0.500	3.33
6	0.333	2.03	0.433	3.10
<i>Promedio</i>	0.350	2.05	0.478	3.28

Tabla 4.5. Tiempos de desintegración total evaluados en 6 comprimidos conteniendo Furosemide de cada marca comercial (Lasix y Furosemide EFA) en medio pH 1.2 (hombres) y 2.5 (mujeres), simulando condiciones de ayuno.

Los resultados obtenidos muestran que la formulación Lasix se desintegra en forma prácticamente inmediata al entrar en contacto con el fluido de pH 1.2 y un poco más lento en medio pH 2.5, aunque ambos fueron inferiores a 1 minuto. De acuerdo a lo esperado, los comprimidos correspondientes a la formulación Furosemide EFA, presentaron mayores tiempos de desintegración que Lasix en ambos fluidos ensayados. Estas diferencias que podríamos considerar insignificantes, si las extrapolamos a lo que sucede con los comprimidos cuando se encuentran en el estómago, pueden estar influyendo en modo importante en los resultados de biodisponibilidad obtenidos. Los resultados dan la pauta de que tal vez la formulación Test permanezca retenida durante más tiempo en el estómago que la formulación Lasix ya que le toma más tiempo la desintegración total. De este modo se explicaría el más rápido comienzo de absorción que en hombres registraría la marca Lasix, ya que en este sexo el vaciado gástrico es más rápido que en mujeres, y por tanto las diferencias tecnológicas entre formulaciones sería decisivo en el tránsito gastrointestinal. En cambio en mujeres, las diferencias tecnológicas que impactaron en la desintegración no pudieron expresarse *in vivo*, dado que las mujeres controlan el pasaje desde estómago a duodeno de un modo fisiológico por su lento vaciado gástrico, y así las marcas emparejaron su tránsito gastrointestinal.

Sin embargo, la diferente cantidad absorbida de furosemida entre hombres y mujeres queda aún sin explicación. Quizás el diferente pH intestinal que presentan ambos sexos podría ser la causa de esta observación. Es de esperar que en la mujer el pH duodenal, primera porción del intestino con la cual el fármaco toma contacto, y lugar donde comienza la absorción del mismo, sea más básico que en el hombre ya que aún en condiciones de ayuno el pH gástrico de la mujer es menos ácido. Al pasar el contenido gástrico y mezclarse con el fluido intestinal femenino, el cual es además más básico que en el hombre por mayores secreciones de bicarbonato ^[25,28], hace una notoria diferencia con respecto al sexo masculino.

Como se menciona en el capítulo 1 de esta tesis, la Furosemide presentaría una ventana de absorción ya que al ser un compuesto de carácter ácido, con un pKa de 3.9, cuanto mayor sea el valor del pH del fluido donde se encuentre, mayor será la proporción de moléculas ionizadas del mismo. Sabido es que para que un compuesto logre atravesar una membrana biológica en forma pasiva, un requisito fundamental es que no se encuentre ionizado. Por lo tanto, para el caso de la Furosemide que es absorbida a nivel intestinal por los enterocitos de forma pasiva, cuanto más cantidad de moléculas ionizadas presente, menor va a ser el porcentaje que se absorba del fármaco. Por ende, al avanzar a lo largo del intestino, disminuye la absorción de Furosemide por el aumento de pH que se va dando. Estos supuestos podrían explicar los resultados observados en los estudios *in vivo*, donde la biodisponibilidad para ambas formulaciones en el subgrupo de las mujeres es sensiblemente menor que en el subgrupo de los hombres.

A los efectos de incorporar estos aspectos de la fisiología gastrointestinal distintiva entre ambos sexos y a su vez la diferencia tecnológica entre las formulaciones, se debería modificar las condiciones experimentales *in vitro*. Por un lado se debería adelantar el pasaje de Lasix hacia el intestino en la simulación del tracto digestivo masculino, y por otro lado se debería hacer un degradé más pronunciado del pH en la mujer a lo largo del tiempo. El problema práctico que esto implicaría es insalvable cuando se dispone de solamente el aparato II-USP. En cambio, si se dispusiera del aparato IV-USP la programación de estos eventos se facilitaría, a la vez de automatizarse. Al momento de trabajar con el aparato IV no se disponía aún de los resultados *in vivo*. Sin embargo, manipulando los resultados obtenidos cuando se operó con el aparato IV-USP en condiciones de pH gástrico de hombres en ayunas, se pudo lograr una interesante observación. Manipulación válida, dado que aún cuando los resultados experimentales *in vitro* simularon la fisiología gastrointestinal de hombres, se puede comprobar que la disolución de furosemide no cambia apreciablemente entre los pHs gástricos de ambos sexos. Además, no se necesitaría calcular el porcentaje repartido a octanol para demostrar que en hombres la absorción es mayor a la misma altura del tracto intestinal, porque así se demostró en los cálculos que se hicieron previamente cuando a iguales tiempos de ensayo (que supondrían iguales distancias a lo largo del intestino), el pH intestinal en hombres es más ácido que en mujeres. Por consiguiente, lo que efectivamente se manipuló fue reducir la permanencia de Lasix en el estómago del hombre, y computar los porcentajes disueltos en la porción intestinal hasta un tiempo mayor que en la mujer. Ambas acciones se muestran en las figuras 4.3 y 4.4.

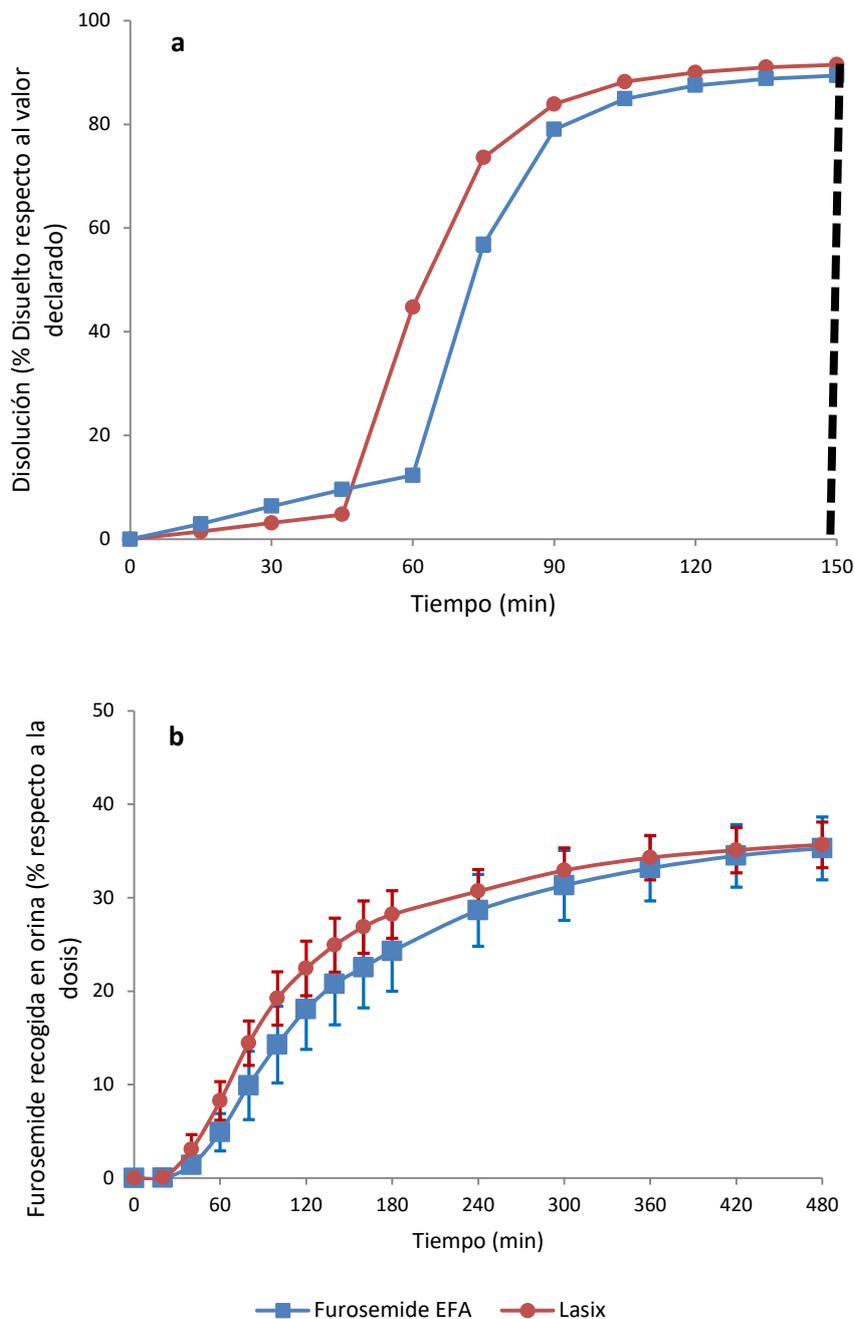


Figura 4.3. ^a Perfil de disolución de furosemide en aparato IV-USP en medios biorrelevantes FaSSGF y FaSSIF, modificando el tiempo al que el fármaco pasa desde el estomago hacia el intestino. La línea puntada determina el tiempo donde finalizaría la ventana de absorción intestinal para el furosemide en **hombres**. ^b Perfil de cantidad acumulativa de furosemide recogida en orina para los hombres. Este perfil fue realizado a partir de los datos medios presentados en las tablas 3.2.3 y 3.2.5 para Lasix y Furosemide EFA respectivamente.

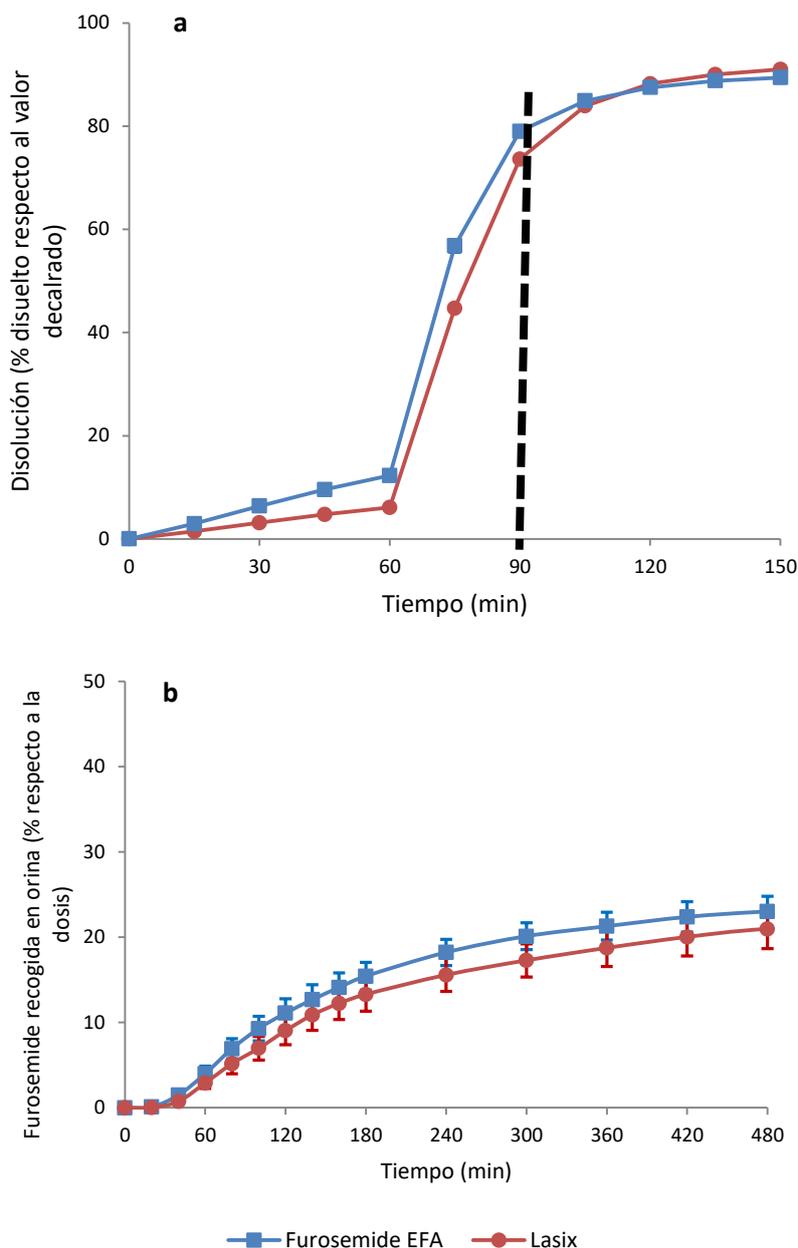


Figura 4.4. ^a Perfil de disolución de furosemide en aparato IV-USP en medios biorrelevantes FaSSGF y FaSSIF, modificando el tiempo al que el fármaco pasa desde el estómago hacia el intestino. La línea puntada determina el tiempo donde finalizaría la ventana de absorción intestinal para el furosemide en mujeres. ^b Perfil de cantidad acumulativa de furosemide recogida en orina para los mujeres. Este perfil fue realizado a partir de los datos medios presentados en las tablas 3.2.4 y 3.2.6 para Lasix y Furosemide EFA respectivamente.

De este modo se concluye que, contando con el aparato IV-USP sería posible, mediante disoluciones *in vitro*, predecir eventuales bioequivalencias o bioinequivalencias en forma rápida y con menores costos económicos y éticos que mediante realización de estudios *in vivo*, logrando inclusive, diferenciar las biodisponibilidades según el sexo de los individuos.

Capítulo 5. Bioequivalencia de dos formulaciones de administración oral conteniendo Furosemide en condiciones de administración coprandial. Comparación de los modos de administración ensayados.

5.1 Metodología

5.1.1 Fase clínica

Se realizó un estudio *in vivo*, administrando a voluntarios sanos, de ambos sexos, furosemide en dosis únicas de 40 mg para Referencia (Lasix®), y 40 mg para Test (Furosemide EFA), en forma aleatoria, cruzada y compensada. Cada voluntario recibió 2 dosis (una de cada producto) en la mañana (08:00), separadas al menos por 7 días. En el estudio participaron once individuos, cuatro hombres y 7 mujeres. El voluntario número 11 (femenino), no participó de la fase con comidas del estudio. El fármaco inalterado fue monitoreado en orina durante 12 horas post-dosis. Para balancear la secuencia de administración, se descarta la voluntaria número 9 del análisis estadístico

La administración de la dosis fue realizada en la mañana. Luego de 8 horas de ayuno, recibieron un desayuno estandarizado previamente a la administración del medicamento. A las 5 horas post – dosis, se les administró un almuerzo, una merienda (8 h- post-dosis), y una cena (12 h-post – dosis). Todas las comidas fueron estandarizadas, así como las ingestas de líquidos.

Como se indica en el capítulo 3 punto 3.1.1, el monitoreo de la droga fue realizado midiendo la concentración en orina, la cual se obtuvo por micción espontánea a tiempos estandarizados.

Después de cada muestra urinaria, desde los 40 min hasta las 3 hs post dosis, los voluntarios recibieron 67 mL de una solución de rehidratación para reposición de electrolitos (REHIDROMS®). Posteriormente a cada muestreo de orina correspondientes a los tiempos 210 y 240 minutos, se le administró a los voluntarios 50 mL de la solución de rehidratación, y luego de las 4 hs post dosis, los voluntarios recibieron 100 mL de dicha solución tras cada micción. La composición de la misma se ajustó a los siguientes valores: sodio 15 mmol/L, potasio 4 mmol/L, cloruro 13 mmol/L, glucosa 15 mmol/L, citrato 2 mmol/L.

Los tiempos de muestreo fueron: 0 (predosis) – 20 – 40 – 60 – 80 – 100 – 120 – 140 – 160 – 180 – 210 – 240 – 300 – 360 – 420 – 480 – 600 – 720 min– post-dosis, registrándose los volúmenes de las muestras de orina. Dos alícuotas de lo orinado (muestra y contramuestra) se guardaron en el freezer (-25°C) hasta el momento del análisis y otra alícuota se almacenó en heladera (menor a 8°C) para análisis de electrolitos en orina.

5.1.2. Fase analítica

La determinación de concentraciones urinarias de furosemide y electrolitos se realizó mediante las técnicas mencionadas en el capítulo 3 punto 3.1.2, al igual que los cálculos para la determinación de los parámetros cinéticos $(dU/dt)_{max}$ y $U[\infty]$.

5.1.3. Fase de Análisis estadístico

Se analizó la distribución estadística de los parámetros farmacocinéticos $(dU/dt)_{max}$ y $U[\infty]$. Dado que la distribución resultó ser normal, se realizó posteriormente un análisis de la varianza (ANOVA), como se indica en capítulo 3 punto 3.3.1

Para evaluar T_{max} se aplicó un test no paramétrico llamado T-Wilcoxon.

Independientemente del análisis estadístico utilizado para concluir sobre la bioequivalencia entre Test y Referencia, se estimaron las medias, desviaciones estándares y coeficientes de variación, para cada parámetro y forma farmacéutica ensayada. La bioequivalencia entre formulaciones se concluye cuando los IC90% para el cociente Test/Referencia de medias geométricas de los parámetros farmacocinéticos $(dU/dt)_{max}$ y $U[\infty]$, se encuentren comprendidos entre 0,80 y 1,25.

5.2. Resultados

En virtud de que se arribó a un número impar de voluntarios (11), hubo que quitar otro sujeto para que la secuencia de tratamientos TR y RT quedara balanceada. De este modo una de las mujeres no fue tomada en cuenta en el análisis estadístico de bioequivalencia. Las tablas 5.2.1 y 5.2.2 y los gráficos de las figuras 5.2.1 y 5.2.2 muestran los resultados medios obtenidos en 10 de los 11 voluntarios que participaron del estudio

Parámetros	Lasix									
	Furosemide dE/dt (ug/min)		Cloruro dE/dt (mmol/h)		Orina dE/dt (5xmL/min)		Sodio dE/dt (mmol/h)		Potasio dE/dt (mmol/h)	
t (h)	media	SE	media	SE	media	SE	media	SE	media	SE
0,00	0,00	0,000	2,83	0,228	5,50	0,964	5,37	0,545	1,54	0,197
0,17	0,00	0,000	4,36	0,854	6,75	3,370	4,00	0,943	2,13	0,332
0,50	2,25	0,921	7,17	2,800	17,20	6,797	7,17	3,226	1,54	0,286
0,83	15,96	4,299	36,88	11,319	32,09	7,109	33,35	10,541	4,33	1,165
1,17	20,13	4,438	48,32	10,186	38,59	6,967	43,30	9,619	5,13	0,770
1,50	25,04	4,448	50,08	9,118	40,92	5,352	44,50	8,726	6,35	0,798
1,83	30,69	4,555	56,47	7,856	46,38	4,960	49,99	7,764	7,74	0,645
2,17	32,12	4,380	54,69	4,856	47,16	3,541	47,96	4,685	8,67	0,674
2,50	35,42	4,384	59,66	5,348	50,16	4,715	52,21	4,921	9,69	0,823
2,83	37,72	4,501	58,24	6,714	49,57	4,693	50,76	6,277	9,78	0,795
3,25	34,23	4,702	46,54	7,114	39,68	5,281	40,07	7,047	8,77	0,760
3,75	23,67	4,835	26,51	4,325	21,42	2,592	21,15	4,000	6,13	0,816
4,50	15,53	2,514	18,96	4,147	15,98	2,417	15,09	3,812	5,78	0,453
5,50	6,92	1,319	4,48	1,081	3,42	0,685	3,82	0,960	2,27	0,398
6,50	10,44	1,716	5,80	1,318	7,67	1,493	6,33	1,242	2,14	0,439
7,50	5,72	0,386	3,14	0,450	6,30	1,350	5,17	0,744	1,45	0,152
9,00	2,80	0,319	2,85	0,438	4,58	0,533	5,33	0,716	1,30	0,158
11,00	2,10	0,196	2,67	0,243	5,50	0,964	5,37	0,545	1,54	0,197
To (h)	0,56	0,039	-	-	-	-	-	-	-	-
Tmax (h)	2,34	0,248	2,08	0,236	1,84	0,262	2,08	0,236	2,36	0,238
dU/dt max	43,86	4,058	84,09	6,059	68,07	3,618	75,85	6,187	10,88	0,728
U [12 h]	8680,46	715,777	206,56	18,259	2337,18	147,357	194,44	18,676	43,38	2,543

Tabla 5.2.1. Resultados medios de velocidades de excreción obtenidos para la formulación **Lasix**.

* ug; ** mmol; *** mL.

