

EQUIVALENCIA BIOLOGICA DE LAS CAPSULAS DE OXITETRACICLINA-HCl DEL MERCADO COLOMBIANO

Profesor ENRIQUE NÚÑEZ O., M. D., Q. F., B. Q. F.,
Jefe de la Sección de Farmacología y Toxicología.

Profesor Asistente MANUEL ARTEAGA C., Q. F., Jefe
de la Sección de Microbiología y Farmacognosia.

INTRODUCCION

En el campo de la Farmacología se dice que una sustancia es idéntica a otra cuando las dos tienen la misma estructura química, aunque cada una se obtenga con sistemas diferentes. Sin embargo, en el empleo clínico los medicamentos con el mismo ingrediente activo, administrados en forma similar pueden no ser equivalentes biológica y terapéuticamente. En los últimos años se ha dado especial importancia al estudio biofarmacéutico comparativo de numerosos preparados con igual ingrediente activo, pero de diferente origen, trabajos que demuestran una no equivalencia biológica o terapéutica, como sucede con las preparaciones orales de tolbutamida, (1) (2) prednisona, (3) fenilbutazona, (4) oxitetraciclina, (5) (6) cloranfenicol, (7) (8) bishidroxicumarina, (9) difenilhidantoína, (7) tiroides (10) aspirina (11) (12) sulfisoxazol (7).

La equivalencia biológica de los medicamentos o preparados farmacéuticos, es una investigación que por su importancia aumenta considerablemente día a día. Consiste en la misma respuesta (eficacia biológica) que dan dos preparados que contienen el mismo ingrediente activo, cuando se administran por igual vía bajo la misma forma farmacéutica e idénticas dosis (13). En la práctica la equivalencia y la eficacia biológicas se determinan por medio de valoraciones del contenido o concentraciones de la droga en la sangre o en la orina.

A partir de 1969 se han presentado a la consideración de la "Food and Drug Administration" de los Estados Unidos, una serie de trabajos basados en la valoración biofarmacéutica de las cápsulas de oxitetraciclina HCl (250 mg.) elaboradas por diferentes fabricantes, en las cuales se muestra una muy definida no equivalencia biológica entre tales preparados (5) (6).

El presente trabajo, sugerido por los anteriores estudios, es un ensayo comparativo de la equivalencia biológica de cápsulas con 250 mg. de oxitetraciclina HCl, elaboradas por dos laboratorios diferentes en el país. Su ejecución contempla dos partes:

1º Una serie de ensayos preliminares con el propósito fundamental de poder sistematizar en forma lógica, fácil y continua el trabajo en todo su conjunto, buscando como base primaria las modificaciones necesarias a las técnicas usuales de valoración de antibióticos en sangre, con el fin de hacer uniformemente reproducibles sus resultados, es decir, el establecimiento y la comprobación de diferentes pasos que permitan utilizar una técnica práctica, sencilla y exacta para valoración de oxitetraciclina en sangre.

2º Una serie de estudios comparativos para valorar los niveles sanguíneos en individuos jóvenes sanos, después de la administración oral de 250 mg. (dosis única) o 500 mg. (dosis repetida) de dos preparados farmacéuticos (cápsulas) elaboradas con oxitetraciclina HCl de diferente origen, con el fin de investigar la equivalencia y la eficacia biológicas entre ellos.

MATERIALES Y METODOS

1. Generalidades.

- a) El "germen test" empleado fue el *Bacillus cereus* var. *mycoides* (ATCC 11778).
- b) Los medios de cultivos fueron:

"Caldo nutritivo ordinario B B L" con pH 6.4 después de la esterilización.

"Agar para valoración del antibiótico".

(Penicillin Assay Base Agar. Cat. Nº J1093 c - Fisher)

Fórmula por litro de agua:

Beef Extract	1.5 Gr
Yeast Extract	3.0 Gr
Peptone	6.0 Gr
Agar	15.0 Gr

pH 6.6 después de la esterilización.

"Agar para la conservación del germen"

(Penicillin Assay Seed Agar. Cat. Nº J1095 c - Fisher)

Fórmula por litro de agua:

Beef Extract	1.5 Gr
Yeast Extract	3.0 Gr
Pancreatic Digest of Casein	4.0 Gr
Peptone	6.0 Gr
Glucose	1.0 Gr

pH 6.5 después de la esterilización.

c) Se utilizaron dos Patrones:

Oxitetraciclina HCl "Patrón de referencia" (Working standard). Ref. 80654-53 E. A., con actividad de 921 mcg/mg.

Oxitetraciclina HCl "Patrón de trabajo" - identificado con el N° de Lote 09-02424 con actividad de 905 mcg/mg. facilitado por Pfizer Colombiana S. A.

d) Se administraron dos tipos de cápsulas:

Cápsulas de 250 mg. de oxitetraciclina HCl U.S.P. XVIII de origen aparentemente europeo y con fecha de expiración, agosto 1972, identificadas con la letra B.

Cápsulas de 250 mg. oxitetraciclina HCl, con fecha de expiración febrero 1975, y marcadas como droga A.

e) Para evitar en parte la pérdida de actividad del antibiótico "referencia" se elaboró una solución Madre disolviendo 10 mg. de oxitetraciclina HCl en 10 ml de HCl a partir de la cual, según el uso, se hicieron diluciones en una solución tampón 0.1 M de fosfato monobásico, de potasio solo o asociado con "Suero sanguíneo humano normal", sin actividad antibiótica en proporción de 2 a 1.