Parámetros	Furosemide EFA									
	Furosemide dE/dt (ug/min)		Cloruro dE/dt (mmol/h)		Orina dE/dt (5x mL/min)		Sodio dE/dt (mmol/h)		Potasio dE/dt (mmol/h)	
t (h)	media	SE	media	SE	media	SE	media	SE	media	SE
0,00	0,00	0,000	2,69	0,225	4,94	0,518	5,97	0,753	1,36	0,250
0,17	0,13	0,103	5,67	1,179	4,05	0,996	4,67	1,218	2,35	0,679
0,50	5,17	2,376	17,82	6,944	17,18	6,741	16,73	6,972	2,46	0,534
0,83	17,45	5,201	45,46	12,369	37,23	9,291	41,24	11,515	4,93	1,188
1,17	24,92	5,452	59,22	11,759	38,95	7,682	53,47	11,018	7,07	0,958
1,50	27,74	5,684	61,58	8,681	42,82	5,606	54,08	8,448	7,91	0,709
1,83	32,99	6,196	60,77	7,160	50,11	4,748	53,18	7,368	9,01	0,691
2,17	29,82	3,518	54,15	6,595	45,00	3,443	46,67	6,760	9,22	0,724
2,50	30,86	3,222	51,68	6,475	44,11	4,309	43,80	6,507	9,85	0,622
2,83	30,67	3,636	44,88	6,255	42,61	4,539	37,38	6,081	9,50	0,544
3,25	27,58	4,224	37,04	4,317	36,36	3,549	30,21	4,055	8,85	0,492
3,75	22,81	3,850	28,72	4,638	26,70	4,265	23,06	4,100	6,73	0,829
4,50	15,48	1,915	14,85	1,983	13,94	1,566	11,34	1,687	5,22	0,601
5,50	8,11	0,953	5,54	0,684	4,37	0,626	4,50	0,633	2,82	0,326
6,50	7,64	0,834	4,37	0,763	9,14	1,820	4,89	0,722	1,53	0,273
7,50	5,18	0,565	4,04	0,769	5,44	0,530	5,65	0,743	1,44	0,279
9,00	3,33	0,207	3,19	0,469	6,90	0,875	5,14	0,589	1,27	0,205
11,00	2,11	0,135	3,56	0,624	4,94	0,518	5,97	0,753	1,36	0,250
To (h)	0,47	0,051	-	-	-	-	-	-	-	-
Tmax (h)	2,28	0,297	1,92	0,297	2,08	0,243	1,92	0,297	2,38	0,174
dU/dt max	45,99	3,883	82,73	8,492	64,35	5,183	74,58	8,666	10,80	0,637
U [12 h]	8352,87	625,920	208,89	16,781	2355,36	121,708	191,86	17,129	44,97	2,836

Tabla 5.2.2 Resultados medios de velocidades de excreción obtenidos para la formulación **Furosemide EFA**.

* ug; ** mmol; *** mL.

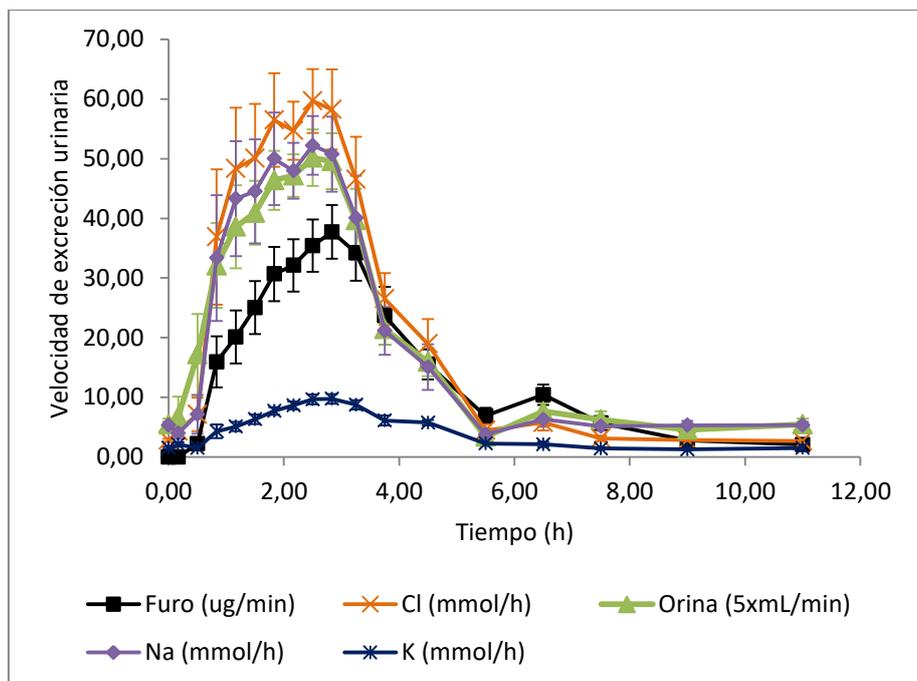


Figura 5.2.1. Perfiles medios de velocidades de excreción de: furosemide, cloruro, sodio, potasio y orina, obtenidas para la formulación **LASIX**.

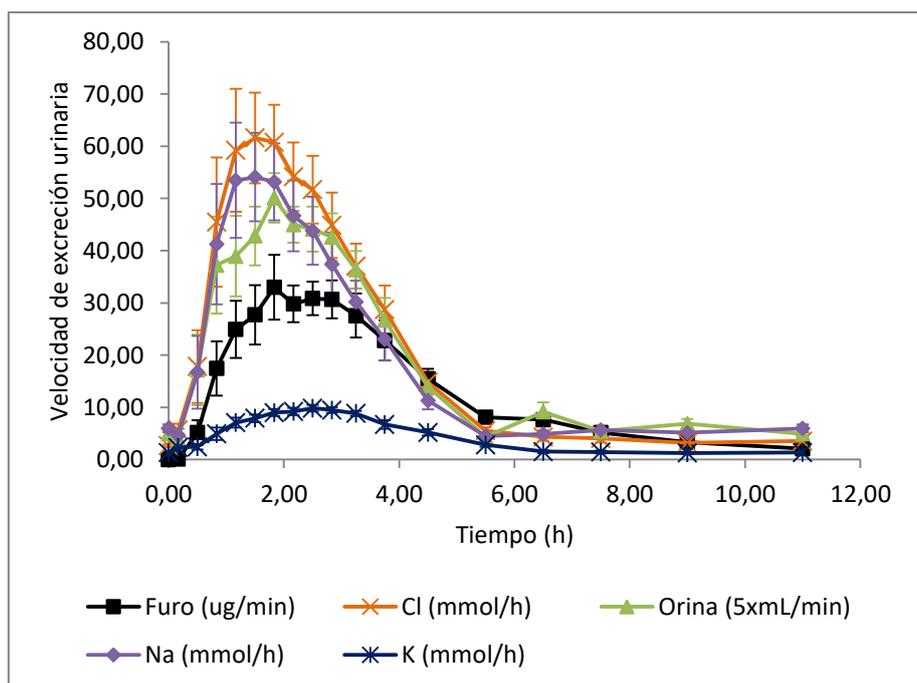


Figura 5.2.2. Perfiles medios de velocidades de excreción de: furosemide, cloruro, sodio, potasio y orina, obtenidas para la formulación **Furosemide EFA**.

Al igual que se observa en el estudio realizado bajo condiciones de ayuno (Capítulo 3 de esta tesis), para el análisis farmacodinámico, se utilizó solo el perfil de velocidad de excreción de cloruro en función del tiempo.

Los resultados medios considerando el sexo de los individuos se muestran en las tablas 5.2.3 a 5.2.6.

Parámetros	Lasix - Hombres									
	Furosemide dE/dt (ug/min)		Cloruro dE/dt (mmol/h)		Orina dE/dt (5x mL/min)		Sodio dE/dt (mmol/h)		Potasio dE/dt (mmol/h)	
	t (h)	media	SE	media	SE	media	SE	media	SE	media
0,00	0,00	0,000	3,69	0,212	4,52	1,161	5,81	1,237	1,28	0,373
0,17	0,00	0,000	3,83	1,794	3,38	1,560	3,08	1,403	2,08	0,896
0,50	1,14	0,452	3,92	1,968	12,00	10,188	3,14	1,902	1,62	0,646
0,83	23,25	7,898	50,15	19,802	34,38	12,830	43,01	17,378	7,12	2,780
1,17	25,74	9,514	68,77	17,836	53,75	13,239	60,48	17,352	6,92	1,375
1,50	34,23	7,857	68,97	20,730	50,38	13,394	60,64	20,445	7,67	1,479
1,83	39,36	9,445	71,64	19,544	49,19	12,766	62,81	19,869	8,31	1,345
2,17	39,81	5,965	62,50	12,126	48,88	10,201	53,99	11,890	8,36	1,501
2,50	39,86	7,553	60,40	13,910	46,50	10,626	51,88	13,310	8,44	1,397
2,83	40,77	10,672	56,24	17,182	44,81	12,313	47,74	16,478	8,41	1,437
3,25	32,19	7,843	36,69	11,682	33,08	8,935	30,31	11,312	6,81	0,982
3,75	23,32	8,672	20,68	9,396	21,21	6,151	15,94	8,512	3,85	1,078
4,50	11,81	2,199	14,14	4,176	16,58	3,677	11,14	3,514	5,07	0,448
5,50	6,24	2,289	4,02	1,526	3,92	1,567	3,81	1,420	2,57	0,999
6,50	11,95	4,277	8,46	3,034	9,04	2,334	9,24	2,755	2,68	1,032
7,50	5,56	0,575	4,53	0,739	9,52	3,093	6,31	0,958	1,92	0,317
9,00	2,73	0,660	4,32	0,793	5,28	0,461	6,83	1,251	1,46	0,429
11,00	1,86	0,130	3,27	0,567	4,52	1,161	5,81	1,237	1,28	0,373
To (h)	0,58	0,082	-	-	-	-	-	-	-	-
Tmax (h)	2,08	0,439	1,75	0,371	1,67	0,397	1,75	0,371	1,58	0,440
dU/dt max	49,23	7,434	90,35	13,452	64,94	8,241	79,34	13,852	10,70	1,308
U [12 h]	9302,82	1537,868	224,77	49,198	2402,75	368,881	208,72	50,324	43,30	2,945

Tabla 5.2.3 Resultados medios de velocidades de excreción obtenidos para la formulación **Lasix** en Hombres.

* ug; ** mmol; *** mL.

Parámetros	Lasix - Mujeres									
	Furosemide dE/dt (ug/min)		Cloruro dE/dt (mmol/h)		Orina dE/dt (5xmL/min)		Sodio dE/dt (mmol/h)		Potasio dE/dt (mmol/h)	
	t (h)	media	SE	media	SE	media	SE	media	SE	media
0,00	0,00	0,000	2,34	0,147	6,07	1,363	5,12	0,579	1,69	0,231
0,17	0,00	0,000	4,66	0,992	8,68	5,127	4,52	1,273	2,16	0,272
0,50	2,88	1,382	9,02	4,153	20,18	9,275	9,48	4,795	1,50	0,315
0,83	11,79	4,862	29,29	14,114	30,79	9,193	27,83	13,787	2,73	0,662
1,17	16,92	4,742	36,64	11,187	29,93	6,888	33,49	10,835	4,11	0,767
1,50	19,79	4,793	39,28	7,329	35,52	3,880	35,28	7,193	5,59	0,902
1,83	25,73	4,438	47,80	5,353	44,77	4,443	42,66	5,519	7,42	0,738
2,17	27,73	5,597	50,23	3,771	46,18	2,225	44,51	3,844	8,84	0,749
2,50	32,88	5,587	59,25	4,804	52,25	5,059	52,39	4,030	10,41	1,000
2,83	35,97	4,578	59,37	6,194	52,29	3,769	52,48	5,424	10,56	0,905
3,25	35,39	6,273	52,17	8,927	43,45	6,637	45,64	8,928	9,90	0,835
3,75	23,87	6,294	29,84	4,499	21,55	2,709	24,14	4,281	7,44	0,831
4,50	17,66	3,573	21,72	5,965	15,63	3,343	17,35	5,585	6,19	0,630
5,50	7,30	1,726	4,74	1,521	3,13	0,724	3,82	1,341	2,10	0,368
6,50	9,57	1,579	4,27	1,053	6,88	1,990	4,66	0,919	1,83	0,420
7,50	5,81	0,536	2,36	0,346	4,46	0,898	4,52	0,992	1,19	0,060
9,00	2,84	0,380	2,01	0,200	4,18	0,770	4,48	0,771	1,21	0,113
11,00	2,23	0,292	2,34	0,147	6,07	1,363	5,12	0,579	1,69	0,231
To (h)	0,55	0,044	-	-	-	-	-	-	-	-
Tmax (h)	2,49	0,312	2,27	0,300	1,94	0,358	2,27	0,300	2,81	0,119
dU/dt max	40,79	4,856	80,52	6,437	69,86	3,802	73,86	6,791	10,99	0,945
U [12 h]	8324,83	799,286	196,16	13,601	2299,71	140,371	186,28	14,566	43,43	3,741

Tabla 5.2.4 Resultados medios de velocidades de excreción obtenidos para la formulación **Lasix** en Mujeres.

* ug; ** mmol; *** mL.

Parámetros	Furosemide EFA - Hombres									
	Furosemide dE/dt (ug/min)		Cloruro dE/dt (mmol/h)		Orina dE/dt (5xmL/min)		Sodio dE/dt (mmol/h)		Potasio dE/dt (mmol/h)	
	t (h)	media	SE	media	SE	media	SE	media	SE	media
0,00	0,00	0,000	2,69	0,204	4,17	0,727	5,46	1,369	1,29	0,253
0,17	0,00	0,000	5,60	2,735	2,88	1,125	3,11	1,107	3,15	1,952
0,50	3,48	2,273	17,17	7,535	8,63	3,268	14,54	7,452	3,40	1,140
0,83	22,68	9,900	59,36	25,683	39,25	17,716	51,36	23,296	6,59	2,840
1,17	33,19	10,267	75,44	26,592	47,75	16,781	67,92	24,119	8,82	2,121
1,50	38,06	9,627	75,32	16,819	48,94	12,350	64,21	16,645	9,03	1,449
1,83	45,32	10,353	72,15	12,384	50,81	5,188	61,15	12,533	9,78	0,987
2,17	32,08	8,332	58,08	9,799	41,75	4,715	47,69	10,140	9,33	0,538
2,50	35,09	4,422	55,56	9,337	41,38	5,417	45,21	9,526	9,45	0,431
2,83	37,49	7,117	44,13	9,458	38,94	5,611	34,87	9,199	8,74	0,186
3,25	35,65	9,402	37,25	9,340	36,25	5,644	29,22	8,937	7,82	0,170
3,75	27,95	7,340	28,28	9,271	25,67	7,006	22,19	8,056	6,30	1,110
4,50	17,25	2,235	14,73	2,752	17,58	1,614	10,90	2,688	5,56	0,717
5,50	6,55	2,005	5,68	0,987	5,90	1,361	4,62	0,948	3,40	0,804
6,50	8,03	0,972	6,42	1,257	11,52	1,637	6,51	1,180	2,45	0,470
7,50	5,67	0,535	6,07	1,789	6,02	0,719	6,78	1,765	2,33	0,560
9,00	3,04	0,176	3,89	1,158	6,69	1,795	4,65	1,114	1,69	0,480
11,00	1,78	0,147	3,85	1,208	4,17	0,727	5,46	1,369	1,29	0,253
To (h)	0,58	0,082	-	-	-	-	-	-	-	-
Tmax (h)	2,23	0,548	1,58	0,370	1,58	0,370	1,58	0,370	2,00	0,441
dU/dt max	51,25	7,990	91,66	19,515	64,63	9,514	79,94	19,463	11,09	1,095
U [12 h]	9765,39	1442,817	236,05	38,614	2432,75	207,616	205,07	39,862	50,01	3,684

Tabla 5.2.5 Resultados medios de velocidades de excreción obtenidos para la formulación **Furosemide EFA en Hombres**.

* ug; ** mmol; *** mL.

Parámetros	Furosemide EFA - Mujeres									
	Furosemide dE/dt (ug/min)		Cloruro dE/dt (mmol/h)		Orina dE/dt (5x mL/min)		Sodio dE/dt (mmol/h)		Potasio dE/dt (mmol/h)	
t (h)	media	SE	media	SE	media	SE	media	SE	media	SE
0,00	0,00	0,000	2,70	0,341	5,38	0,680	6,26	0,956	1,41	0,374
0,17	0,21	0,156	5,72	1,267	4,71	1,409	5,57	1,755	1,89	0,342
0,50	6,14	3,527	18,18	10,310	22,07	10,067	17,98	10,345	1,92	0,523
0,83	14,47	6,289	37,51	13,865	36,07	11,696	35,45	13,504	3,99	1,073
1,17	20,20	6,246	49,95	11,594	33,93	8,186	45,21	11,433	6,08	0,878
1,50	21,84	6,608	53,73	9,643	39,32	5,961	48,30	9,783	7,28	0,753
1,83	25,94	7,019	54,26	8,535	49,71	7,040	48,62	9,389	8,57	0,934
2,17	28,53	3,593	51,91	9,095	46,86	4,764	46,08	9,403	9,16	1,113
2,50	28,44	4,326	49,47	9,003	45,68	6,173	43,00	9,105	10,08	0,949
2,83	26,78	3,782	45,30	8,681	44,71	6,470	38,82	8,395	9,93	0,810
3,25	22,97	3,738	36,92	4,978	36,43	4,849	30,79	4,584	9,44	0,678
3,75	19,88	4,486	28,97	5,680	27,29	5,750	23,56	5,070	6,98	1,178
4,50	14,47	2,740	14,91	2,817	11,86	1,935	11,58	2,299	5,02	0,871
5,50	9,01	0,972	5,45	0,960	3,50	0,461	4,44	0,880	2,49	0,244
6,50	7,42	1,219	3,19	0,711	7,79	2,622	3,97	0,783	1,00	0,140
7,50	4,89	0,832	2,89	0,374	5,11	0,727	5,01	0,661	0,93	0,119
9,00	3,50	0,296	2,78	0,386	7,02	1,049	5,42	0,725	1,03	0,156
11,00	2,29	0,162	3,40	0,773	5,38	0,680	6,26	0,956	1,41	0,374
To (h)	0,41	0,057	-	-	-	-	-	-	-	-
Tmax (h)	2,31	0,381	2,12	0,414	2,37	0,285	2,12	0,414	2,59	0,088
dU/dt max	42,99	4,256	77,63	8,638	64,19	6,672	71,52	9,449	10,63	0,838
U [12 h]	7545,72	444,673	193,38	15,320	2311,14	159,599	184,32	17,705	42,09	3,659

Tabla 5.2.6 Resultados medios de velocidades de excreción obtenidos para la formulación **Furosemide EFA en Mujeres**.

* ug; ** mmol; *** mL.

A continuación se presentan los gráficos que comparan la farmacocinética y farmacodinamia entre las dos formulaciones en estudio (figuras 5.2.3 y 5.2.4).

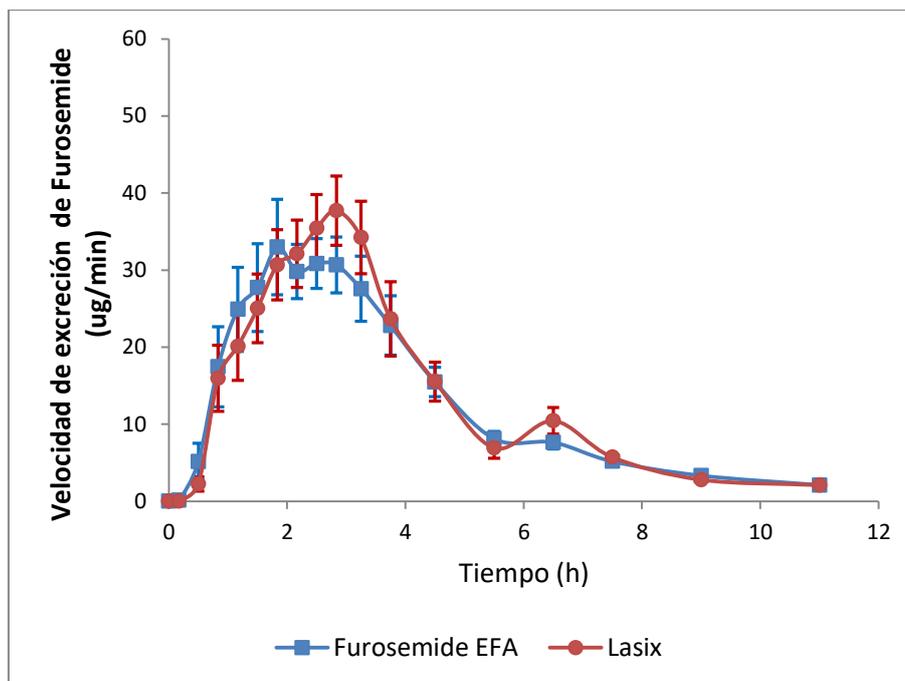


Figura 5.2.3. Perfil medio de velocidad de excreción de Furosemide en función del tiempo para Test y Referencia, tomando en cuenta la totalidad de individuos.