2. Ensayos preliminares.

La técnica de valoración del antibiótico, modificada parcialmente por nosotros, corresponde a la conocida como "Método de Cilindros-placa" (14) (15). Estas variaciones corresponden en realidad a adaptaciones de nuestro laboratorio, basadas en aplicaciones de la ley de difusión de Fick que constituye el fundamento para las valoraciones microbiológicas por difusión en agar u otro gel (15) (16). En ella se establecen los parámetros y las variables que pueden condicionar, directa o indirectamente, el desarrollo satisfactorio de un ensayo de este tipo.

De acuerdo con la ley que rige un proceso de esta naturaleza, es indispensable el control, hasta donde sea posible, de las variables, tendiendo a que se conviertan en constantes para un ensayo

dado. Así se obtiene una mayor reproductibilidad y por consiguiente habrá una mejor precisión en los ensayos que se realicen. Las variables que se consideran como más importantes son:

- a) *Inóculo* (15). Con el fin de hallar la concentración óptima del “germen test” y el tiempo de cultivo más favorable, se hicieron mezclas de diferentes cultivos (obtenidos a las 10 horas, a las 17 - 18 horas, a las 23 - 24 horas de siembra en caldo ordinario a 37° C), en la proporción de 1.0 ml., 1.5 ml. y 2.0 ml. de cultivo en 100 partes de “agar para valoración de antibióticos”, fundidas a $48^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Se hicieron 5 ensayos para cada prueba y se incubaron a 37° C. durante 18 horas.
- b) *Diluciones o concentraciones de empleo del Patrón*. Además de las diluciones preconizadas por la técnica usual (14) se hicieron otras a razón de 0.4, 0.8, 1.0, 1.4, 1.6, 1.8 y 2.0 y 0.6, 0.9, 1.2 y 1.5 mcg/ml en solución tampón de pH 4.5 (para el Patrón y el problema en su orden). Estas mismas concentraciones se asociaron con suero sanguíneo humano normal sin actividad antibiótica en la proporción de 2 a 1 respectivamente. Las diluciones en solución tampón se emplearon para efectuar valoraciones comparativas del Patrón (ensayos I y II) y las diluciones con suero sanguíneo normal, para determinar la cantidad de antibiótico que se adsorbe por las proteínas, (15) al compararla con la actividad del Patrón (ensayo III). Se hicieron 5 ensayos para cada dilución.
- c) *Control de valoración del Patrón de Trabajo* (ensayo IV). Se hicieron diluciones con 0.6, 0.9, 1.2 y 1.5 tanto del Patrón de referencia 80654-53 E. A., como del Patrón de Trabajo lote 019-02424 en solución tampón pH. 4.5. Al cabo de 17 - 18 horas se hicieron las lecturas correspondientes y se graficaron los resultados promedios.
- d) *Diluciones de los sueros Problema*. Después de la coagulación de las muestras de sangre se centrifugaron (alrededor de 9.000 rpm y a 4° C) y los sueros obtenidos se distribuyeron según el siguiente cuadro: ..

CUADRO I

1.0 ml. M	+ 2 ml. Tampón = M ¹
0.8 ml. M + 0.2 ml. S N	+ 2 ml. Tampón = M ²
0.6 ml. M + 0.4 ml. S N	+ 2 ml. Tampón = M ³
0.4 ml. M + 0.6 ml. S N	+ 2 ml. Tampón = M ⁴

M = Muestra problema.

SN = Suero Normal Sanguíneo Humano sin actividad antibiótica.

M¹, M², M³, M⁴ = Diluciones obtenidas.

3. *Normas de calidad, pureza y actividad "in vitro" de la U.S.P. para cápsulas de oxitetraciclina HCl.*

Los ensayos para identidad, pureza y valoración indicados por la U.S.P. XVIII se efectuaron tanto a las cápsulas de oxitetraciclina HCl identificadas como "droga A" como para las marcadas como "droga B" (19).

4. *Ensayos para valorar la equivalencia y la eficacia biológicas.*

Se escogió un grupo de diez personas jóvenes voluntarias (5 mujeres y 5 hombres), sanas, que en los dos meses anteriores no ingirieron droga alguna. El peso y la edad promedios con su desviación standard fueron, respectivamente, para las mujeres: 51 ± 5.6 kilos (amplitud entre 48 y 60) y 22 ± 0.7 años (amplitud entre 21 y 23); para los hombres: 67 ± 3.53 kilos (amplitud entre 64 y 72) y 23.5 ± 1.14 años (amplitud entre 22 y 25). Para todo el grupo: 59 ± 9.17 kilos (amplitud entre 48 y 72) y 22.7 ± 1.17 años (amplitud entre 21 y 25).

La investigación comprendió 120 valoraciones, 60 para las cápsulas A, 60 para las B. Cada valoración corresponde a la administración oral de una sola dosis (1 cápsula) de 250 mgr. a las 8 a.m. con 150 ml. de agua. Para la toma de muestras de sangre, se hicieron venipuncturas 2, 4 y 8 horas después de la administración.

La droga A y la droga B se administraron alternativamente a las integrantes del grupo y en lapsos mínimos de un mes.

5. *Técnica de valoración empleada.*

Las modificaciones que se hicieron a la técnica de Cilindro-placa (14) (15) fueron fruto de los ensayos preliminares anteriormente descritos y cuyos resultados se discutirán más adelante. Esencialmente las respectivas modificaciones fueron las siguientes:

a) Inóculo: agregar al "agar para valoración" previamente fundido a $48^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ el cultivo del "germen test" a razón de 1.5 ml. de cultivo por cada 100 ml. del agar de valoración y agitar satisfactoriamente. El cultivo debe ser fresco y haberse desarrollado durante 17 - 18 horas a 37°C en caldo de cultivo ordinario.

b) Diluciones de empleo del Patrón. Se elaboraron diluciones que contienen 1.5, 1.2, 0.9 y 0.6 mcg/ml del Patrón, en una solución tampón de pH 4.5 o en una mezcla de la solución tampón con suero sanguíneo humano normal sin actividad antibiótica y en la proporción de 2 a 1 respectivamente.

Las primeras diluciones se emplean para valorar el antibiótico y las que contienen suero normal, para determinar su cantidad en el suero sanguíneo del voluntario.

c) Diluciones de los sueros problema. A diferencia de la técnica original, se emplean cuatro soluciones para el suero problema siguiendo el esquema que muestra el cuadro I.

Tanto las diluciones del Patrón como las de los sueros problema después de agitarlas se dejan en reposo durante 30 minutos, tiempo durante el cual se permite la adsorción que sufre el antibiótico con las proteínas del suero sanguíneo.

d) Se prepara un control de suero humano normal sin actividad con la solución tampón de pH 4.5, a razón de 1 ml. del primero por 2 ml. del segundo.

e) Predifusión. Como adición a la técnica original, se dejan en reposo (horizontalmente) durante una hora, a la temperatura ambiente, el conjunto de cajas en las cuales se han colocado las diluciones del Patrón y del Problema, para realizar la "predifusión".

Las diluciones del Patrón y del Problema se colocan a razón de 0.1 ml. para cada una, en los cilindros (diámetro interior 8.4 mm.) empleando por lo menos cinco diferentes y en cajas separadas para cada dilución.

- f) Incubación, lecturas y gráficas. Se colocan las cajas horizontalmente para su incubación de manera que reciban uniformemente una temperatura de 37° C durante 17-18 horas, al término de las cuales se hacen las lecturas y se promedian los resultados.

En papel milimetrado se grafican los valores de los logaritmos de las concentraciones contra los valores respectivos de los diámetros de las zonas de inhibición del crecimiento. Los cálculos se hacen utilizando la regla de tres simple.

RESULTADOS

Inóculo. En el cuadro II pueden observarse las respuestas obtenidas al elaborar diferentes concentraciones (desde 1.0 hasta 2.0%) de cultivos de *Bacillus cereus* var. *mycoides* (con 10, 18 y 24 horas de sembrados) en "agar para valoración".

Al cabo de 18 horas los resultados corresponden desde la presencia de colonias de difícil captación a simple vista (resultado insuficiente) hasta la exagerada proliferación del germen. El objeto principal de estos ensayos, fue obtener un inóculo homogéneo y uniforme que evite factores de error por falla o por exceso de desarrollo del germen.

CUADRO II

ASPECTO DEL INOCULO AL CABO DE 18 HORAS DE INCUBACION

Horas de incubación del cultivo	ml. % de cultivo en "agar para valoración"		
	1.0	1.5	2.0
9 - 10	Insuficiente	Insuficiente	Difuso
17 - 18	Insuficiente	homogéneo	Concentrado
23 - 24	Difuso	Concentrado	muy concentrado

Diluciones o concentraciones de empleo del Patrón. Las figuras 1 y 2 muestran los resultados obtenidos con el valor logarítmico de la concentración en mcg/ml. de Patrón en solución tampón pH 4.5. La figura 1 con valores que van de log. 0.4 a log. 2.0, muestra alteraciones en las zonas de inhibición que se evitan cuando se utilizan valores que van de log. 0.6 a log. 1.5 (figura 2).

Con el empleo de los valores logarítmicos anteriores, se pudo obtener la figura 3 que muestra cuánto antibiótico se adsorbe en las proteínas del suero cuando éste se mezcla con la solución tampón (1:2) y se fijó el tiempo mínimo en que se efectuó dicha adsorción. Los resultados obtenidos indican un 30% de pérdida de actividad en un lapso de 30 minutos.

En la figura 4 los mismos valores logarítmicos de la concentración del antibiótico permiten un exacto control de la actividad del Patrón de trabajo, con lo cual se obtiene la forma más ventajosa para su valoración.

Normas de calidad, pureza y actividad, "in vitro" de la U.S.P. XVIII para las cápsulas de oxitetraciclina HCl (18).

Tanto las cápsulas A como las B reúnen todos los requisitos establecidos por la U.S.P. XVIII.

Valoración de la equivalencia y la eficacia biológica.

Los niveles sanguíneos obtenidos en 60 valoraciones para las cápsulas de antibióticos A y las 60 del antibiótico B, están representados en la figura 5. Las cifras corresponden al promedio de las respectivas concentraciones.

En la comparación de los niveles sanguíneos obtenidos con las drogas A y B, encontramos diferencias de un 25% a las 2 horas, 30% a las 4 y 15% a las 8. Estas diferencias fueron muy significativas estadísticamente en todos sus puntos: $P < 0.005$.

Un valor importante de la variación relativa del promedio se obtiene con el "coeficiente de variación" (C. V.) que resulta al dividir la desviación "standard" por el promedio. Este parámetro estadístico da las reales diferencias que existen en una serie de datos que tienen la misma desviación "standard", pero con gran disparidad en los promedios. Por ejemplo, los promedios obtenidos a las 4 horas para la droga A y para la B tienen la misma desviación "standard": 0.42. Sin embargo el C. V. de la droga A es 0.41 y el de la droga B es 0.57, lo cual indica que el coeficiente de variación al comparar las dos drogas, es aproximadamente 1.5 veces mayor para la droga B (cuadros III y IV).