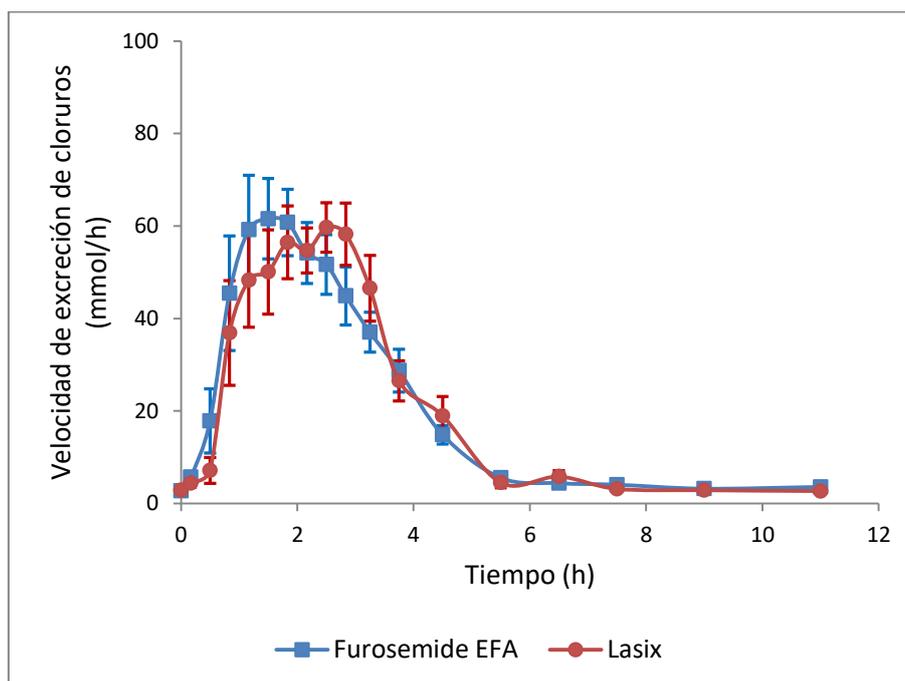


Figura 5.2.4. Perfil de velocidad de excreción de Cloruros en función del tiempo para Test y Referencia, tomando en cuenta la totalidad de individuos.

Se observa una clara similitud entre los perfiles PK y PD a lo largo del tiempo. A los efectos de correlacionarlos se grafica velocidad de excreción de cloruros en función de la velocidad de excreción de furosemide, al igual que en el capítulo 3 para la administración de los medicamentos bajo condiciones de ayuno (figura 5.2.5).

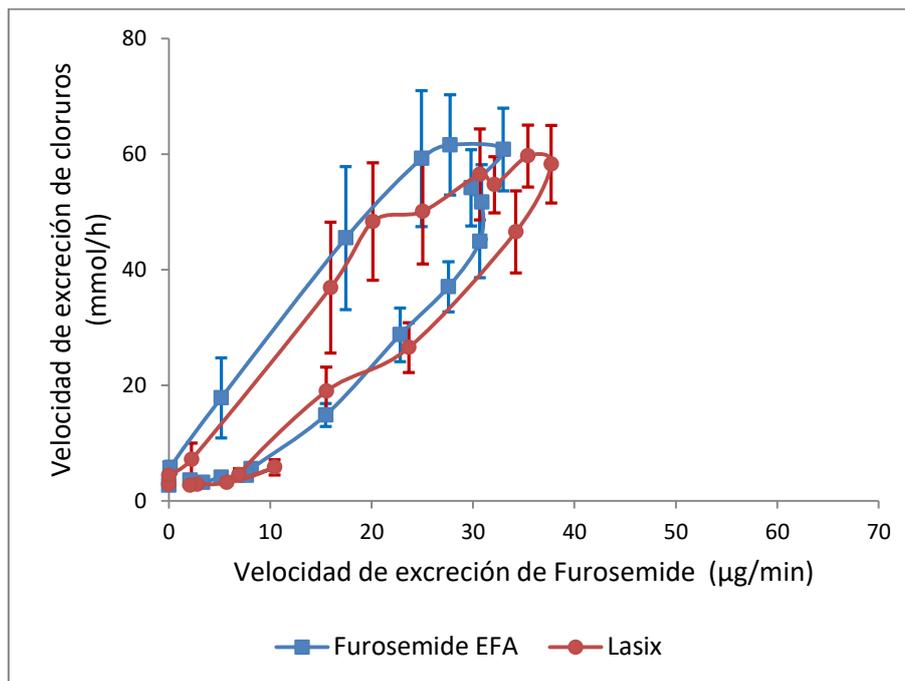


Figura 5.2.5 Perfil medio de velocidad de excreción de Cloruros en función de velocidad de excreción de Furosemide para Test y Referencia, tomando en cuenta la totalidad de individuos.

Posteriormente, se realizaron los mismos gráficos, separando los resultados obtenidos según el sexo de los voluntarios (figuras 5.2.6 a 5.2.11)

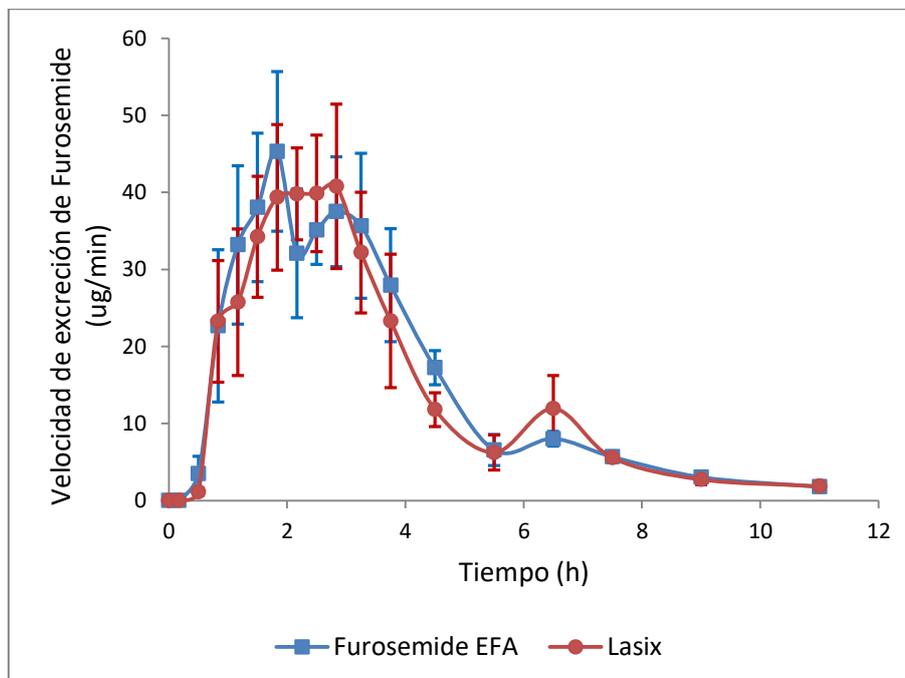


Figura 5.2.6 Perfil medio de velocidad de excreción de Furosemide en función del tiempo para Test y Referencia en **HOMBRES**

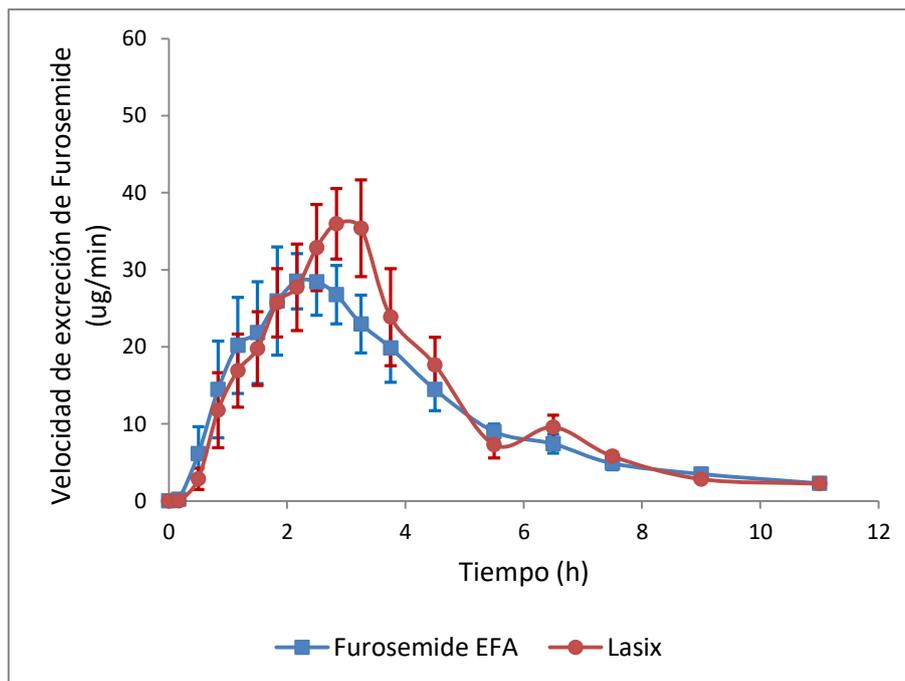


Figura 5.2.7. Perfil medio de velocidad de excreción de Furosemide en función del tiempo para Test y Referencia en **MUJERES**

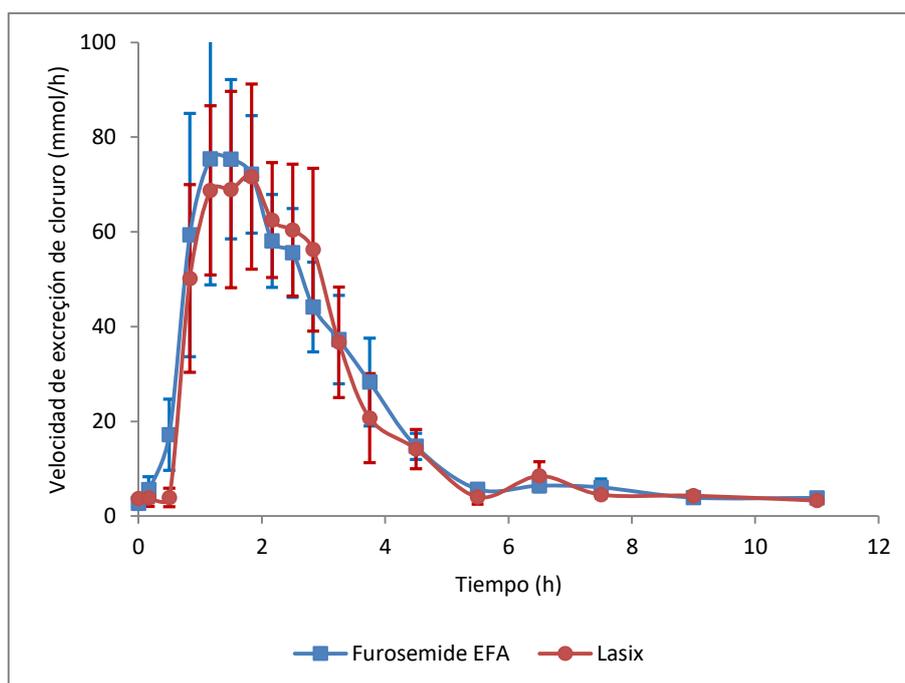


Figura 5.2.8 Perfil medio de velocidad de excreción de cloruro en función del tiempo para Test y Referencia en **HOMBRES**.

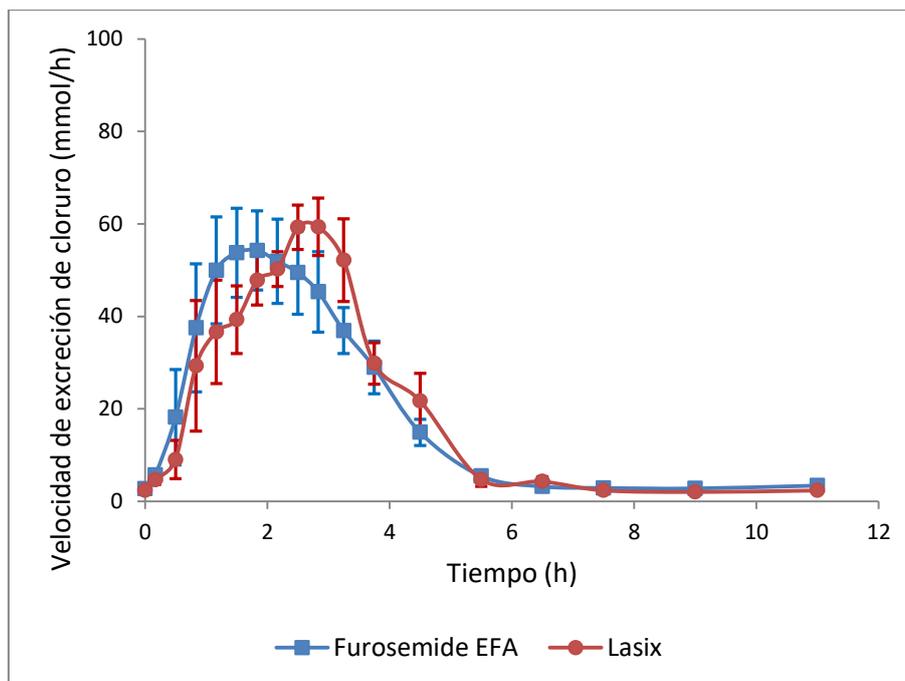


Figura 5.2.9. Perfil medio de velocidad de excreción de cloruro en función del tiempo para Test y Referencia en **MUJERES**

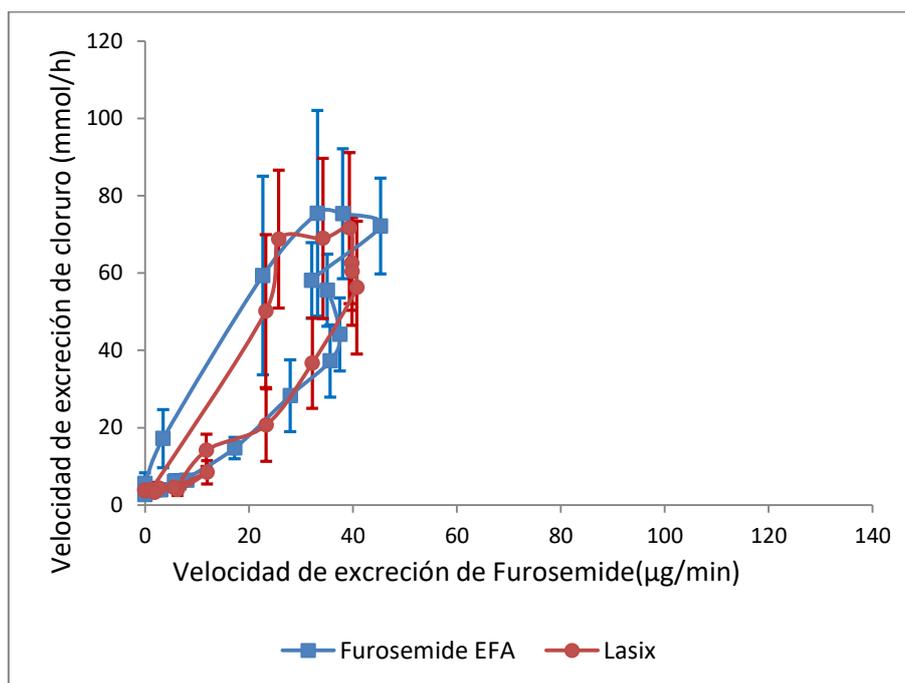


Figura 5.2.10. Perfil medio de velocidad de excreción de cloruro en función de velocidad de excreción de Furosemide para Test y Referencia en **HOMBRES**.

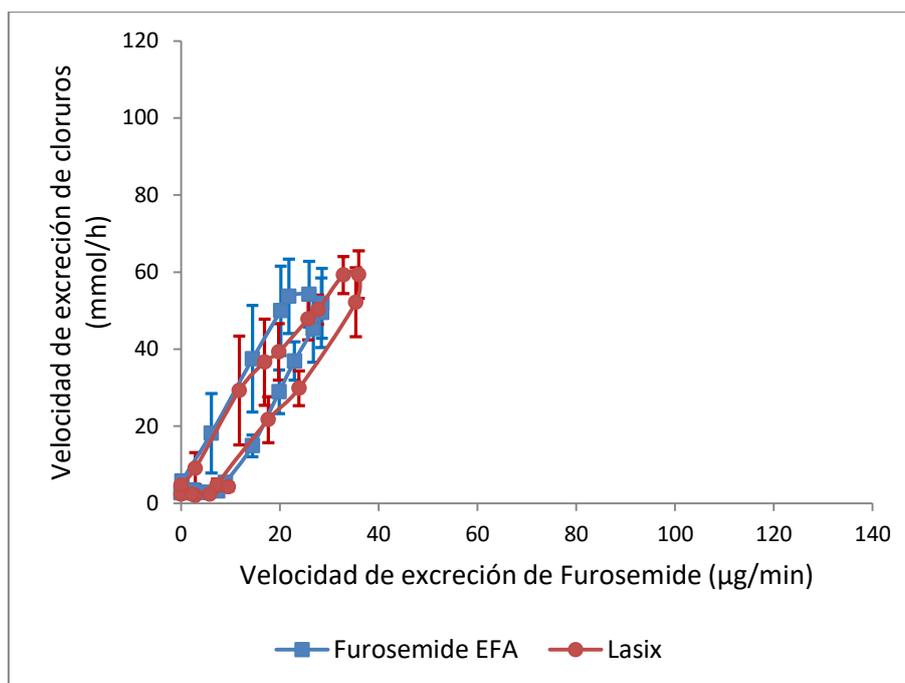


Figura 5.2.11 Perfil medio de velocidad de excreción de cloruro en función de velocidad de excreción de Furosemide para Test y Referencia en **MUJERES**

También se superpusieron los perfiles PK-vs-tiempo y PD-vs-tiempo para cada formulación y grupo de voluntarios (figuras 5.2.12 a 5.2.15). Se logra observar claramente que el perfil de efecto salurético se adelanta al perfil de excreción urinaria de Furosemide, dando origen así al fenómeno de histéresis en sentido horario observado en los gráficos 5.2.10 y 5.2.11.

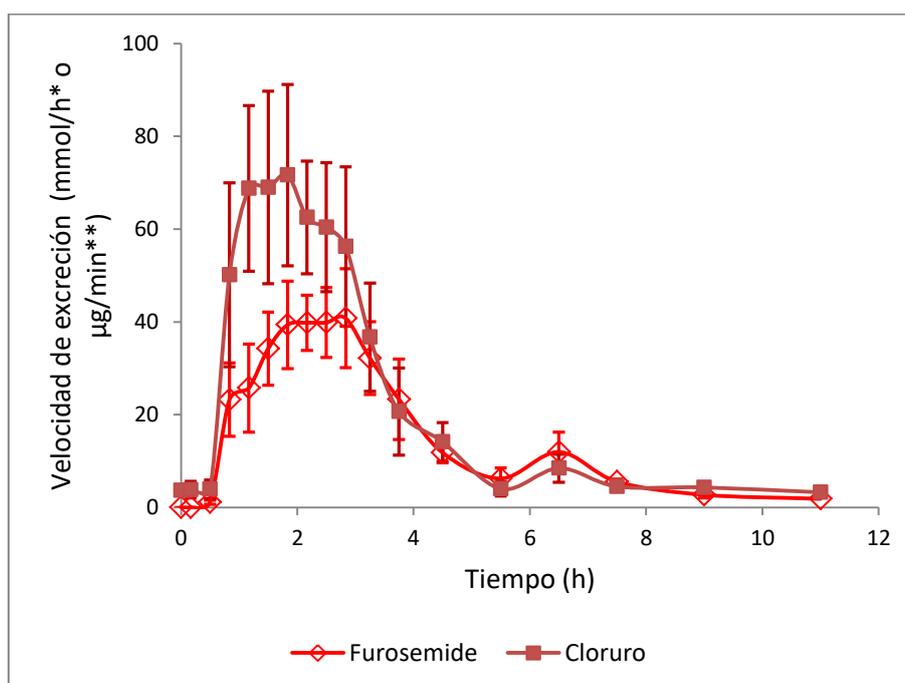


Figura 5.2.12 Perfil medio de velocidad de excreción de cloruro y furosemide en función del tiempo para **Lasix** en **Hombres**. *mmol/h para cloruros; **µg/min para furosemide.