FIGURA No. 1

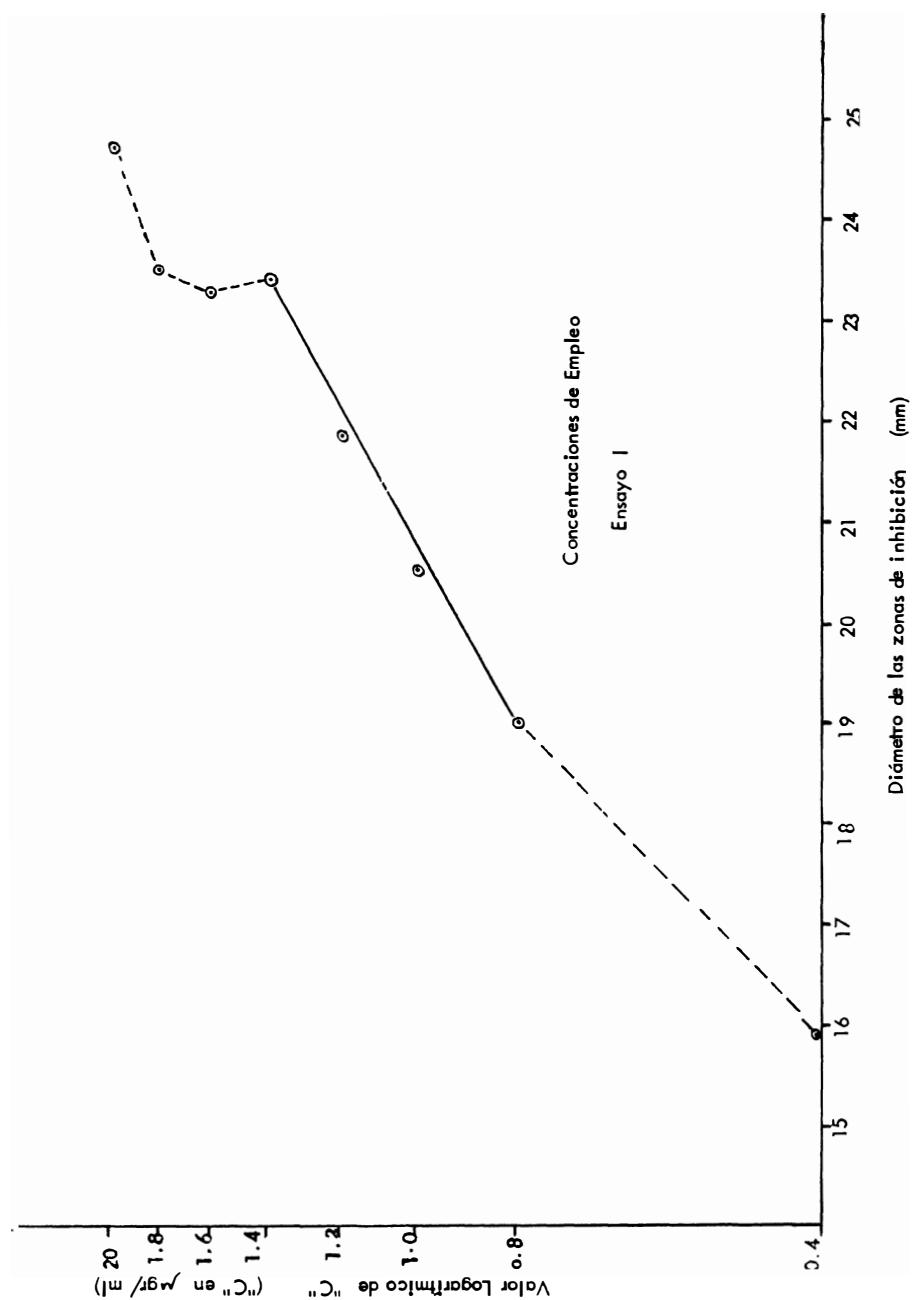


FIGURA No. 2

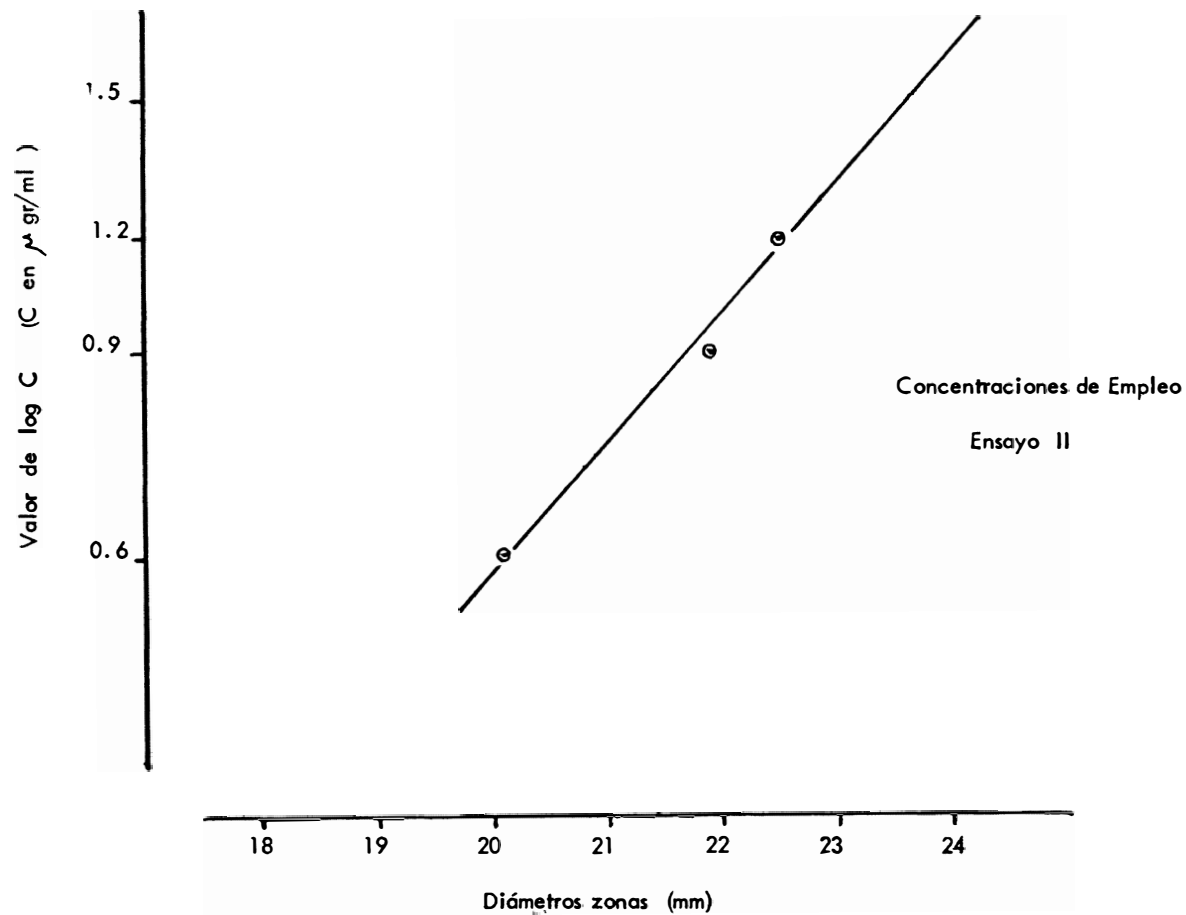