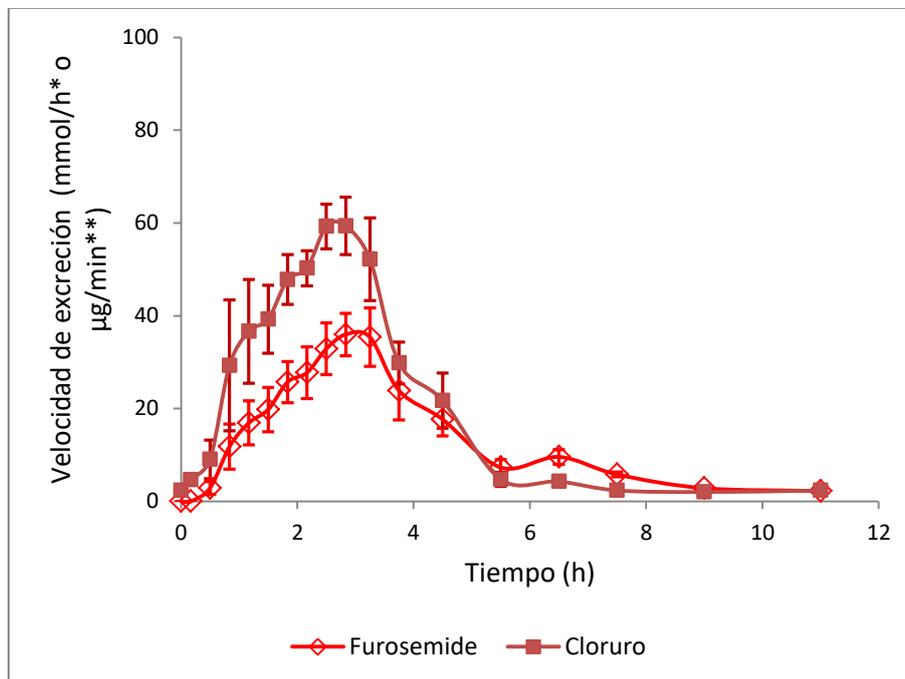


Figura 5.2.13 Perfil medio de velocidad de excreción de cloruro y furosemide en función del tiempo para **Lasix en Mujeres**. *mmol/h para cloruros; **µg/min para furosemide

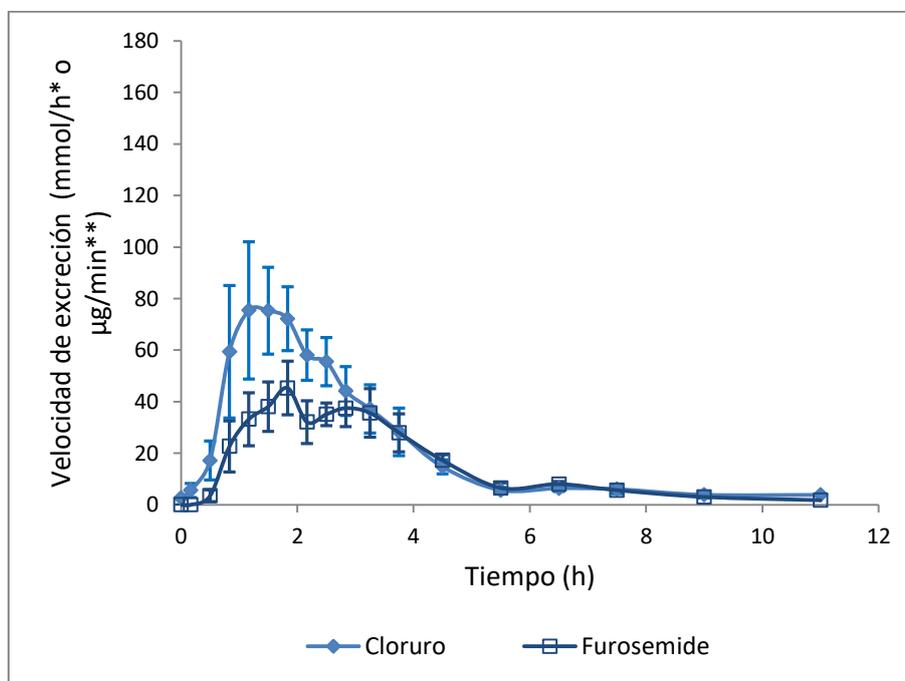


Figura 5.2.14 Perfil medio de velocidad de excreción de cloruro y furosemide en función del tiempo para **Furosemide EFA en Hombres**. *mmol/h para cloruros; **µg/min para furosemide.

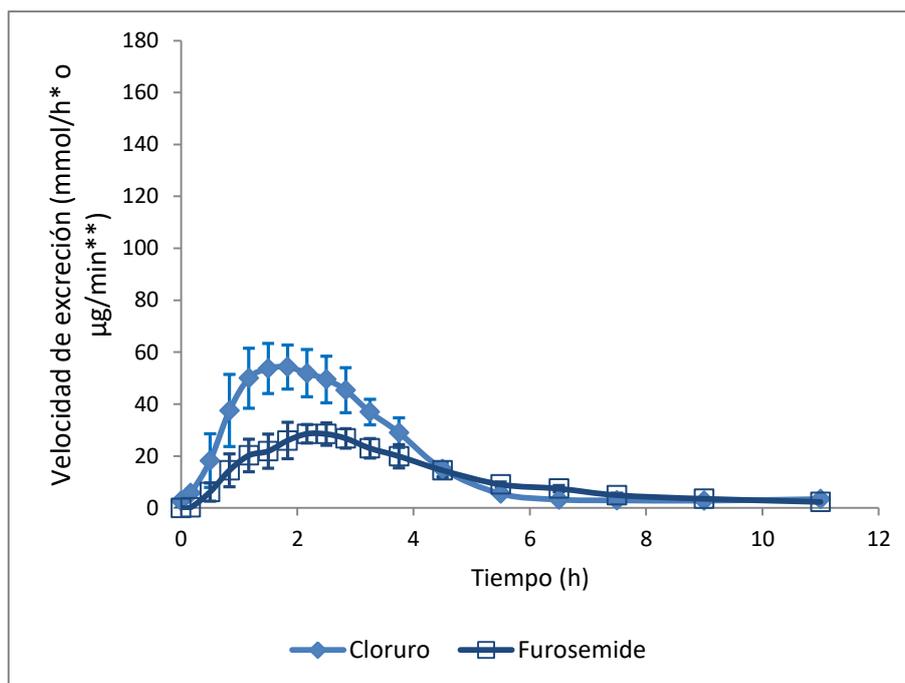


Figura 5.2.15 Perfil medio de velocidad de excreción de cloruro y furosemide en función del tiempo para Furosemide EFA en Mujeres. *mmol/h para cloruros; **µg/min para furosemide

ANOVA – Análisis estadístico de los resultados obtenidos:

En la tabla 5.2.7 se resumen los resultados para la totalidad de los sujetos, y separándolos por sexo.

ANOVA						
Parámetro	Test*	Referencia*	T/R	IC90%		CV _{res} (%)
Total						
U [∞] (µg)	8407	8638	0.973	0.879	1.083	12.88
dU/dt _{max} (µg/h)	2666	2887	0.923	0.713	1.196	31.87
T _{max} (h)	2.000	2.833	0.000	-2.417	1.583	4.000
Hombres						
U [∞] (µg)	9043	8428	1.073	0.774	1.487	15.89
dU/dt _{max} (µg/h)	2973	2864	1.038	0.739	1.485	16.56
T _{max} (h)	2.000	2.333	0.000	-1.000	1.583	2.583
Mujeres						
U [∞] (µg)	6854	7734	0.886	0.783	1.003	10.07
dU/dt _{max} (µg/h)	2479	2903	0.854	0.517	1.412	42.61
T _{max} (h)	2.333	3.042	0.000	-2.417	0.500	2.917

Tabla 5.2.7 Resumen de resultados de bioequivalencia entre comprimidos conteniendo Furosemide, tomando en cuenta el total de los individuos, y separando por sexo, cuando las formulaciones se administran con comidas. *Se informa la media geométrica de todos los parámetros, excepto para el T_{max}, del cual se informa la mediana. Para T_{max} se informa bajo la columna T/R la mediana de la diferencia T-R, bajo IC90% el rango entre el mínimo y máximo valor, y bajo CV_{res} la correspondiente amplitud del rango.

El IC90% para el parámetro $U[\infty]$ se encuentra dentro de las especificaciones de bioequivalencia únicamente cuando se analiza la totalidad de los individuos. Al realizar el análisis separando a los mismos según el sexo, ambos parámetros $U[\infty]$ y $(dU/dt)_{\max}$ presentan un IC90% que no se encuentra dentro de las especificaciones de bioequivalencia. Por esto, y a causa del bajo número de sujetos participantes, los resultados no permiten afirmar equivalencia de la velocidad de absorción y de biodisponibilidad en términos de cantidad entre las formulaciones ensayadas.

Se realizó una comparación por sexo de los parámetros farmacocinéticos $U[\infty]$ y dU/dt_{\max} . Para esto se llevó a cabo una prueba t de Student para ambas formulaciones juntas y por separado. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Comparación de parámetros Hombre vs Mujer			
Parámetro	Test	Referencia	Test + Referencia
dU/dt_{\max}	$p = 0,1469$	$p = 0,3208$	$p = 0,1651$
$U[\infty]$	$p = 0,0230$	$p = 0,1538$	$p = 0,0733$

Tabla 5.2.8 Comparación de parámetros farmacocinéticos a través de la prueba t de student.

A pesar de que no se puede concluir estadísticamente debido al bajo número de sujetos del subgrupo hombres, el parámetro $U[\infty]$ registra un $p < 0.05$ para la administración de la formulación Test. Esto refleja una diferencia apreciable de la cantidad recogida en orina entre hombres y mujeres para ésta formulación. A diferencia de lo observado en ayunas, la coadministración de comida tendió a reducir o eliminar la diferencia entre los sexos.

5.3. Comparación entre la administración bajo condiciones de ayuno y coprandial de comprimidos de liberación inmediata conteniendo Furosemide.

Se realizó una comparación estadística de los resultados obtenidos para ambos modos de administración del medicamento en estudio ensayados: bajo condiciones de ayuno y coprandial. Se utilizaron los datos de los 10 voluntarios que participaron en ambas fases del estudio. En un primer análisis estadístico mediante ANOVA se tomaron en cuenta las dos formulaciones en conjunto, donde virtualmente se duplica el número de voluntarios, ya que se juntan ambos periodos de administración para cada fase del ensayo. Los resultados se presentan en la tabla 5.3.1. En la misma se puede observar que la cantidad de furosemide excretada cuando el medicamento es administrado con comidas es menor que cuando se administra bajo condiciones de ayuno. Esto se puede ver en la relación AC/AA que presenta valores de 0.767 (0.685 – 0.859), 0.641 (0.543 – 0.771) y 0.874 (0.758 – 1.009) para el total de los individuos, para el grupo de los hombres y para el grupo de las mujeres respectivamente. Estos cocientes AC/AA con sus respectivos intervalos de confianza, muestran que la mayor diferencia en la cantidad excretada de Furosemide entre ambos modos de administración se observa para el grupo de los hombres. Este hecho coincide con lo esperado, ya que con la presencia de comida en el tracto gastrointestinal, las condiciones de pH así como la

velocidad de vaciado gástrico cambiarían más drásticamente en hombres que en mujeres, ya que estas últimas en condiciones de ayuno ya presentan una menor velocidad de vaciado gástrico y mayor pH gastrointestinal que los hombres. Lo mismo se observa cuando se analiza el parámetro Velocidad de excreción máxima (dU/dt_{\max}), donde las relaciones AC/AA para el total de los individuos, para el grupo de los hombres y para el grupo de las mujeres son 0.552 (0.459 – 0.664), 0.417 (0.335 – 0.519) y 0.666 (0.514 – 0.861) respectivamente. A su vez, también se observa un retraso en el tiempo al que se alcanza dicha velocidad máxima de excreción, obteniéndose mayores valores de T_{\max} cuando las formulaciones son administradas con comidas respecto a cuándo se administran bajo condiciones de ayuno, lo cual puede observarse claramente en la tabla 5.3.1.

Parámetro	ANOVA					CV _{res} (%)
	AC*	AA*	AC/AA	IC90%		
Total						
U [∞] (μg)	8497	11075	0.767	0.686	0.859	20.73
dU/dt_{\max} ($\mu\text{g/h}$)	2774	5026	0.552	0.459	0.664	34.69
T_{\max} (h)	2.667	1.167	1.667	-0.333	2.417	2.750
Hombres						
U [∞] (μg)	8810	13737	0.641	0.534	0.771	19.08
dU/dt_{\max} ($\mu\text{g/h}$)	2918	7000	0.417	0.335	0.519	22.87
T_{\max} (h)	2.167	1.167	1.167	-0.333	2.250	2.583
Mujeres						
U [∞] (μg)	7129	8153	0.874	0.758	1.009	19.54
dU/dt_{\max} ($\mu\text{g/h}$)	2682	4029	0.666	0.514	0.861	35.92
T_{\max} (h)	2.833	1.167	1.708	0.000	2.417	2.417

Tabla 5.3.1. Resumen de resultados de bioequivalencia entre comprimidos conteniendo Furosemide cuando los mismos son administrados con comida (AC) vs cuando se administran bajo condiciones de ayuno (AA) tomando en cuenta el total de los individuos, y separando por sexo. Los resultados toman en cuenta la administración de ambas formulaciones **Lasix + Furosemide EFA**. *Se informa la media geométrica de todos los parámetros, excepto para el T_{\max} , del cual se informa la mediana. Para T_{\max} se informa bajo la columna T/R la mediana de la diferencia T-R, bajo IC90% el rango entre el mínimo y máximo valor, y bajo CV_{res} la correspondiente amplitud del rango

A modo de evaluar cómo afecta el modo de administración a cada formulación, se realizó comparación estadística entre la administración bajo condiciones de ayuno y con comidas para Lasix y Furosemide EFA por separado, resultados presentados en las tablas 5.3.2 y 5.3.3 respectivamente. Se observa que la relación AC/AA para los parámetros farmacocinéticos $U[\infty]$ y dU/dt_{\max} presentan una alta variabilidad, lo cual seguramente esté dado entre otras cosas por el pequeño número de individuos utilizados para realizar el análisis estadístico. Por lo tanto, como se mencionó previamente en este capítulo, no se realizan conclusiones estadísticas, sino simplemente un análisis de tendencias de los resultados obtenidos.

Tomando en cuenta el total de los individuos, se observa una disminución en la cantidad excretada a tiempo infinito de Furosemide cuando se administran ambas formulaciones con comidas respecto a la administración bajo condiciones de ayuno, lo cual se observa en el parámetro $U[\infty]$. Al realizar el mismo análisis pero para hombres y mujeres por separado, en el caso de las mujeres no se observa una disminución en este parámetro para la formulación Lasix, siendo el cociente $AC / AA = 1.005$ (0.772 – 1.308). Estos resultados se observan en la tabla 5.3.2. Sin embargo, sí se observa una disminución en la cantidad de Furosemide excretada a tiempo infinito para la formulación Furosemide EFA, para la administración con comidas respecto a ayunas, siendo el cociente $AC / AU = 0.761$ (0.648 – 0.893), resultados presentados en la tabla 5.3.3. Para el grupo de los hombres, sí se observa una notoria disminución en este parámetro para ambas formulaciones, presentando cocientes $AC / AA = 0.621$ (0.361 – 1.066) y 0.761 (0.648 – 0.893) para las formulaciones Lasix y Furosemide EFA respectivamente.

Analizando el parámetro dU/dt_{max} , si tomamos en cuenta el total de los individuos, se observa una disminución en dicho parámetro para ambas formulaciones. Cuando separamos el análisis por grupos según el sexo de los individuos, en el grupo de los hombres se observa una gran disminución en este parámetro cuando ambas formulaciones se administran con comidas respecto a su administración en ayunas, siendo los cocientes $AC/AA = 0.381$ (0.217 – 0.669) y 0.456 (0.344 – 0.605) para Lasix y Furosemide EFA respectivamente. Sin embargo, estas diferencias no se ven tan acentuadas en el grupo de las mujeres. Se observa que para este grupo, la disminución en el parámetro dU/dt_{max} es más fuerte para la formulación Furosemide EFA que para la formulación de referencia Lasix.

Las diferencias observadas para el grupo de las mujeres entre ambas formulaciones, podría deberse a la tecnología de fabricación de las mismas. Como se menciona en capítulos anteriores, al realizar ensayos de desintegración resultó que la formulación Lasix se desintegra rápidamente, mientras que Furosemide EFA lo hace más lentamente. De este modo, es posible que en condiciones de administración con comidas, la formulación Test presente un retraso mayor que Lasix en su pasaje hacia el sitio de absorción, lo cual traería aparejado una disminución en la velocidad de excreción de Furosemide, así como en la cantidad de fármaco excretada.

En el caso de los hombres tras la administración coprandial de Furosemide, independientemente de la formulación que se trate, la disminución en la cantidad de fármaco excretado a tiempo infinito en orina, así como en la máxima velocidad de excreción alcanzada, y el prolongamiento del tiempo de absorción y de T_{max} , pueden considerarse consecuencia de un elevado tiempo de vaciado gástrico, respecto al que este grupo presenta en condiciones de ayuno.

Parámetro	ANOVA					CV _{res} (%)
	AC*	AA*	AC/AA	IC90%		
Total						
U [[∞]] (μg)	8653	10654	0.812	0.649	1.016	27.42
dU/dt _{max} (μg/h)	2887	4800	0.601	0.428	0.844	42.54
T _{max} (h)	2.833	1.167	1.667	-0.333	2.417	2.750
Hombres						
U [[∞]] (μg)	8584	13834	0.621	0.361	1.066	26.65
dU/dt _{max} (μg/h)	2864	7521	0.381	0.217	0.669	27.79
T _{max} (h)	2.333	1.000	1.667	-0.333	1.667	2.000
Mujeres						
U [[∞]] (μg)	7696	7657	1.005	0.772	1.308	21.64
dU/dt _{max} (μg/h)	2903	3558	0.816	0.537	1.238	34.90
T _{max} (h)	3.042	1.167	1.750	0.333	2.417	2.084

Tabla 5.3.2. Resumen de resultados de bioequivalencia entre comprimidos conteniendo Furosemide cuando los mismos son administrados con comida (AC) vs cuando se administran bajo condiciones de ayuno (AA) tomando en cuenta el total de los individuos, y separando por sexo. Los resultados toman en cuenta la administración de la formulación **Lasix**. *Se informa la media geométrica de todos los parámetros, excepto para el T_{max}, del cual se informa la mediana. Para T_{max} se informa bajo la columna T/R la mediana de la diferencia T-R, bajo IC90% el rango entre el mínimo y máximo valor, y bajo CV_{res} la correspondiente amplitud del rango.

Parámetro	ANOVA					CV _{res} (%)
	AC*	AA*	AC/AA	IC90%		
Total						
U [[∞]] (μg)	8343	11512	0.725	0.648	0.811	13.54
dU/dt _{max} (μg/h)	2666	5262	0.507	0.403	0.637	28.15
T _{max} (h)	2.000	1.167	0.833	0.000	2.250	2.250
Hombres						
U [[∞]] (μg)	9043	13642	0.663	0.452	0.972	18.68
dU/dt _{max} (μg/h)	2973	6515	0.456	0.344	0.605	13.73
T _{max} (h)	2.000	1.333	0.500	0.000	2.250	2.250
Mujeres						
U [[∞]] (μg)	6605	8682	0.761	0.648	0.893	13.06
dU/dt _{max} (μg/h)	2479	4563	0.543	0.351	0.841	36.71
T _{max} (h)	2.333	1.000	1.167	0.000	2.250	2.250

Tabla 5.3.3. Resumen de resultados de bioequivalencia entre comprimidos conteniendo Furosemide cuando los mismos son administrados con comida (AC) vs cuando se administran bajo condiciones de ayuno (AA) tomando en cuenta el total de los individuos, y separando por sexo. Los resultados toman en cuenta la administración de la formulación **Furosemide EFA**. *Se informa la media geométrica de todos los parámetros, excepto para el T_{max}, del cual se informa la mediana. Para T_{max} se informa bajo la columna T/R la mediana de la diferencia T-R, bajo IC90% el rango entre el mínimo y máximo valor, y bajo CV_{res} la correspondiente amplitud del rango.

Los resultados mencionados previamente, pueden observarse en los gráficos que comparan los perfiles de velocidad de absorción de Furosemide en función del tiempo, para cada grupo: Lasix/hombres, Lasix/mujeres, Furosemide EFA/hombres y Furosemide EFA/mujeres, correspondientes a las figuras 5.3.1, 5.3.2, 5.3.3 y 5.3.4, respectivamente.

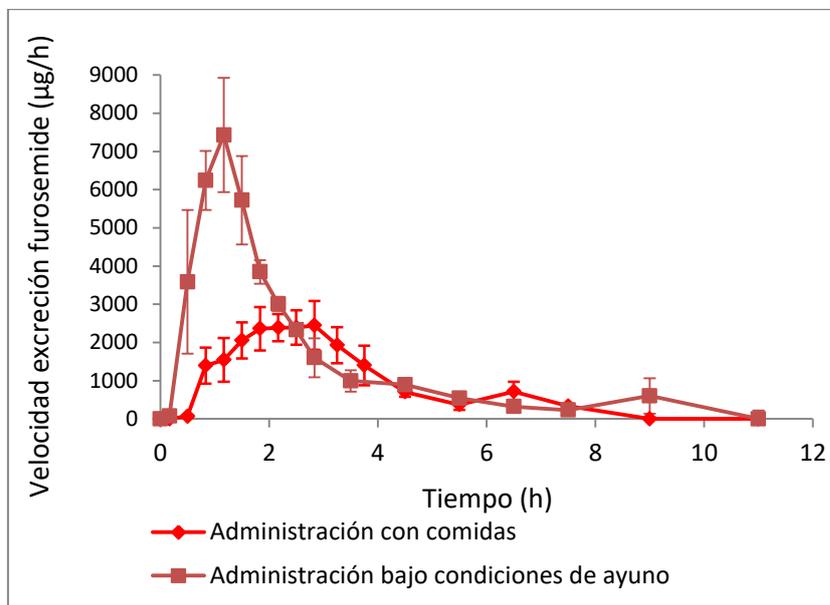


Figura 5.3.1 Representación gráfica de las velocidades de excreción urinaria de Furosemide en función del tiempo para la formulación **Lasix** en el grupo de los **hombres**, comparando los perfiles obtenidos para los dos modos de administración ensayados: con comidas y en ayunas.

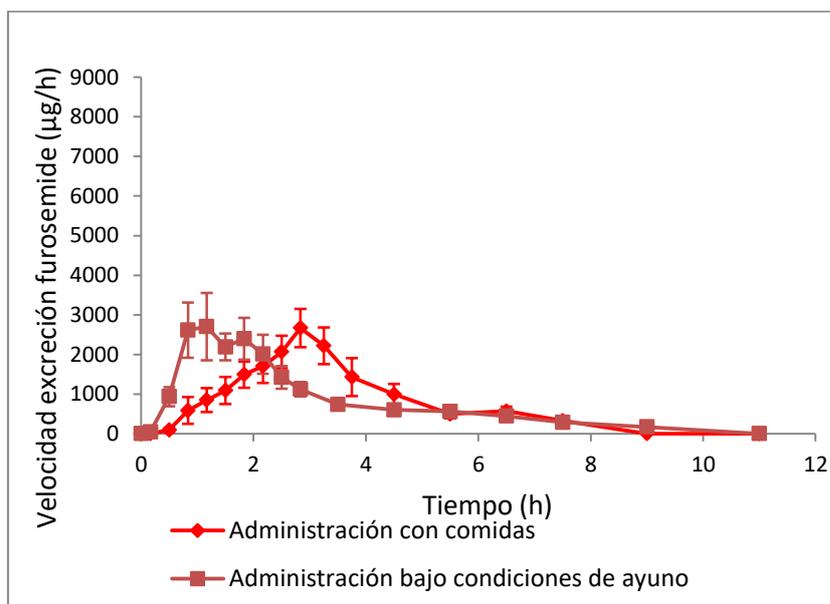


Figura 5.3.2. Representación gráfica de las velocidades de excreción urinaria de Furosemide en función del tiempo para la formulación **Lasix** en el grupo de las **mujeres**, comparando los perfiles obtenidos para los dos modos de administración ensayados: con comidas y en ayunas.

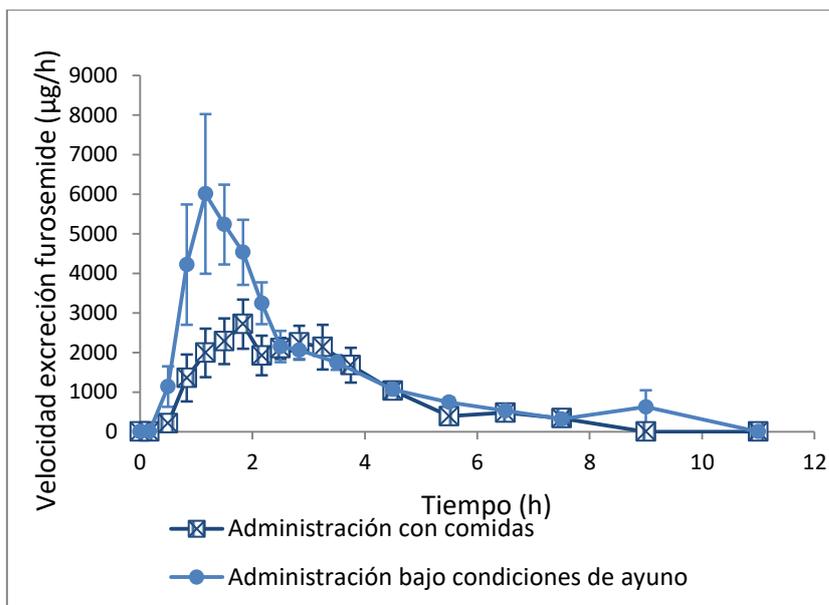


Figura 5.3.3. Representación gráfica de las velocidades de excreción urinaria de Furosemide en función del tiempo para la formulación **Furosemide EFA** en el grupo de los **hombres**, comparando los perfiles obtenidos para los dos modos de administración ensayados: con comidas y en ayunas.

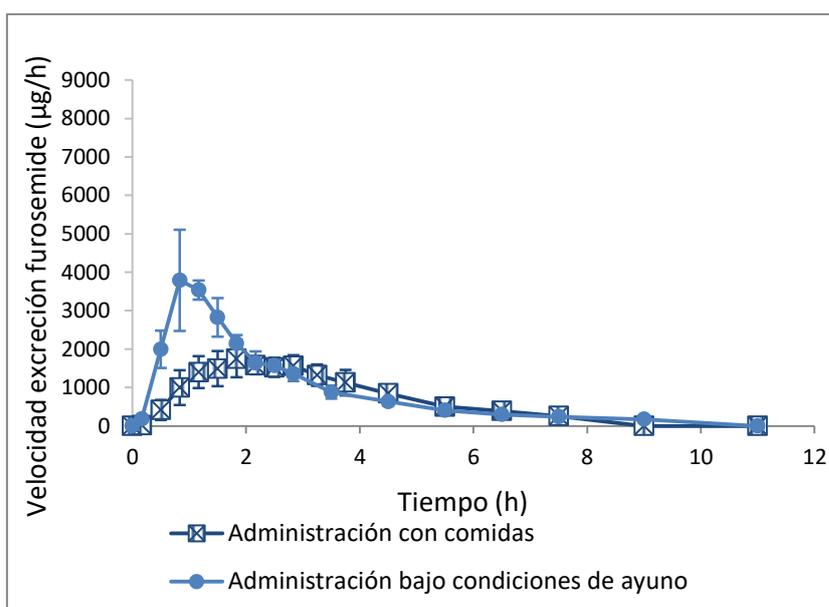


Figura 5.3.4. Representación gráfica de las velocidades de excreción urinaria de Furosemide en función del tiempo para la formulación **Furosemide EFA** en el grupo de las **mujeres**, comparando los perfiles obtenidos para los dos modos de administración ensayados: con comidas y en ayunas.

5.4. Conclusiones

- No es posible afirmar bioequivalencia entre las formulaciones ensayadas dado el bajo número de sujetos que participaron de esta fase del estudio y la mayor variabilidad observada.

- Se puede prever un escenario de bioequivalencia entre las formulaciones Lasix y Furosemide EFA, si se toma en cuenta el total de los individuos, no así para el grupo de las mujeres cuando se realiza el análisis por sexo. Para este grupo, ambos parámetros indican que la formulación Furosemide EFA presentaría una menor velocidad y extensión de absorción que la formulación Lasix. Esto vendría dado por una prolongación del tiempo de vaciado gástrico.
- Existen diferencias apreciables en la cantidad de absorción de furosemide entre hombres y mujeres para la formulación Furosemide EFA, ya que al realizar la prueba t de student para el parámetro $U[\infty]$ comparando los resultados obtenidos para ambos subgrupos, se obtuvo un valor de $p < 0.05$, pero este no califica como significativo ya que el número de individuos es insuficiente para concluir. Estos resultados pueden deberse a la persistencia de diferencias en el pH intestinal entre hombres y mujeres bajo condiciones de administración coprandial. Esto se traduce en que ambos grupos presentarían diferentes ventanas de absorción inclusive bajo condiciones de administración coprandial. Sin embargo, estas diferencias afectarían únicamente a la formulación Test.
- Al comparar los modos de administración ensayados, se observa una disminución en la cantidad de Furosemide excretada a tiempo infinito y en la velocidad máxima de excreción en ambos sexos cuando la administración se hace con comidas, siendo más intensa la reducción en hombres. Sin embargo, en el caso de Lasix no se observó una disminución en la cantidad de Furosemide excretada a tiempo infinito para el grupo de las mujeres cuando el medicamento se administró coprandialmente.

Capítulo 6: Relación farmacocinética /farmacodinamia (PK/PD) para Furosemide.

6.1. Metodología

Se analizó la distribución estadística de los parámetros farmacodinámicos dU/dt_{max} y $U[12h]$ para el electrolito Cloruro. Como se menciona en capítulos anteriores, este es el compuesto seleccionado para medir la farmacodinamia en este estudio. Dado que la distribución resultó ser normal al igual que para Furosemide, se realizó posteriormente un análisis de la varianza (ANOVA), como se describe en el capítulo 3 punto 3.3.1. De igual modo, para evaluar T_{max} se utilizó el test no paramétrico de Wilcoxon. Una vez realizado este, se comparan los resultados obtenidos de esta manera con los correspondientes al análisis realizado para Furosemide. De esta manera se evaluó la capacidad de determinar bioequivalencia a partir del analito cloruro, producto de la farmacodinamia de Furosemide.

También se compararon los perfiles de velocidad de excreción de Cloruros y Furosemide en función del tiempo para ambos modos de administración ensayados, para el total de individuos participantes y separando los mismos por sexo.

Se analizó la relación PK/PD a través de los gráficos de velocidad de excreción de cloruros en función de la velocidad de excreción de Furosemide.

6.2 Resultados y discusión

6.2.1 Comparación Furosemide vs Cloruros en los juicios de bioequivalencia para las administraciones bajo condiciones de ayuno y con comidas.

En las tablas 6.2.1.1 y 6.2.1.2 se informan los resultados de ANOVA y T-Wilcoxon para el analito Cloruro, cuando Lasix y Furosemide EFA se administran bajo condiciones de ayuno y con comidas, respectivamente.

ANOVA – Administración en ayuno

Parámetro	Test*	Referencia*	T/R	IC90%		CV _{res} (%)
Total						
U [12h] (µg)	208.2	212.3	0.981	0.895	1.075	12.44
dU/dt _{max} (µg/h)	114.9	126.5	0.908	0.782	1.054	20.35
T _{max} (h)	1.167	0.833	0.000	-0.333	1.000	1.333
Hombres						
U [12h] (µg)	197.0	254.7	0.773	0.649	0.922	8.500
dU/dt _{max} (µg/h)	109.8	154.4	0.711	0.458	1.102	21.48
T _{max} (h)	1.333	1.000	0.500	-0.333	1.000	1.333
Mujeres						
U [12h] (µg)	192.2	172.3	1.116	1.054	1.180	5.810
dU/dt _{max} (µg/h)	117.5	114.6	1.026	0.910	1.156	12.34
T _{max} (h)	1.000	0.833	0.000	-0.333	-0.667	0.337

Tabla 6.2.1.1. Resumen de resultados de bioequivalencia bajo condiciones de ayuno entre comprimidos conteniendo Furosemide, utilizando Cloruro como analito. Se informan los resultados para el total de los individuos, y separando por sexo. *Se informa la media geométrica de todos los parámetros, excepto para el T_{max}, del cual se informa la mediana. Para T_{max} se informa bajo la columna T/R la mediana de la diferencia T-R, bajo IC90% el rango entre el mínimo y el máximo valor de T-R, y bajo CV_{res} la correspondiente amplitud del rango.

ANOVA – Administración con comidas

Parámetro	Test*	Referencia*	T/R	IC90%		CV _{res} (%)
Total						
U [12h] (µg)	196.5	192.1	1.023	0.907	1.153	14.52
dU/dt _{max} (µg/h)	76.82	84.01	0.914	0.752	1.112	23.82
T _{max} (h)	1.667	2.333	0.000	-1.333	0.500	1.833
Hombres						
U [12h] (µg)	195.6	177.0	1.105	0.858	1.423	12.30
dU/dt _{max} (µg/h)	85.86	87.74	0.978	0.682	1.404	17.61
T _{max} (h)	1.500	1.833	-0.167	-0.667	0.333	1.000
Mujeres						
U [12h] (µg)	158.8	167.6	0.948	0.757	1.187	18.45
dU/dt _{max} (µg/h)	71.33	81.61	0.874	0.609	1.255	30.05
T _{max} (h)	2.167	2.667	0.167	-1.333	0.500	1.833

Tabla 6.2.1.2. Resumen de resultados de bioequivalencia para administración coprandial entre comprimidos conteniendo Furosemide, utilizando Cloruro como analito. Se informan los resultados para el total de los individuos, y separando por sexo. *Se informa la media geométrica de todos los parámetros, excepto para el T_{max}, del cual se informa la mediana. Para T_{max} se informa bajo la columna T/R la mediana de la diferencia T-R, bajo IC90% el rango entre el mínimo y el máximo valor de T-R, y bajo CV_{res} la correspondiente amplitud del rango.

Comparando estos resultados con los obtenidos para el analito Furosemide (ver tablas 3.2.7 y 5.2.7 para los ensayos en ayunas y con comidas respectivamente), se observa

que se podría realizar el análisis estadístico para evaluar bioequivalencia entre dos formulaciones conteniendo Furosemide, ya que los valores T/R así como los IC90% obtenidos para los parámetros evaluados son muy similares entre sí, tanto para el fármaco como para su consecuencia farmacodinámica (velocidad de excreción de cloruro). De esta manera, si se realizaran los análisis utilizando Cloruro como analito, el tiempo de análisis se disminuiría muchísimo, y disminuiría la posibilidad de errores en el análisis químico ya que la muestra no precisa ningún procesamiento previo, más que el almacenamiento bajo condiciones adecuadas.

Al igual que para Furosemide, se analizó la comparación por sexo de los parámetros $U[12h]$ y dU/dt_{max} a través de una prueba t de Student para ambas formulaciones, juntas y por separado, para los dos modos de administración de los medicamentos ensayados. Dichos resultados se muestran en las tablas 6.2.1.3 y 6.2.1.4 para la administración bajo condiciones de ayuno y con comidas, respectivamente.

Comparación de parámetros Hombre vs Mujer - AA			
Parámetro	Test	Referencia	Test + Referencia
dU/dt_{max}	p = 0.2661	p = 0.0069	p = 0.0372
U [12h]	p = 0.0819	p = 0.0204	p = 0.0455

Tabla 6.2.1.3. Comparación de parámetros farmacocinéticos a través de la prueba t de student, utilizando como analito el Cloruro excretado en orina tras la administración de comprimidos conteniendo Furosemide en condiciones de ayuno.

Comparación de parámetros Hombre vs Mujer - AC			
Parámetro	Test	Referencia	Test + Referencia
dU/dt_{max}	p = 0.1608	p = 0.1220	p = 0.1225
U [12h]	p = 0.0323	p = 0.2788	p = 0.1703

Tabla 6.2.1.4. Comparación de parámetros farmacocinéticos a través de la prueba t de student, utilizando como analito el Cloruro excretado en orina tras la administración de comprimidos conteniendo Furosemide con comida.

Como se menciona en capítulos anteriores, no es posible sacar conclusiones estadísticas dado el bajo número de sujetos implicados en el estudio. A pesar de esto, se observa que para la formulación Lasix, cuando se administra bajo condiciones de ayuno, el análisis estadístico realizado a partir de los resultados obtenidos de velocidad de excreción de cloruros el valor de $p < 0.05$, refleja una diferencia apreciable en los parámetros $U[12h]$ y dU/dt_{max} . Estos resultados coinciden con los obtenidos a partir del análisis de velocidad de excreción de Furosemide (ver tabla 3.2.8). Por otro lado, esto no se observó para la formulación Furosemide EFA, ya que los p-valores para ambos parámetros resultaron > 0.05 . Quizás esto esté reflejando una intensidad diurética tan importante cuando el Test acaba absorbiéndose en ambos sexos que llega al tope de la curva concentración-efecto y por tanto aun cuando exista diferencia de biodisponibilidad entre hombre y mujer, esto no logre apreciarse en sus intensidades de efecto.

Cuando se realiza la misma comparación pero para la administración de los medicamentos con comidas, los resultados obtenidos coinciden plenamente con aquellos desprendidos del análisis de velocidad de excreción de Furosemide (ver tabla 5.2.8).

6.2.2 Comparación coprandial vs. ayuno a través del análisis de velocidad de excreción de cloruros.

Al igual que en el capítulo 5, se realizó una comparación estadística de los resultados obtenidos para los dos modos de administración de comprimidos de Furosemide: bajo condiciones de ayuno y con comidas, pero en este caso, utilizando el Cloruro como analito. Se realiza del modo en que se describe en la sección 5.3 de esta tesis.

Comparando los resultados con los obtenidos a partir de la velocidad de excreción de Furosemide, se observa que el cociente AC/AA aumenta junto con el intervalo de confianza. Para el parámetro $U[t]$ en los tres casos analizados (Lasix y Furosemide EFA juntos; Lasix y Furosemide EFA por separado) el valor de este cociente se acerca más a la unidad (tablas 6.2.2.1, 6.2.2.2 y 6.2.2.3 respectivamente) que cuando se realiza a partir de los datos de velocidad de excreción de Furosemide (ver tablas 5.3.1, 5.3.2 y 5.3.3). Quizás esto ponga de manifiesto la contribución que tuvo el aporte de iones tras la concomitante ingesta de comida, haciendo falsear la excreción fruto de la actividad farmacodinámica de Furosemide. Esto implicaría que al realizar una comparación estadística entre dos modos de administración de medicamentos conteniendo este fármaco (con comidas y en ayunas), al medir velocidad de excreción urinaria de Cloruro y contando con un número suficiente de individuos, podría suceder que ambos modos de administración resulten ser equivalentes en cuanto a la cantidad de fármaco absorbido, cuando en realidad no lo serían. Sin embargo, para el caso del parámetro dU/dt_{max} si bien se observa un aumento en el cociente AC/AA para el mismo así como en su intervalo de confianza, probablemente la mencionada contribución de iones proporcionada por la comida no sea suficiente como para ocultar la inequivalente velocidad de absorción de Furosemide originada por los dos modos de administración.

Parámetro	ANOVA					CV _{res} (%)
	AC*	AA*	AC/AA	IC90%		
Total						
U [12h] (µg)	194.3	201.2	0.965	0.855	1.091	22.51
dU/dt _{max} (µg/h)	80.33	119.8	0.670	0.610	0.736	17.20
T _{max} (h)	2.167	1.000	1.000	-0.333	2.583	2.916
Hombres						
U [12h] (µg)	186.1	224.0	0.831	0.673	1.026	21.94
dU/dt _{max} (µg/h)	86.80	130.2	0.667	0.551	0.806	19.76
T _{max} (h)	1.667	1.667	0.333	-0.333	1.667	2.000
Mujeres						
U [12h] (µg)	163.2	163.1	1.000	0.841	1.190	23.79
dU/dt _{max} (µg/h)	76.30	113.4	0.673	0.595	0.761	16.78
T _{max} (h)	2.667	0.833	1.667	0.000	2.583	2.583

Tabla 6.2.2.1. Resumen de resultados de bioequivalencia entre comprimidos conteniendo Furosemide cuando los mismos son administrados con comida (AC) vs cuando se administran bajo condiciones de ayuno (AA) utilizando Cloruro como analito, tomando en cuenta el total de los individuos, y separando por sexo. Los resultados toman en cuenta la administración de ambas formulaciones: **Furosemide EFA + Lasix**. *Se informa la media geométrica de todos los parámetros, excepto para el T_{max}, del cual se informa la mediana. Para T_{max} se informa bajo la columna T/R la mediana de la diferencia T-R, bajo IC90% el rango entre el mínimo y máximo valor, y bajo CV_{res} la correspondiente amplitud del rango.