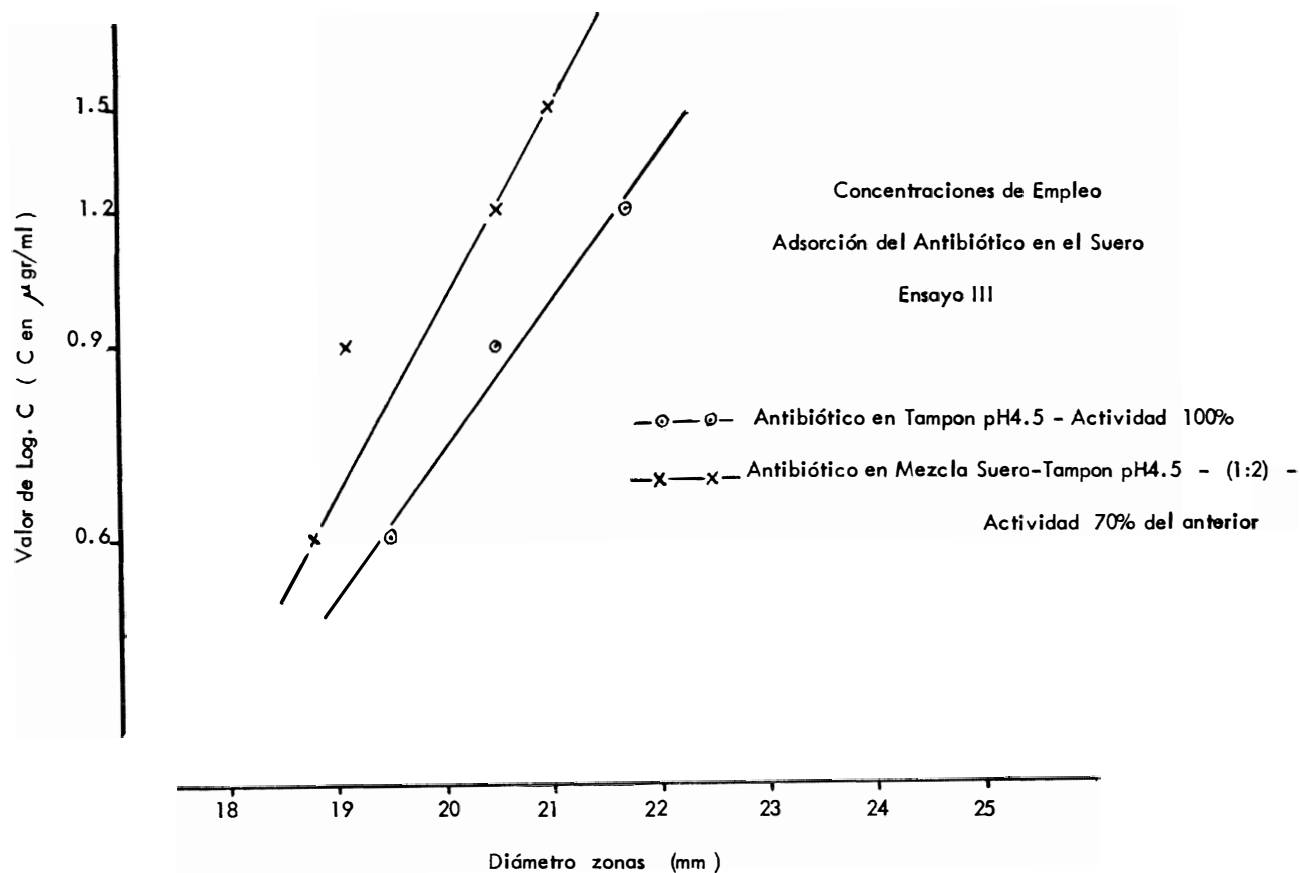
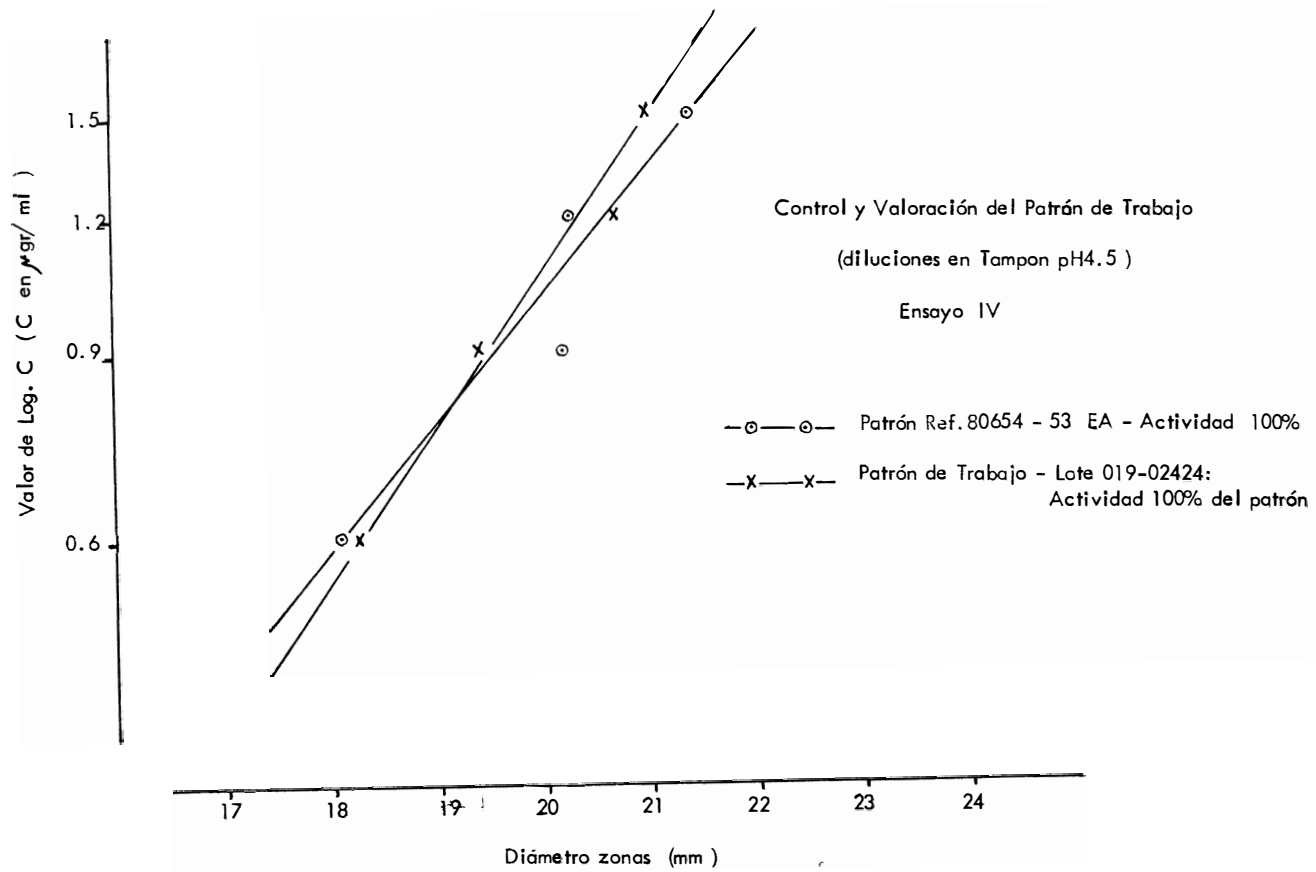


FIGURA No. 3





CUADRO III

PROMEDIO DE 60 CONCENTRACIONES DE OXITETRACICLINA
EN SUERO (mg/ml.).

Droga	2 horas P *	4 horas P	8 horas P
A	0.86 ± 0.31 **	1.02 ± 0.42	0.44 ± 0.27
	P < 0.005	P < 0.005	P < 0.005
B	0.66 ± 0.38	0.73 ± 0.42	0.37 ± 0.32

* Nivel de significancia estadística.

** Promedio \pm una desviación standard.

CUADRO IV

COEFICIENTE DE VARIACION (C. V.)

Droga	2 horas	4 horas	8 horas
A	0.35	0.41	0.60
	1.6 *	1.4	1.4
B	0.57	0.57	0.86

* Relación $\frac{B}{A}$

DISCUSION Y COMENTARIOS

Es indispensable hacer énfasis sobre la utilización de técnicas sencillas, prácticas, fácilmente reproducibles en todos sus pasos si se quieren obtener resultados ciertos en los ensayos de la bio-farmacia.

Todo bioensayo que pretenda valorar el contenido de determinadas sustancias en los tejidos y en líquidos del organismo, debe tener una especial exactitud, reduciendo hasta donde sea posible el error de la varianza, lo cual hace imperativo el control de las variables inherentes a él, tratando de convertirlas en constantes. La repetición sistemática del ensayo y la graficación de sus resultados puede permitir el hallazgo de parámetros relativamente inmodificables que facilitan el cálculo del error, obteniendo así una reproductibilidad que garantice su exactitud (19).

Inóculo. Las adaptaciones o modificaciones que se han hecho a la técnica preconizada por el F. D. A. (14) han permitido la obtención de un inóculo homogéneo que evita los errores de interpretación ocasionados por crecimientos abundantes o excesivamente pobres del germen (zonas de inhibición del crecimiento falseadas).

De acuerdo con los resultados obtenidos, la forma más ventajosa de realizar la siembra es inoculando un cultivo fresco del "germen test" en caldo ordinario dentro del "medio de valoración", fundido a $48^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, a razón de 1.5 ml. del cultivo para 100 ml. del "agar de valoración". El cultivo más favorable fue el obtenido por desarrollo del germen en caldo nutritivo durante 17-18 horas a 37°C .