Parámetro	ANOVA					CV _{res} (%)
	AC*	AA*	AC/AA	IC90%		
Total						
U [12h] (µg)	192.1	203.7	0.943	0.778	1.143	23.46
dU/dt _{max} (µg/h)	84.01	126.7	0.663	0.592	0.742	13.66
T _{max} (h)	2.333	0.833	1.667	-0.333	2.000	2.333
Hombres						
U [12h] (µg)	177.0	254.7	0.695	0.455	1.061	20.72
dU/dt _{max} (µg/h)	87.74	154.4	0.568	0.463	0.697	9.940
T _{max} (h)	1.833	1.000	1.000	-0.333	1.667	2.000
Mujeres						
U [12h] (µg)	167.6	152.1	1.102	0.878	1.384	18.65
dU/dt _{max} (µg/h)	81.61	111.1	0.735	0.645	0.836	10.56
T _{max} (h)	2.667	0.833	1.708	0.000	2.000	2.000

Tabla 6.2.2.2. Resumen de resultados de bioequivalencia entre comprimidos conteniendo Furosemide cuando los mismos son administrados con comida (AC) vs cuando se administran bajo condiciones de ayuno (AA) utilizando Cloruro como analito, tomando en cuenta el total de los individuos, y separando por sexo. Los resultados toman en cuenta la administración de la formulación **Lasix**. *Se informa la media geométrica de todos los parámetros, excepto para el T_{max}, del cual se informa la mediana. Para T_{max} se informa bajo la columna T/R la mediana de la diferencia T-R, bajo IC90% el rango entre el mínimo y máximo valor, y bajo CV_{res} la correspondiente amplitud del rango.

Parámetro	ANOVA					CV _{res} (%)
	AC*	AA*	AC/AA	IC90%		
Total						
U [12h] (µg)	196.5	198.8	0.988	0.812	1.202	23.90
dU/dt _{max} (µg/h)	76.82	113.3	0.678	0.566	0.811	21.86
T _{max} (h)	1.667	1.167	0.500	-0.333	2.583	2.916
Hombres						
U [12h] (µg)	195.6	197.0	0.993	0.700	1.408	17.03
dU/dt _{max} (µg/h)	85.86	109.8	0.782	0.488	1.254	23.17
T _{max} (h)	1.500	1.333	0.167	-0.333	1.000	1.333
Mujeres						
U [12h] (µg)	158.8	174.9	0.908	0.630	1.309	30.34
dU/dt _{max} (µg/h)	71.33	115.8	0.616	0.472	0.804	21.85
T _{max} (h)	2.167	1.000	1.167	0.000	2.583	2.583

Tabla 6.2.2.3. Resumen de resultados de bioequivalencia entre comprimidos conteniendo Furosemide cuando los mismos son administrados con comida (AC) vs cuando se administran bajo condiciones de ayuno (AA) utilizando Cloruro como analito, tomando en cuenta el total de los individuos, y separando por sexo. Los resultados toman en cuenta la administración de la formulación **Furosemide EFA**. *Se informa la media geométrica de todos los parámetros, excepto para el T_{max}, del cual se informa la mediana. Para T_{max} se informa bajo la columna T/R la mediana de la diferencia T-R, bajo IC90% el rango entre el mínimo y máximo valor, y bajo CV_{res} la correspondiente amplitud del rango.

6.2.3. Análisis de la relación PK / PD para Furosemide.

El efecto diurético / salurético de la furosemide es consecuencia de su concentración en los sitios de acción dentro del asa ascendente del asa de Henle ^[27]. El flujo sanguíneo arterial lleva el fármaco hacia los riñones. Una fracción de la masa de furosemide que difundió hacia el parénquima renal, se filtró a través de la membrana glomerular. La otra fracción ingresó a las células del tubo proximal, las células de la rama ascendente del asa de Henle que contienen los sitios de acción saluréticos, y a otras células de la nefrona. Una porción de ambas cantidades vuelve hacia la sangre venosa mientras que la porción complementaria termina siendo excretada y metabolizada en el riñón. La sangre venosa colecta así la concentración de droga que estaría presente en el espacio intersticial del tejido renal, o sea la que existía en el lumen de los túbulos renales antes de que se iniciara el correspondiente ciclo circulatorio.

Analizando el proceso de absorción, la concentración plasmática de Furosemide en sangre venosa proveniente del riñón presentaría un valor menor que la concentración arterial que llega a dicho órgano. Progresivamente se dará una disminución en la diferencia de concentraciones arteria-vena a medida que avance el proceso de absorción, hasta que finalice el ingreso del fármaco; luego de esto, solamente tendrá lugar la disposición del mismo. Cada vez que se reanude el proceso de absorción de Furosemide, un nuevo incremento de la relación arteria/vena tendría lugar.

De este modo, la Furosemide ejercería su efecto farmacológico antes de que pueda ser excretada, dado que su llegada al sitio de acción desde los capilares toma menos tiempo que su arribo al final del lumen de los túbulos renales del glomérulo. Esta sería la razón por la cual se observa en el gráfico que relaciona la velocidad de excreción urinaria de cloruro con la velocidad de excreción urinaria de Furosemide, una histéresis de sentido horario, lo cual implica que a tiempos posteriores, una misma concentración de fármaco genera un menor efecto farmacológico que a un tiempo anterior. Este hecho, tradicionalmente ha sido interpretado como una tolerancia aguda tras una administración única por vía oral o perfusión intravenosa de Furosemide ^[29-34], mientras que este fenómeno no se observa tras administración IV bolo. Este hecho revela la existencia de un retraso en la aparición del fármaco en sangre venosa respecto al sitio de acción, probablemente debido a una rápida difusión tisular del fármaco comparado con su retorno hacia la circulación venosa de la gran circulación.

En la bibliografía consultada ^[29-31], cuando se administraron formulaciones orales, la liberación del fármaco desde la forma farmacéutica fue lo suficientemente lenta como para que se observara la secuencia de aparición del fármaco en arteria-biofase-vena. Por lo tanto, cuanto mayor sea el tiempo de absorción, mayor será la histéresis de sentido horario en la relación de velocidades de excreción urinaria cloruro versus excreción urinaria de Furosemide.

Los resultados que se obtuvieron en los estudios realizados para esta tesis, muestran claramente una diferencia en el tiempo de absorción de Furosemide entre sexos, como se explicó en capítulos anteriores. Como se puede observar en la figura 6.2.3.1, los hombres presentaron una histéresis más pronunciada tras la administración de la formulación Referencia que tras la administración de la formulación Test, bajo condiciones de ayuno. Esto puede deberse a que una vez que la formulación Furosemide EFA pasa al duodeno, su rápida disolución evita prácticamente el loop de la histéresis. En cambio, para la formulación Lasix, el pasaje repetitivo de sus gránulos hacia el duodeno (ya que es de rápida desintegración) si permitieron la aparición de dicho loop al presentar un mayor tiempo de absorción.

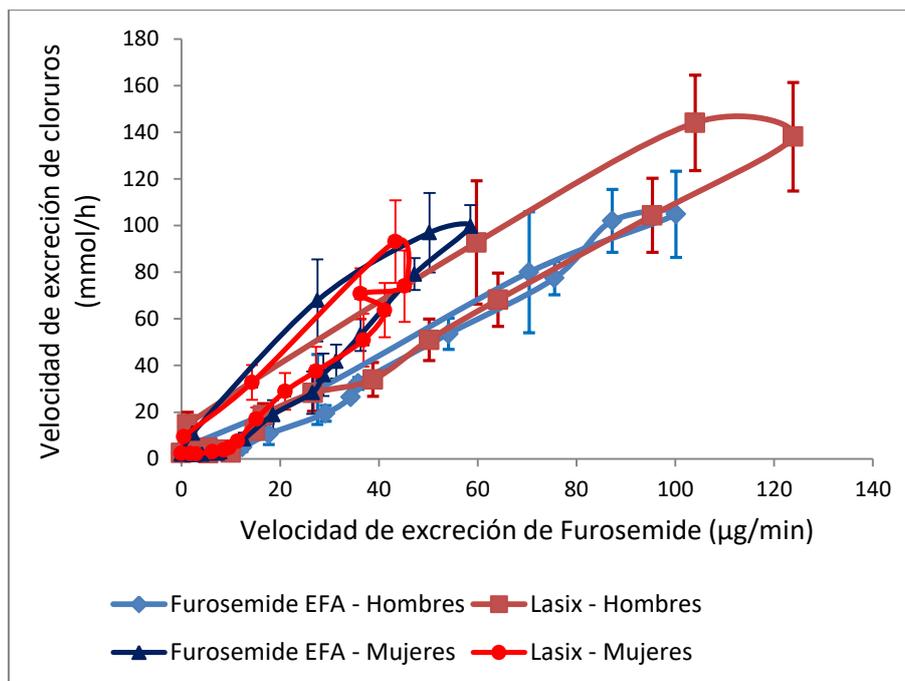


Figura 6.2.3.1. Perfil PK/PD en hombres y mujeres tras administración en condiciones de ayuno de las formulaciones Lasix y Furosemide EFA.

Para el caso de las mujeres, el mayor tiempo de vaciado gástrico que presentan (cuando el fármaco se administra bajo condiciones de ayuno) generó un ensanchamiento en la histéresis para ambas formulaciones (ver figura 6.2.3.1). Este hecho muestra que la cinética de absorción de furosemide en mujeres está gobernada por la velocidad de vaciado gástrico y no por la formulación.

Siguiendo con la diferencia en la relación PK/PD entre sexos, en la figura 6.2.3.1 se puede apreciar que hombres y mujeres presentan pendientes diferentes para dicha relación, siendo esta más pequeña en hombres. Se ha reportado que los hombres presentan un mayor porcentaje de gasto cardíaco hacia los riñones que las mujeres (19% vs 17%)^[35]. Por lo tanto, un mayor porcentaje de moléculas son conducidas hacia dicho órgano en hombres, en cada ciclo de circulación sanguínea, por lo cual en este caso el parénquima renal estará cargado con un 12% ($19 \times 100 / 17$) más de furosemide que en mujeres^[36]. Si la velocidad de excreción urinaria de Furosemide fuera reducida por un factor de $1/1.12$, la velocidad de excreción del fármaco en hombres se adaptaría a la de las mujeres, por lo cual las concentraciones plasmáticas y las relaciones de concentración riñón/sangre serían similares en hombres y mujeres; los perfiles PK/PD presentarían idénticas pendientes en ambos sexos ya que no existirían diferencias en la farmacodinamia. Sin embargo, a pesar de que se realizó esta transformación (ver figura 6.2.3.2), las diferencias entre hombres y mujeres para la pendiente PK/PD persistieron.

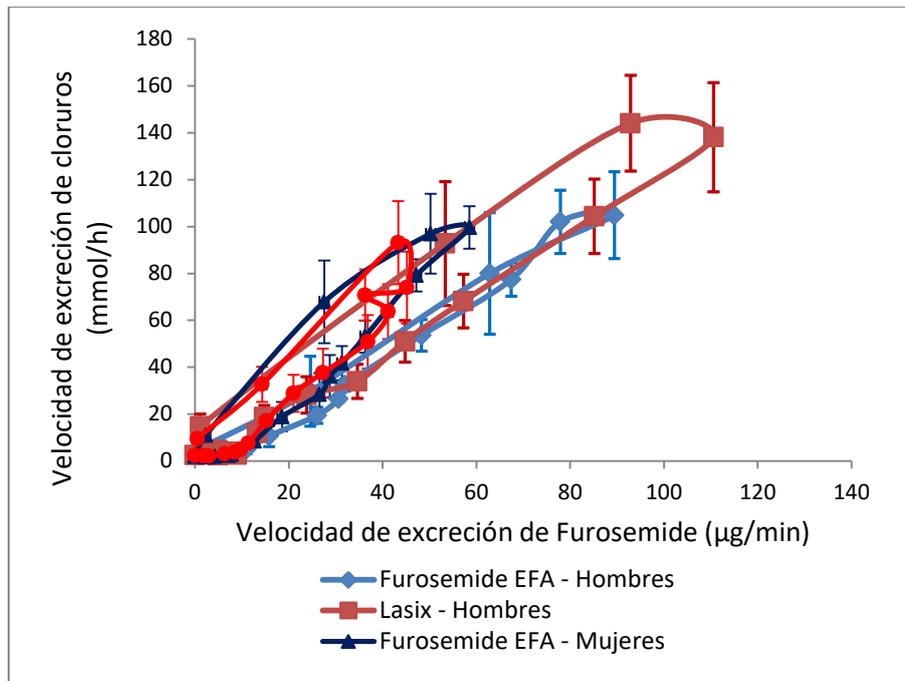


Figura 6.2.3.2 Perfil PK/PD en hombres y mujeres tras administración en condiciones de ayuno de las formulaciones Lasix y Furosemide EFA, utilizando valores de dU/dt corregidos por el factor $1/1.12$ para hombres.

Hasta ahora se ha asumido que la farmacodinamia de Furosemide no afecta su farmacocinética, como si ambas fueran independientes una de otra. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta que un mayor flujo sanguíneo hacia la zona renal genera no solo una mayor concentración del fármaco en su sitio de acción ^[37-39] sino también en el lumen de los túbulos, desde donde la excreción urinaria de Furosemide tendrá lugar como consecuencia de su propio efecto diurético. Por tanto, una doble contribución de una mayor fracción de gasto cardiaco destinado a esta zona debe ser considerada para transformar la velocidad de excreción urinaria de Furosemide en hombres. De esta manera, los valores de velocidad de excreción urinaria del fármaco fueron multiplicados por un factor de $1/1.24$ (duplicando el incremento del 12% de la fracción de gasto cardiaco destinado al riñón en hombres). El resultado de este ajuste se puede ver en la figura 6.2.3.3. De este modo, se logró una buena correlación PK/PD, independientemente del sexo de los individuos. Esta transformación significa que los hombres presentarían un clearance de excreción renal 24% mayor que las mujeres.

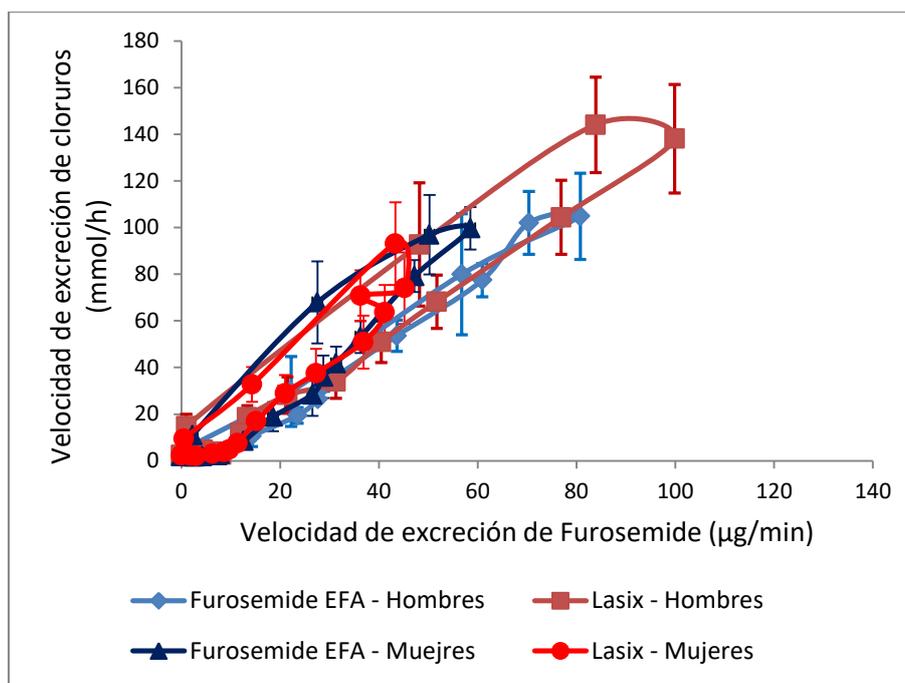


Figura 6.3.3.3. Perfil PK/PD en hombres y mujeres tras administración en condiciones de ayuno de las formulaciones Lasix y Furosemide EFA, utilizando valores de dU/dt corregidos por el factor $1/1.24$ para hombres.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que la intensidad de acción de Furosemide no se relaciona linealmente con su concentración, y por tanto, la asunción de un factor constante de $1/1.24$ para la corrección mencionada anteriormente no sería del todo apropiada. La excreción renal de Furosemide podría no ser constante ya que esta se ve influenciada por su propio efecto diurético. No se encontraron datos acerca de diferencias relacionadas al sexo en cuanto al clearance de excreción renal de Furosemide publicados en la literatura, pero parece razonable el hecho de asumir que este sea mayor en hombres, tomando en cuenta similares resultados para otros fármacos o sustancias endógenas que presentan una preponderante eliminación a través de la excreción renal^[40,41].

Estos supuestos realizados llevan a cuestionarse si es confiable evaluar la diferencia de biodisponibilidades de Furosemide entre hombres y mujeres a través de la determinación de velocidad de excreción urinaria del fármaco. Para esto, las velocidades de excreción urinarias deberían ser corregidas por un valor de $1/1.24$ para compensar la diferencia en el clearance de excreción renal entre ambos sexos, de modo que las únicas diferencias que se mantendrían entre estos serían en la biodisponibilidad y otros clearance de eliminación presentes, los cuales a efectos prácticos como representan un pequeño porcentaje del total, pueden ser obviados. En la tabla 6.2.3.1 se muestran los cocientes Mujeres / Hombres para los parámetros $U[\infty]$ y dU/dt_{max} corregidos y sin corregir para el grupo de los hombres por el factor de $1/1.24$, para el estudio realizado bajo condiciones de ayuno.

Parámetro	Mujeres / Hombres _{sin corregir}		Mujeres / Hombres _{corregido}	
	Test	Referencia	Test	Referencia
$U[\infty]$	0.6844	0.6142	0.8487	0.7616
dU/dt_{\max}	0.6997	0.4884	0.8676	0.6056

Tabla 6.2.3.1. Comparación de los cocientes mujeres/hombres para los parámetros farmacocinéticos $U[\infty]$ y dU/dt_{\max} , aplicando y sin aplicar la corrección por el factor 1/1.24 para dichos parámetros en el grupo de los hombres, utilizando el test de Student.

Asumiendo que la única diferencia entre sexos que se mantiene luego de la corrección realizada fuese la biodisponibilidad, los resultados muestran que las mujeres absorberían el 85% y el 76% de la dosis respecto a los hombres para Furosemide EFA y Lasix respectivamente, lo cual significa que mujeres absorberían un 15% y un 24% menos de Furosemide que los hombres para dichas formulaciones cuando las mismas son administradas bajo condiciones de ayuno. Estas diferencias, como se explica en otras secciones de esta tesis, podrían deberse a que mujeres presentan un mayor pH intestinal, lo que generaría una menor ventana de absorción que en hombres. Estas estimaciones coinciden con los resultados obtenidos por Waller et al., (1982) ^[42] y Hammarlund et al., (1984) ^[11].

Cuando se realizó este análisis pero para el ensayo en que se administraron las formulaciones con comidas, se volvieron a encontrar estas histéresis de sentido horario, siendo estas más pronunciadas, como puede observarse en la figura 6.3.3.4 para ambas formulaciones, tanto en hombres como en mujeres. En este caso, cuando los medicamentos son administrados concomitantemente con alimentos, es la velocidad de vaciado gástrico que se encuentra enlentecida el factor que controla la absorción de furosemide, así como el pH a nivel duodenal, el cual define la ventana de absorción del fármaco.

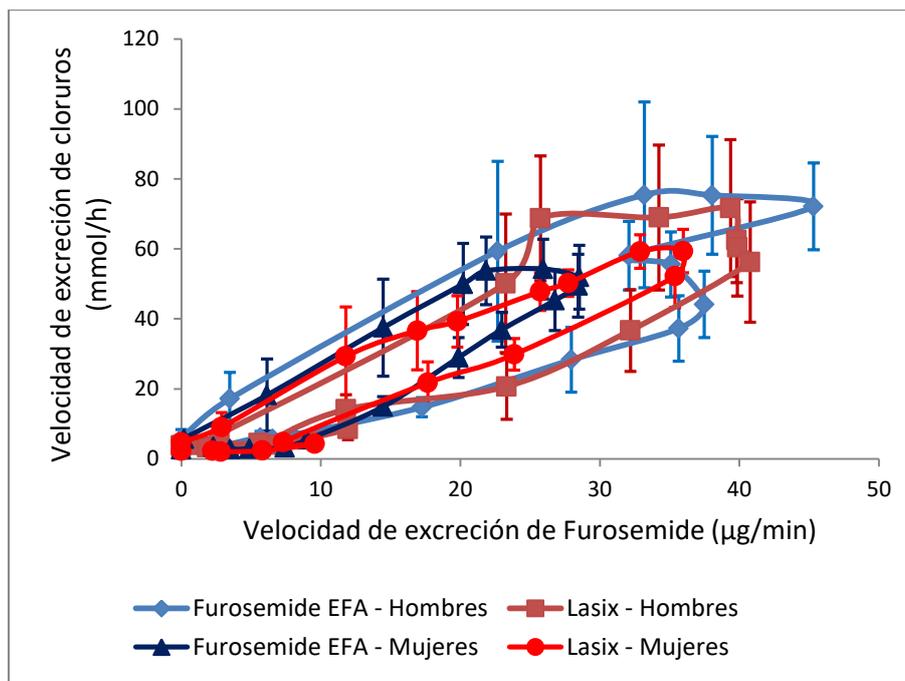


Figura 6.3.3.4. Relación PK/PD en hombres y mujeres – con comidas T y R

Como se explicó anteriormente en este capítulo, a pesar del descenso en la biodisponibilidad de Furosemide cuando esta es administrada con comidas respecto a su administración en condiciones de ayuno, la farmacodinamia no se vio disminuida en tales proporciones. Dado que las concentraciones arteriales del fármaco son las que comandan la llegada del mismo al sitio de acción, un aporte continuo de moléculas desde el sitio de absorción a la sangre arterial, podría lograr mantener el efecto diurético por un tiempo más prolongado, mientras persiste el proceso de absorción.

6.4. Conclusiones

- Durante el proceso de absorción, la concentración de furosemide en sangre venosa presentaría un menor valor que la concentración arterial que llega a los riñones, donde se encuentra el sitio de acción del fármaco. Esta sería la razón por la cual la relación PK / PD para Furosemide presenta un loop de histéresis horaria. El fármaco ejercería su efecto farmacológico antes de que pueda ser excretada ya que su llegada al sitio de acción desde los capilares es más rápida que su arribo al final del lumen de los túbulos renales del glomérulo.
- La cantidad y velocidad de absorción de Furosemide, cuando la misma es administrada bajo condiciones de ayuno depende de la tecnología de fabricación de la formulación para el caso de los hombres, y de la velocidad de vaciado gástrico así como del pH intestinal en mujeres, presentando estas una estrecha ventana de absorción para este fármaco.
- Hombres y mujeres presentan diferentes pendientes para la relación PK/PD, siendo esta más pequeña en hombres. Esto probablemente se deba a que los hombres tienen un clearance urinario de furosemide un 24% mayor que las

mujeres. Para poder evaluar diferencias de biodisponibilidades entre sexos a través de la determinación de velocidad de excreción urinaria de furosemide, las mismas deberían ser corregidas por un factor de 1/1.24 para los hombres a modo de compensar la diferencia de clearance existente.

- Cuando el fármaco es administrado con comidas, la velocidad de absorción y la cantidad absorbida de fármaco se ven gobernadas principalmente por la fisiología gastrointestinal en ambos sexos, reduciéndose la ventana de absorción respecto a la administración de furosemide bajo condiciones de ayuno, principalmente en hombres. Pero de algún modo en ambos sexos el más sostenido efecto durante la absorción compensa en parte la pérdida de biodisponibilidad.

Capítulo 7: Influencia del modo de administración en la bioequivalencia de medicamentos - conclusiones generales.

La investigación realizada en la presente tesis agrega evidencias acerca de cómo influye el modo de administración de los medicamentos en su velocidad y cantidad de absorción, así como también sobre las diferencias existentes entre sexos en este proceso farmacocinético. Este capítulo agrupa las principales conclusiones desprendidas de este trabajo.

En el caso de drogas de carácter ácido como lo es la Furosemide, como se observó en este trabajo, la tecnología de fabricación de los medicamentos que la contengan para administración por vía oral es fundamental para adecuar correctamente la velocidad y cantidad de absorción de la misma. De esta manera, los laboratorios que fabriquen copias de los medicamentos originales para este tipo de fármacos, deben elegir la materia prima que utilizarán y desarrollar sus formulaciones que intenten reproducir las características fisicoquímicas del medicamento original para lograr presentar biodisponibilidades y velocidades de absorción similares a este último, para garantizar la bioequivalencia tanto en hombres como mujeres, tanto se administren con comidas o bajo condiciones de ayuno.

Sin embargo, cuando se compararon ambos modos de administración, se observó que el enlentecimiento del vaciado gástrico así como el aumento de pH a nivel intestinal produjeron una disminución en la velocidad y cantidad absorbida de Furosemide respecto a su administración en ayunas, lo que se traduce en una disminución de la biodisponibilidad. A pesar de esto, al analizar la farmacodinamia resultante de estas administraciones monitoreando las velocidades de excreción urinaria de cloruros, no se observó una disminución de dicha respuesta farmacodinámica. Lo que puede concluirse de los resultados obtenidos es que si se administrara una menor dosis de furosemide, pero controlando estrechamente su pasaje hacia el duodeno y su estancia en el mismo, sería posible obtener una mayor eficiencia diurética, y así la respuesta terapéutica se mantendría muy similar. De esta manera, formulaciones gastro-retentivas en las cuales el medicamento, como lo indica la palabra, fuera retenido en el estómago por algún mecanismo (flotación, etc.) y liberara lentamente su contenido en el estómago, permitiría prolongar el tránsito desde este órgano hacia el duodeno, extendiendo así su velocidad de absorción, aumentando no solo la biodisponibilidad del mismo sino la intensidad del efecto diurético. En cambio, no sería adecuado el desarrollo de formulaciones de liberación prolongada que no guardaran el recaudo de fijarse a nivel estomacal, ya que si prosiguiese su tránsito libremente por el intestino perderían más biodisponibilidad que las propias formulaciones de liberación inmediata, tal como ocurrió con las formulaciones comerciales de Furosemide en el pasado, y de cuyas razones se expuso a lo largo de los capítulos anteriores.

Se concluyó que las diferencias fisiológicas a nivel gastrointestinal entre hombres y mujeres influyen fuertemente en la absorción de fármacos, y de esta manera, en la evaluación de bioequivalencia entre dos productos que contengan el mismo fármaco. Así, de la manera que tradicionalmente se realizan este tipo de ensayos, se podrían estar obteniendo resultados que difieran entre sí según se realice el análisis para hombres y mujeres por separado, o ambos grupos juntos. Un medicamento podría resultar bioequivalente a la referencia cuando se analiza el total de los individuos participantes, pero no cuando los separamos por sexo.

Por otro lado, se logró dar una explicación más razonable, según nuestro criterio, a la histéresis horaria que presenta la relación PK/PD para Furosemide cuando la misma se administra por vía oral. La respuesta a esto vendría dada por las diferencias de concentración del fármaco en vena y arteria a lo largo de su pasaje por el organismo. Consideramos esta explicación más adecuada que el concepto de tolerancia aguda como respuesta a una dosis única (Hammarlund, 1984) ^[11], ya que cuando esta se observó únicamente tras la administración del medicamento por vía oral, y fue más intensa cuando se administra con comidas o de modo lento.

Finalmente, se logró elaborar un procedimiento para realizar ensayos de disolución *in vitro* que permitan predecir si un medicamento es bioequivalente a su correspondiente referencia, para drogas de características acídicas. De esta manera, se abre la posibilidad de hacer un paneo sobre una gran cantidad de medicamentos que aún no han demostrado bioequivalencia sin necesidad de realizar costosos estudios *in vivo*. En caso de que dicho estudio *in vitro* mostrase diferencias significativas entre las formulaciones evaluadas, sería necesario realizar los estudios *in vivo* para verificar estos resultados. De esta manera, se podría lograr un gran avance en el conocimiento de situación a nivel nacional respecto a la calidad de producción de los medicamentos genéricos, y en consecuencia, tomar medidas adecuadas a la misma. Como se menciona en el correspondiente capítulo a las correlaciones *in vivo* – *in vitro*, para realizar estos ensayos *in vitro* sería muy útil contar con un aparato IV-USP (celda de flujo continuo), utilizando medios biorrelevantes. El aparato II-USP no resultó adecuado para este tipo de estudios, ya que no permite simular el pasaje del medicamento a lo largo del tracto gastrointestinal de un modo automatizado como sí lo hace la celda de flujo continuo.

Esta tesis originó tres artículos científicos de los cuales dos han sido ya publicados, y uno se encuentra en proceso de evaluación. Los artículos publicados son:

- Magallanes L, Lorier M, Ibarra M, Vázquez M, Fotaki N, Fagiolino P. (2015). A simple pharmacokinetic model based on mean residence times to predict furosemide exposure after oral doses. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research*. 3:54-65.

- Magallanes L, Fagiolino P, Vazquez M, Fotaki N, Ibarra M, Lorier M, Bertola V, Barindelli A. (2016). Sex-related *in vitro* / *in vivo* and PK/PD correlations after oral single dose furosemide administration. *Journal of Pharmaceutical Technology and Drug Research*. 5:1-11.
- Magallanes L, Fagiolino P, Vázquez M, Fotaki N, Ibarra M, Lorier M, Bértola V, Barindelli A. (2016). Influence of food and sex on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of furosemide. *Current Topics in Pharmacology Journal*. 20: 45-56

La investigación que dio origen a los resultados presentados en este trabajo de tesis recibió fondos de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación bajo el código POS_NAC_2014_1_102492, y de la Comisión Sectorial de Investigación científica CSIC.



Capítulo 8: Bibliografía

1. Decreto del Poder Ejecutivo Nº 12/007 (Ministerio de Salud Pública de Uruguay), de fecha 12 de enero de 2007. Recomendaciones técnicas para la realización de estudios de bioequivalencia: Intercambiabilidad de Medicamentos.
2. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Annex 7: Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability. Fortieth Report. World Health Organization, pp 347-390, Geneva 2006.
3. Tesis de Doctorado en Química *Influencia del sexo en la respuesta farmacocinética de los medicamentos*. Ibarra, Manuel. Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay, año 2014.
4. Camenisch G, Folkers G, Van de Waterbeemd H. (1996). Review of theoretical passive drug absorption models: Historical background, recent developments and limitations. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 71 (5): 309-327.
5. Crouthamel W.G, Tan G.H, Dittert L.W, Doluisio J.T. (1971). Drug Absorption IV: Influence of pH on Absorption Kinetics of Weakly Acidic Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 60 (8): 1160-1163.
6. Höter D, Dressman J.B. (1997). Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 25 (1): 3-14.
7. Martinez Mn, Amidon, Gl. (2002). A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 42: 620-643.
8. Ogata H, Zugarni S, Ejima A, Kawatsu Y. (1983). Bioavailability of two preparations of furosemide and their pharmacological activity in normal volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 24 (6): 791-796.
9. Clarke-s Analysis of Drugs and Poisons 4th Ed (2011).
10. Odland B, Beermann B. (1980). Renal tubular secretion and effects of furosemide. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 27 (6): 784-790.
11. Hammarlund M.M, Paalzow L.K, Odland B. (1984). Pharmacokinetics of furosemide in man after intravenous and oral administration. Application of moment analysis. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 26: 197-207.
12. Lee M.G, Chiou W.L. (1983). Evaluation of Potential Causes for the Incomplete Bioavailability of Furosemide: Gastric First-Pass Metabolism. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*. 11 (6): 623-640.
13. Fagiolino P, Aiache J.M, Camacho R, Aiache S, Renoux R. (1985). Estudio de biodisponibilidad de la Furosemida (correlación *in vitro* / *in vivo*). *Ciencia e Industria Farmaceutica*. 4(2a. ép.): 311-319.
14. Prandi C, Fagiolino P, Manta E, Llera L.D, Aiache J.M, Couquelet J.(1992). Development of absorption Furosemide prodrugs: synthesis, *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Il Farmaco*. 47: 249-263.

15. Prandi C, Fagiolino P, Manta E, Llera L.D. (1992). Bioavailability study of Furosemide prodrugs in rats. *Il Farmaco*. 47: 1225-1230.
16. Al-Mohizea A.M. (2010). Influence of intestinal efflux pumps on the absorption and transport of furosemide. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 18: 97–101.
17. Ponto L.L.B, Schoenwald R.D. (1990). Furosemide: a pharmacokinetic / pharmacodynamic review (part I). *Clinical Pharmacokinetics*. 18(5):381-408.
18. McCrindle J.L, Li Kam Wa T.C, Barron W, Prescott L.F. (1996). Effect of food on the absorption of frusemide and bumetanide in man. *British Journal of Clinical Pharmacology* . 42: 743-746 .
19. Beermann B, Groschinsky-Grind M, Fahraeus L, Lindstrom B. (1978). Placental transfer of furosemide. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 24(5): 560-5622.
20. Prasad V.K, Rapaka R.S, Knigth P.W, Cabana B.E. (1982). Dissolution medium – a critical parameter to identify bioavailability problems of furosemide tablets. *International Journal of Pharmaceutics*. 11: 81-90.
21. Jantratid E, Janssen N, Reppas C, Dressman J.B. (2008). Dissolution Media Simulating Conditions in the Proximal Human Gastrointestinal Tract: An Update. *Pharmaceutical Research*. 25: 1663-76.
22. Fotaki N, Vertzoni M. (2010). Biorelevant Dissolution Methods and Their Applications in *in vitro-in vivo* Correlations for Oral Formulations. *The Open Drug Delivery Journal*. 4: 2-13.
23. Merki H.S, Fimmel C.J, Walt R.P, Harre K, Rohmel J, Witzel L. (1988). Pattern of 24 hour intragastric acidity in active duodenal ulcer disease and in healthy controls. *Gut*. 29: 1583-1587.
24. Prewett E, Smith J, Nwokolo C, Sawyerr A, Pounder R. (1991). Twenty-four hour intragastric acidity and plasma gastrin concentration profiles in female and male subjects. *Clinical Science*. 80:619–24.
25. Lindahl A, Ungell A, Knutson L, Lennernäs H. (1997). Characterization of fluids from the stomach and proximal jejunum in men and women. *Pharmaceutical Research*. 14:497–502.
26. Abou-Auda H.S, Al-Yamani M.J, Morad A.M, Bawazir S.A, Khan Z.S, Al-Khamis K.I. (1998). High-performance liquid chromatographic determination of furosemide in plasma and urine and its use in bioavailability studies. *Journal of Chromatography B*. 710: 121-128.
27. Granero G.E, Longhi M.R, Mora M.J, Junginger H.E, Midha K.K, Shah V.P, Stavchansky S, Dressman J.B, Barends D.M. (2010). Biowaiver monographs for immediate release solid oral solid dosage forms: Furosemide. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 99: 2544-56.
28. Hall J.E. (2006). Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology 12th Ed. Saunders, Philadelphia.
29. Alvan G, Paintaud G, Eckernas S.A, Grahnen A. (1992). Discrepancy between bioavailability as estimated from urinary recovery of furosemide and total diuretic effect. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 34:47-52.

30. Wakelkamp M, Blechert A, Eriksson M, Gjellan K, Graffner C. (1999). The influence of furosemide formulation on diuretic effect and efficiency. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 48:361-366.
31. Gourlay S.G, Benowitz N.L. (1997). Arteriovenous differences in plasma concentration of nicotine and catecholamines and related cardiovascular effects after smoking, nicotine nasal spray, and intravenous nicotine. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 62:453-463.
32. Klausner E.A, Lavy E, Stepensky D, Cserepes E, Barta M, Friedman M, Hoffman A. (2003). Furosemide pharmacokinetics and pharmacodynamics following gastroretentive dosage form administration to healthy volunteers. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 43:711-720.
33. Castaneda-Hernandez G, Verges J, Pichette V, Heroux L, Caille G, du Souich p. (2000). Input rate as a major determinant of furosemide pharmacodynamics: influence of fluid replacement and hypoalbuminemia. *Drug Metabolism and Disposition*. 28:323-328.
34. Louizos C, Yanez J.A, Forrest M.L, Davies N.M. (2014). Understanding the hysteresis loop conundrum in pharmacokinetic/pharmacodynamics relationships. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 17:34-91.
35. Yagi N, Kiuchi T, Satoh H, Tareshima y, Kenmotsu H, Sekikawa H, Takada M. (1996). Bioavailability and diuretic effect of furosemide following administration of tablets and retarded capsules to human subjects. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 19:616-622.
36. Soldin O.P, Chung S.H, Mattison D.R. (2011). Sex differences in drug disposition. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011:187103.
37. Fagiolino P, Eiraldi R, Vázquez M. (2006). The influence of cardiovascular physiology on dose and pharmacokinetic / pharmacodynamics relationships. *Clinical Pharmacokinetics*. 45:433-448.
38. Fagiolino P. (2002). The influence of cardiac output distribution on the tissue / plasma drug concentration ratio. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 27:79-81.
39. Fagiolino P, Wilson F, Samaniego E, Vazquez M. (2003). *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 28:147-153.
40. Fagiolino P. (2004). Multiplicative dependence of the first order order rate constant and its impact on clinical pharmacokinetics and bioequivalence. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 29:43-9.
41. Rosario M.C, Thomson A.H, Jordell D.I, Sharp C.A, Elliott H.L. (1998). Population pharmacokinetics of gentamicin in patients with cancer. *British journal of Clinical Pharmacology*. 46:229-236.
42. Waller E.S, Hamilton S.F, Massarella J.W, Sharanevych M.A, Smith R.V, Yakatan G.J, Doluisio J.T. (1982). Disposition and absolute bioavailability of furosemide in healthy males. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 71:1105-1108.

Agradecimientos

A mis profesores, Pietro Fagiolino y Marta Vázquez, muchas gracias por la paciencia y la dedicación. Grandes enseñanzas han dejado en mi persona.

A mis compañeros Manuel, Marianela, Natalia, Silvana, Rosa, Cecilia y Beatriz, les agradezco los buenos y lindos momentos compartidos.

Muchas gracias a mis tías Angélica, Estela y Rosa y mi hermano Agustín por el amor y el apoyo incondicional brindado durante toda la vida.

Gracias Francisco por el amor y el apoyo que me has dado en estos años.

Agradezco a la Profesora Nikoletta Fotaki por recibirme tan amablemente en la Universidad de Bath, donde aprendí muchas cosas más allá de lo académico.

Agradezco a la Profesora Anna Barindelli, a la Dra. Virginia Bértola, y al equipo del laboratorio de emergencias del Hospital de clínicas “Dr. Manuel Quintela” por su fundamental colaboración en la realización de esta tesis de Maestría.

Anexo I – Protocolo de bioequivalencia

Forma farmacéutica/Dosis: Test (Furosemide EFA) – Comprimido de liberación inmediata conteniendo 40 mg de furosemide. Referencia (Lasix) – Comprimido de liberación inmediata conteniendo 40 mg de furosemide.

Criterios de selección de las muestras de los productos a comparar: Unidades posológicas pertenecientes a un mismo lote, en cantidades que permitan subdividir las muestras en: a) muestras de ensayo, b) contra-muestras, c) muestras de archivo, tanto para el producto Test como para el producto Referencia. Los productos a comparar seguirán lo estipulado en el título III, apartado 2, del Decreto de Salud Pública Nº 261/009 de fecha 1 de junio de 2009.

Diseño del Estudio: El estudio será llevado a cabo en dos fases: bajo condiciones de ayuno, y con comida. El mismo será en dosis única, aleatorio, cruzado, y compensado, con dos períodos, dos tratamientos y dos secuencias, para cada fase.

Aspectos éticos.

El estudio será conducido en conformidad con el protocolo, con las BPC – CIARM (Buenas Prácticas Clínicas – Conferencia Internacional de Armonización), y las normativas del Ministerio de Salud Pública del Uruguay (Decreto del Poder Ejecutivo 379/008 del 04.08.2008, que regula la Investigación en seres humanos, en relación con la información a brindar al voluntario de un estudio). Asimismo se realizará de acuerdo con las recomendaciones de la Asociación Médica Mundial (como consta en la Declaración de Helsinki, 1964, y las últimas enmiendas de Edimburgo, Escocia 2000, Seúl, Corea 2008, y Fortaleza, Brasil 2013). El voluntario será informado sobre los aspectos importantes del estudio y se obtendrá su consentimiento informado firmado antes de su inclusión. A este fin, el investigador proporcionará una hoja de información estándar (Consentimiento Informado, Anexo III) para ser entregada al voluntario previo a su inclusión, con información de los objetivos del estudio, sus beneficios y riesgos esperados, condiciones en que se llevará a cabo, seguros y declarando la naturaleza voluntaria de la participación en el mismo. Se les informará a los voluntarios que pueden rehusar a participar y serán libres de retirarse del estudio en cualquier momento. Por mayores detalles sobre el Consentimiento Informado, referirse al Anexo III.

Fundamentación teórica del protocolo de bioequivalencia

Los estudios de bioequivalencia tienen como objetivo demostrar la intercambiabilidad entre productos similares. Dicha intercambiabilidad significa que los productos bioequivalentes presentarán similares biodisponibilidades (equivalencia biofarmacéutica) tras la administración en idénticos planes posológicos (dosis única o dosis múltiple).

Los estudios de bioequivalencia deberían ser realizados en lo posible bajo las mismas condiciones de uso clínico. En el caso de que el medicamento pueda ser ingerido con comida o en ayunas, debería evaluarse la bioequivalencia en ambas condiciones de administración. Asimismo, dadas las diferentes condiciones fisiológicas del tracto digestivo que se suceden a lo largo del día, sería muy recomendable administrar los medicamentos a la hora indicada en la información proporcionada por el fabricante.

Ambos medicamentos a testear presentan liberación inmediata (LI).