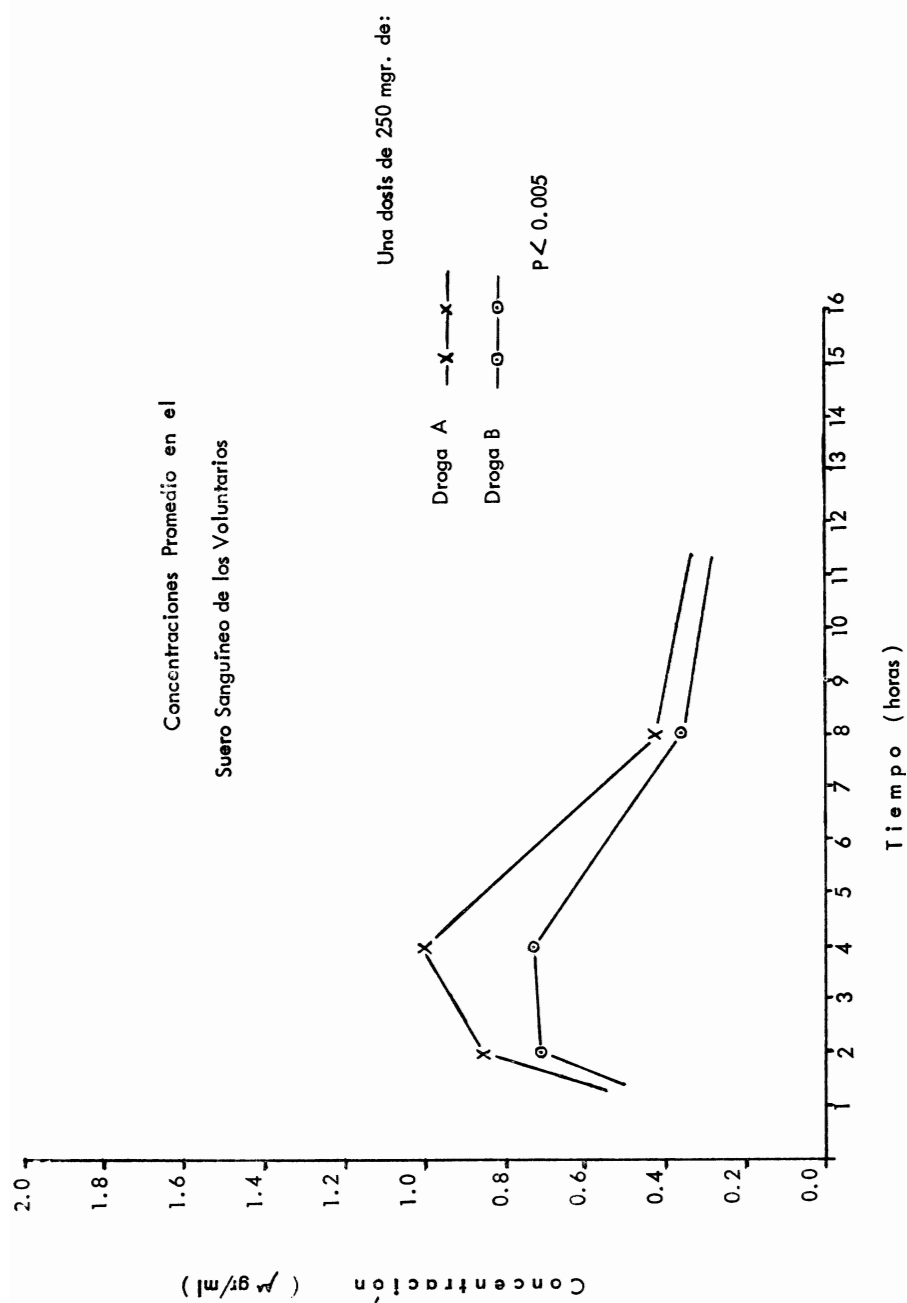
Difusión. Al hacer el análisis de las leyes de difusión se encuentra que las concentraciones de las soluciones empleadas tienen especial importancia (15) (16) (20) ya que ellas no dan origen en todas sus magnitudes a valores lineares de difusión como puede observarse en la figura 1, lo cual puede ser una causa de error. A diferencia de la técnica original se considera más aconsejable y adecuada la utilización de una secuencia de concentraciones que van de 0.6 a 1.5 mcg/ml., por ser más reproducible, como puede verse con claridad en la zona de linealidad de las figuras 1 y 2.

Adsorción. La adsorción de las drogas por las proteínas del plasma no sólo se debe a la interacción medicamento/proteína. Otros factores como las fuerzas de Van der Waals, las electrostáticas y la polaridad, actuando en combinación o solas, intervienen en la formación del complejo droga/proteína. Se presenta en proporción directa a la cantidad de sustancias adsorbentes que posea el medio, siendo necesario un tiempo mínimo para que se realice (15) (21).

Después de los ensayos previos para los cuales se empleó el Patrón diluido en solución tampón con pH 4.5 o en una mezcla como la anterior, pero adicionada con suero sanguíneo humano normal sin actividad antibiótica (2:1), se estableció que la adsorción se efectúa en no menos de 30 minutos y equivale a un 30%, es decir, que en ese lapso el antibiótico manifiesta apenas un 70% de su actividad (figura 3). Los resultados obtenidos demuestran la necesidad de emplear las diluciones después de dejarlas en reposo durante dicho tiempo y posteriormente a su agitación.