A los efectos de ocasionar el menor inconveniente a los voluntarios y proporcionarles el mayor confort, el monitoreo de la droga se realizará midiendo la concentración en orina, la cual se obtendrá por micción espontánea a tiempos estandarizados, evitándose así el muestreo sanguíneo. Esta posibilidad es factible en virtud de la acción diurética de la droga, lo cual proporciona un volumen suficiente para llevar a cabo los análisis químicos correspondientes. Asimismo, la buena correlación reportada entre los datos urinarios y plasmáticos valida conducir la investigación de este modo. La técnica analítica será validada de acuerdo a los procedimientos establecidos en el CEBIOBE.

Los volúmenes de las muestras de orina serán registrados y las concentraciones serán transformadas a cantidades, de modo que la cantidad excretada en el intervalo de tiempo transcurrido entre dos micciones consecutivas pueda ser expresada en términos de velocidad de excreción urinaria de la droga, la cual se corresponderá con el tiempo transcurrido hasta la mitad de dicho intervalo. En resumen, se graficará: 1) velocidad de excreción urinaria (dU/dt) en función del tiempo (t) cuya área debajo de la curva a tiempo infinito se representará como $U[\infty]$. Esta área tiene directa relación con la dosis absorbida de fármaco, midiendo por tanto la biodisponibilidad en cantidad.

La velocidad de excreción urinaria (dU/dt) tiene un perfil directamente proporcional al que registraría las concentraciones plasmáticas del fármaco. Pueden así establecerse paralelismos entre ambos fluidos, y lo que habitualmente se determina como concentración plasmática máxima (C_{max}) sería en este proyecto subrogado por dU/dt_{max} , al igual que el tiempo de máxima concentración por el tiempo de máxima velocidad de excreción (T_{max}).

La variabilidad juega un rol muy importante para la toma de decisiones. Resulta crítica para concluir bioequivalencia, dado que con la varianza residual del ensayo (calculado por Análisis de la Varianza: ANOVA) se construyen los intervalos de confianza para el cociente entre ambos productos Test y Referencia de parámetros dU/dt_{max} o $U[\infty]$, los cuales deben estar incluidos en el intervalo de bioequivalencia de $[0,8-1,25]$.

La meta será reducir lo más posible la variabilidad residual del ensayo. Contribuyentes habituales en el error residual son: 1) variabilidad analítica; 2) variabilidad aportada por el plan de muestreo; 3) variabilidad proveniente del sistema individuo-producto Test; 4) variabilidad proveniente del sistema individuo-producto Referencia; 5) variabilidad interindividual en el discernimiento entre Test y Referencia; entre otras

fuentes. Respecto a los contribuyentes 1 y 2, se tomarán las mayores precauciones al poner en práctica métodos analíticos y protocolos de muestreo apropiados.

Protocolo de biodisponibilidad / bioequivalencia

1. Objetivo

El objetivo del estudio será determinar si dos medicamentos conteniendo 40 mg de furosemide son bioequivalentes, cuando se administran a voluntarios sanos (hombres y mujeres) por la mañana con comida.

Se evaluarán *in vivo* los perfiles urinarios de furosemide determinándose la biodisponibilidad relativa del principio activo entre ambos medicamentos.

2. Método

2.1. Voluntarios

a. Criterios de inclusión

- Presentar adecuadas pruebas de Laboratorio, según opinión del Investigador Médico e Investigador Principal, y presentar evaluación médica cardiológica y general sin inconvenientes. Ver anexos I y II.
- Haber firmado el Consentimiento Informado previa lectura y comprensión del mismo (anexo III).
- Poseer una edad entre 18 y 50 años.
- Evitar la concepción desde la firma del Consentimiento Informado (anexo III) hasta el alta médica.
- En el caso de mujeres, se preverá que al momento de iniciar el ensayo se encuentren en un día de su ciclo menstrual que evite, tanto en la primera semana como en la segunda semana, la ocurrencia de sangrado menstrual.

b. Criterios de exclusión

- Apartarse de los criterios de inclusión.
- Mujeres cursando embarazo.
- Mujeres activas sexualmente, que no utilicen algún método anticonceptivo.
- Mujeres en lactancia.
- Recibir tratamiento medicamentoso (excepto anticonceptivos).
- Beber diariamente más de 250 mL de vino, más de 500 mL de cerveza, o equivalente en bebidas alcohólicas.
- Presentar alguna patología al momento del estudio, la exclusión depende de la naturaleza de la patología y del tratamiento requerido.
- Haber participado de un ensayo clínico, en los últimos 6 meses.
- Haber donado sangre, en los últimos 3 meses.

c. Enrolamiento de Voluntarios

- Como indica el término, la inclusión del sujeto es enteramente voluntaria, debiendo firmar un consentimiento informado (anexo III), luego de una adecuada explicación de las etapas del estudio, de los objetivos, de los posibles efectos secundarios y de la conducta que debe guardar durante su participación. A los efectos de compensar pérdidas de jornales de trabajo y/o tiempo de su actividad privada, recibirá un reembolso económico.
- Los voluntarios serán evaluados clínicamente, a los efectos de cumplir los criterios mencionados anteriormente, y evitar cualquier otra cualidad que pueda hacer fracasar los objetivos del estudio (a decisión del Investigador Principal).

d. Confidencialidad

Los nombres de las Empresas Farmacéuticas elaboradoras de los productos Test y Referencia serán desconocidos por el voluntario. Los resultados de los exámenes médicos y bioquímicos practicados a los sujetos serán dados a conocer a los voluntarios, y serán guardados confidencialmente por el Investigador Principal del Estudio.

e. Listado de eventos

El voluntario dispondrá de una planilla en la cual anotará los efectos que según su criterio sienta y amerite destacar, indicando hora de comienzo y duración. Asimismo, tomará nota de toda otra situación que crea conveniente. El Investigador Médico hará constar en la planilla su observación. En el Anexo V se incluye el Procedimiento para el Registro de Eventos adversos.

f. Deserción del estudio

- El voluntario que por razones personales decidiera retirarse del estudio gozará de todo su derecho, debiendo anotar en su planilla, en lo posible, las causas que lo motivaren.
- Serán quitados del estudio aquellos voluntarios que presenten efectos no deseados derivados del medicamento administrado.
- Serán quitados del estudio aquellos voluntarios que no cumplieran estrictamente con sus obligaciones según el diseño experimental.
- Motivarán el alejamiento del estudio, enfermedades padecidas por el voluntario durante el período del ensayo, o la necesidad de recibir algún otro fármaco por esta causa. Se valorará en esta circunstancia por parte del Investigador Médico la gravedad del hecho y, en conjunto con el Investigador Principal, la posibilidad de que pudiera continuar aún recibiendo un fármaco que en teoría no afectara los objetivos del trabajo. Esta situación se detallará en la planilla del voluntario.

2.2. Fase Clínica – Diseño Experimental

a. Forma de administración

El estudio de biodisponibilidad relativa se efectuará por administración en dosis única de ambas formas farmacéuticas (Lasix - Referencia y Furosemide EFA - Test) según un diseño aleatorio, cruzado y compensado. Cada voluntario recibirá 4 dosis (dos de cada producto en dos fases: con comidas y en ayunas) en la mañana (08:00), separadas 7 días.

b. Número de Sujetos

El número de voluntarios para el ensayo será no menor de 12 sujetos. Se recabarán los datos antropométricos de los mismos: edad, sexo, peso, altura, así como el hábito de fumar cuando corresponda.

c. Dosis

Se administrará una dosis de 40 mg de Lasix o una dosis de 40 mg de Furosemide EFA, 1 comprimido de cada medicamento, con 200 mL de agua, según la secuencia aleatoria adjudicada a cada voluntario en la primera semana de cada fase. Iguales números de sujetos recibirán Test y Referencia en las cuatro semanas, siguiendo dos secuencias posibles: TR o RT.

d. Alimentación

- Fase 1: Administración en Ayunas (AA) :

Los voluntarios comparecerán el primer día del estudio, en cada semana del ensayo, con un ayuno no menor a 8 horas (en dicho lapso solo será permitida la ingesta de agua). La dosis se administrará con 200 mL de agua. Cinco horas después de la toma (5 horas post-dosis; hora reloj 13:00) recibirán un almuerzo estándar consistente en pasta con tuco o salsa, un postre lácteo o fruta y un vaso de agua (250 mL). A las 8 horas post-dosis (16:00 reloj) recibirán una merienda consistente en leche café descafeinado (250 mL) y bizcochos. A las 12 horas de administrada la dosis (hora reloj 20:00) cenarán 1 milanesa al pan, un postre lácteo o fruta y 250 mL de agua. Todas las comidas serán iguales para todos los voluntarios e iguales en las dos semanas del estudio.

La ingesta de líquidos será: 200 mL a las 08:00 junto con la dosis (vaso de agua), 250 mL a las 13:00 (vaso de agua), 250 mL a las 16:00 (café o leche) y 250 mL a las 20:00 (vaso de agua).

- Fase 2: Administración con Comida (ACC):

Los voluntarios comparecerán el primer día del estudio, en cada semana del ensayo, con un ayuno no menor a 8 horas (en dicho lapso solo será permitida la ingesta de

agua). Recibirán como desayuno (hora reloj 07:30) un vaso de leche, café descafeinado y dos bizcochos, más una tostada con mermelada, lo cual insumirá no más de 25 minutos. Cinco minutos después recibirán la dosis de medicamento con 200 mL de agua (hora reloj 08:00). Cinco horas después de la toma (5 horas post-dosis; hora reloj 13:00) recibirán un almuerzo estándar consistente en pasta con tuco o salsa, un postre lácteo o fruta y un vaso de agua (250 mL). A las 8 horas post-dosis (16:00 reloj) recibirán una merienda consistente en leche café descafeinado (250 mL) y bizcochos. A las 12 horas de administrada la dosis (hora reloj 20:00) cenarán 1 milanesa al pan, un postre lácteo o fruta y 250 mL de agua. Todas las comidas serán iguales para todos los voluntarios e iguales en las dos semanas del estudio.

La ingesta de líquidos será: 200 mL a las 07:30 (leche), 200 mL a las 08:00 junto con la dosis (vaso de agua), 250 mL a las 13:00 (vaso de agua), 250 mL a las 16:00 (café o leche) y 250 mL a las 20:00 (vaso de agua).

Reposición de electrolitos para AA y AC ^[32]:

- AA:

Después de cada muestra urinaria, desde los 40 min hasta las 3 hs post dosis, los voluntarios recibirán 67 mL de una solución de rehidratación para reposición de electrolitos (REHIDROMS[®]). Luego de las 3 hs post dosis, los voluntarios recibirán 100 mL de la solución de rehidratación antedicha tras cada micción.

- AC:

Después de cada muestra urinaria, desde los 40 min hasta las 3 hs post dosis, los voluntarios recibirán 67 mL de una solución de rehidratación para reposición de electrolitos (REHIDROMS[®]). Posteriormente a cada muestreo de orina correspondientes a los tiempos 210 y 240 minutos, se les administrará a los voluntarios 50 mL de la solución de rehidratación, y luego de las 4 horas post-dosis, se les administrarán 100 mL de dicha solución tras cada micción.

Forma de preparación:

Disolver el contenido de un sobre en 1250 mL de agua corriente previamente hervida (preparar la solución luego de que el líquido se haya enfriado). Es necesario agitar adecuadamente el preparado, a fin de lograr una solución homogénea. La composición de la misma es sodio 15 mmol/L, potasio 4 mmol/L, cloruro 13 mmol/L, glucosa 15 mmol/L, citrato 2 mmol/L).

No se permitirá ingerir jugos de fruta en cualquiera de sus variantes, incluyendo bebidas gaseosas que lo contengan. La ingesta de fluido debe estar estandarizada de acuerdo a lo mencionado anteriormente.

e. Muestreo

- AA:

Se tomarán muestras urinarias a los siguientes tiempos: 0 (predosis) – 20 – 40 – 60 – 80 – 100 – 120 – 140 – 160 – 180 – 240 – 300 – 360 – 420 – 480 – 600 – 720 min– post-dosis, registrándose los volúmenes de las muestras de orina. Dos alícuotas de lo orinado (muestra y contramuestra) se guardará en el freezer (-25°C) hasta el momento del análisis y otra alícuota será entregada a laboratorio para análisis de electrolitos en orina.

- AC:

Se tomarán muestras urinarias a los siguientes tiempos: 0 (predosis) – 20 – 40 – 60 – 80 – 100 – 120 – 140 – 160 – 180 – 210 – 240 – 300 – 360 – 420 – 480 – 600 – 720 min– post-dosis, registrándose los volúmenes de las muestras de orina. Dos alícuotas de lo orinado (muestra y contramuestra) se guardará en el freezer (-25°C) hasta el momento del análisis y otra alícuota será entregada a laboratorio para análisis de electrolitos en orina.

f. Internación

Los voluntarios no permanecerán internados. Una vez finalizada la cena (20:00) y la última toma, el voluntario se puede retirar. De igual forma, la sede del ensayo clínico (CEBIOBE) cuenta con camas, gabinetes higiénicos, privacidad y demás elementos que permitirán una confortable estadía sin estrés. Se tendrá prevista una rápida intervención médica en caso de que fuera necesaria.

2.3. Fase Analítica - Determinación de concentraciones urinarias de furosemide

A los efectos de ocasionar el menor inconveniente a los voluntarios y proporcionarles el mayor confort, el monitoreo de la droga se realizará midiendo la concentración en orina, la cual se obtendrá por micción espontánea a tiempos estandarizados, evitándose así el muestreo sanguíneo. Esta posibilidad es factible en virtud de la acción diurética de la droga, lo cual proporciona un volumen suficiente para llevar a cabo los análisis químicos correspondientes. Asimismo, la buena correlación reportada entre los datos urinarios y plasmáticos valida conducir la investigación de este modo.

La determinación de concentraciones urinarias de furosemide se realizará mediante técnica HPLC, fase reversa, detección UV, validada en el laboratorio del CEBIOBE. El procedimiento analítico desarrollado para este estudio es una adaptación de la metodología analítica descrita previamente para su aplicación en estudios farmacocinéticos ^[26].

La validación de los métodos y su correcta aplicación a las muestras obtenidas de los voluntarios será responsabilidad del Responsable Analítico del Estudio.

Anexo II – Procedimiento para la dosificación de Furosemide en Orina

1. OBJETIVO

El objetivo de éste procedimiento es disponer de una metodología normalizada para la dosificación de Furosemide en orina

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica al Área Analítica del Centro y a todos los ensayos de furosemide en orina realizados en el CEBIOBE.

3. RESPONSABILIDAD

La responsabilidad por la aplicación de este procedimiento corresponde a los analistas del CEBIOBE. Sin perjuicio de lo anterior el Supervisor del Área Analítica es responsable de verificar la correcta aplicación de este procedimiento y de evaluar periódicamente su adecuabilidad para el alcance previsto.

4. DEFINICIONES, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrilo calidad HPLC

DFH: Fenitoína.

FURO: Furosemide

HPLC: Equipo de cromatografía líquida de alta performance.

MeOH: Metanol calidad HPLC.

AcOEt: Acetato de Etilo

5. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

5.1 Preparación de soluciones

5.1.1 Solución Amortiguadora Fosfato 20mM pH 3.5. Pesar 2.722 g de Fosfato Monobásico de Potasio. Disolver en 1 L de agua destilada, medida con material graduado. Ajustar el valor de pH a 3.5 ± 0.05 utilizando ácido fosfórico en concentración aproximada al 20%.

5.1.2 Solución Fase Móvil para retomar residuo seco. Tomar con material graduado 65 mL de solución amortiguadora fosfato pH 3.5 y 35 mL de ACN, y mezclar en un recipiente adecuado. Sonicar durante 20 minutos.

5.1.3 Solución ácido fosfórico 2.5 M. Tomar 17.2 mL de ácido fosfórico concentrado (85% p/p), y llevar a 100 mL con agua destilada.

5.1.4 Mezcla de extracción: bajo campana de extracción, tomar con material graduado 50 mL de Hexano y 50 mL de AcOEt, mezclar vigorosamente.

5.1.5 Solución de Estándar Interno. Pesar en forma exacta aproximadamente 50.00 mg de DFH estándar, disolver y llevar a 25 mL con metanol utilizando un matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada de 2000 $\mu\text{g/mL}$ (Solución SMEI). Tomar 1 mL de SMEI con material aforado y llevar a 50 mL con metanol en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 40.00 $\mu\text{g/mL}$ (Solución SEI).

5.1.6 Solución Madre FURO (S1). Pesar en forma exacta aproximadamente 50.00 mg de FURO estándar, disolver y llevar a 50 mL con metanol en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 1000 $\mu\text{g/mL}$.

5.1.7 Soluciones metanólicas stock estándar: se realizarán a partir de la solución S1 de FURO de acuerdo a la siguiente tabla. Realizar todas las diluciones con material aforado.

Nombre Solución	Generada a partir de	Volumen a tomar (mL)	Volumen final (mL)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
S1	-	-	-	1000
S2	S1	5.0	10	500.0
S3	S1	1.0	10	100.0
S4	S1	0.50	10	50.00

5.1.8 Soluciones estándar FURO en orina para curva de calibración: a 5 mL de orina blanco tomados con pipeta aforada, agregar utilizando jeringa de vidrio de 100 μL la solución metanólica especificada en la tabla. Luego homogeneizar en vórtex por 10 segundos.

Nombre Solución	Solución metanólica a agregar sobre 5 mL de orina blanco	Volumen de solución metanólica (μL)	Concentración FURO en orina ($\mu\text{g/mL}$)
CAL 1	S1	100.0	19.61
CAL 2	S1	50.0	9.901
CAL 3	S2	50.0	4.950
CAL 4	S3	50.0	0.9901
CAL 5	S4	50.0	0.4950

A 0.25 mL de muestra de orina tomada con pipeta automática agregar 50 mL de solución SEI utilizando jeringa de vidrio. La concentración resultante de estándar interno en orina es de 3.33 µg/mL. Agregar 0.25 mL de ácido fosfórico 2.5 M. Agitar en vórtex durante 10 segundos. Agregar 2.0 mL de la mezcla de extracción utilizando material graduado. Agitar en vórtex durante 1 minuto. Centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos. Tomar con pipeta pasteur de vidrio la fase orgánica (superior), pasar a tubo de centrifuga. Evaporar a sequedad bajo corriente de nitrógeno en baño seco a 40 °C. Retomar el residuo seco con 100 µL de solución fase móvil, tomados con pipeta automática, y agitar en vortex aproximadamente 10 segundos. Tomar la solución y pasar a vial de polipropileno de 250 µL. Inyectar 20 mL en HPLC.

5.3 Preparación curva de calibración para análisis de muestras de voluntarios

Realizar el tratamiento de muestras según ítem 5.2 por duplicado de cuatro a cinco de los niveles de soluciones en orina (CAL 1 a CAL 5).

5.4. Preparación de soluciones en orina estándar para utilizar como controles en el análisis de muestras de voluntarios.

Se deberán realizar de 3 a 5 controles para validar el análisis de las muestras, de acuerdo a los niveles esperados.

5.4.1 Soluciones metanólicas de FURO:

- C1: pesar en forma exacta aproximadamente 36.00 mg de FURO estándar, disolver y llevar a 10 mL con metanol en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 3600 µg/mL.
- C2: pesar en forma exacta aproximadamente 19.00 mg de FURO estándar, disolver y llevar a 10 mL con metanol en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 1900 µg/mL
- C30: pesar en forma exacta aproximadamente 38.00 mg de FURO estándar, disolver y llevar a 10 mL con metanol en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 3800 µg/mL.
- C3: tomar 1.0 mL de la solución C30 con pipeta automática, y llevar a 10 mL con metanol en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 380 µg/mL.

5.4.2 Soluciones control en orina: a 25 mL de orina blanco medidos con matraz aforado, agregar utilizando pipeta automática 100 µL de las soluciones metanólicas especificadas en la tabla. Homogeneizar.

Nombre Solución	Orina cargado con:	Concentración FURO en orina (ug/mL)
CTL A	C1	14.34
CTL M	C2	7.570
CTL B	C3	1.514

5.5 Condiciones Cromatográficas

Equipo: HPLC Dionex Ultimate 3000 Series.

Columna: Phenomenex Luna C18 (15 cm x 4.6 mm, 5 µm) o similar.

Detector: de arreglo de diodos, Dionex DAD-3000.

Fase móvil: Solución Amortiguadora Fosfato 20 mM pH 3.5 : ACN (65:35).

Flujo: 1.0 mL/min.

Longitud de onda: 230 nm hasta los 6.5 minutos, con posterior cambio a 210 nm.

Temperatura de horno de columna: 40 °C

Temperatura de compartimento de muestras: 5 °C

Volumen de inyección: 20 µL

5.6 Tiempos de Retención

FURO ~ 5.5 minutos

DFH (E.I) ~ 7.7 minutos

5.7 Cálculos

Se determinarán las concentraciones de FURO utilizando como variable independiente la relación de áreas que presenten respecto a la DFH. Se utilizará para la cuantificación la curva de calibración realizada el día de la dosificación.