Predifusión. Esta variable, que no contempla la técnica original se considera muy importante, porque si ella no se ejecuta, si se hace en pocos minutos o por largo tiempo, los diámetros de las zonas de inhibición se hacen difusos, sin nitidez o irregulares. La predi-

FIGURA No. 5



fusión se toma como un punto de referencia primordial de la Ley de la Difusión de Fick (15) (20).

El tiempo óptimo corresponde a una hora, a la temperatura ambiente y antes de incubar las cajas.

Para obtener la inalterabilidad del Patrón, se efectuaron controles periódicos antes de cada valoración (figura 4).

Dentro de los modernos conceptos de la biofarmacia, la equivalencia y la eficacia biológica de los medicamentos no están supeditados únicamente a las variaciones inherentes de los seres vivos y/o a las condiciones puramente químicas o físicas de sus ingredientes o a las técnicas de su elaboración. Muchos factores, todavía no bien conocidos o definidos, relacionados con la absorción, el transporte, el metabolismo y la eliminación, pueden intervenir para hacer más eficaz, menos agresivo o más activo, a un complejo químico medicamentoso (17) (22).

Desde la absorción hasta la excreción o eliminación de un medicamento, además de las transformaciones metabólicas que sufre, se añaden las interacciones no específicas con los diferentes tejidos y con receptores especializados para que finalmente se presente su actividad. Dentro de este complejo proceso, los niveles sanguíneos del fármaco vienen a ser los más adecuados representantes para valorarlo.

En la figura 5 puede observarse claramente la no equivalencia biológica que presentan entre sí las cápsulas de oxitetraciclina HCl identificadas como A con las marcadas como B. Los valores corresponden a los promedios de las experiencias, son estadísticamente significativos y tiene un valor $P < 0.005$.

La mayor "eficacia biológica" de las cápsulas A de oxitetraciclina HCl en relación con las marcadas como droga B, demuestra una vez más, que el simple análisis químico o la valoración de la actividad "in vitro" o los índices de pureza que sirven como factores de identificación en las Farmacopeas, no confirman la bondad o la eficiencia de los fármacos. Debe tenerse muy en cuenta que tanto las cápsulas A como las B reúnen las condiciones fijadas por la U. S. P. XVIII.

Tal como lo afirma Blair y su colaboradores, la equivalencia química no es la equivalencia biológica para muchas sustancias, entre ellas la oxitetraciclina.

Reconocimiento. Los autores agradecen la amplia y eficaz colaboración de los profesores asistentes Angel Polo (Farmacología)

y José de Silvestri (Microbiología) en la realización del trabajo y al Hospital Militar Central de Bogotá, por la donación de Suero Humano Normal.

RESUMEN

En el presente estudio se demuestra que las Oxitetraciclinas - HCl de diferente origen no tienen la misma actividad biológica, así como tampoco ofrecen iguales propiedades de absorción-eliminación. En consecuencia se logran tasas sanguíneas diferentes, a pesar de poseer cada una de ellas iguales características químicas y cumplir las condiciones fijadas por la U. S. P. XVIII para pureza y calidad. Se administraron cápsulas de Oxitetraciclina-HCl con 250 mgr. de principio activo cada una, de dos procedencias diferentes a individuos jóvenes sanos y en la misma proporción para los dos sexos.

SUMMARY

This work demonstrates that Oxytetracyclines hydrochlorides from different origins do not have either the same biological activity nor the absorption-elimination properties. Although they had similar chemical characteristics and they met the U. S. P. XVIII standards for purity and quality, different blood levels were gotten with different oxytetracyclines.

Capsules of Oxytetracycline hydrochloride containing 250 mg. of the active substance were administered to healthy male and female young persons using the same doses for the two sexes.

RÉSUMÉ

Grâce à l'étude réalisé on a pus démontrer que les Oxytetracyclines - HCl de différente provenance n'ont pas la même activité biologique, de la même façon qu'elles n'offrent pas des propriétés équivalentes d'absorption-élimination. En conséquence on arrive a des taux sanguins différents, malgré que chaque une d'elles ont les mêmes caractéristiques chimiques et sont dans les normes établies par la U. S. P. XVIII en ce qui concerne la pureté et la qualité. Pendant la réalisation du travail on a administré des capsules d'Oxytetracycline - HCl avec 250 mgr. de principe active chaque une d'elles, avec deux procédures différentes à des jeunes sains et dans la même proportion pour les deux sexes.

BIBLIOGRAFIA

1. CARTER, A. K. Substitution for brandnamed drugs. *Canad. Med. Assoc. J.*; 88: 98 - (1963).
2. CAMINETSKY, S. Substitution for brandnamed drugs. *Canad. Med. Assoc. J.*; 88: 950 - (1963).
3. CAMPAGNA, F., CURETON, G., MIRIGIAN, R. *et al.*: Inactive Prednisone tablets U. S. P. XVI *J. Pharm. Sci.*; 52: 605 - 606 (1963).
4. SEARL, R. O., PERNARDWSKY, M. The biopharmaceutical properties of solid dosage forms: I. An evaluation of 23 brands of phenylbutazone tablets. *Canad. Med. Assoc. J.*; 96: 1513 - 1520 (1967).
5. BLAIR, D. C., BARNES, R. W., WILDNER, E. L., MURRAY, W. J. Biological Availability of Oxitetracycline HCl Capsules, *J. A. M. A.*; 215: 251 - 254. (1971).
6. BRICE, G. W., HAMMER, H. F. Therapeutic nonequivalence of Oxitetracycline Capsules. *J. A. M. A.*; 208: 1189 - 1190 (1969).
7. MARTIN, C. M., RUBIN, M. O., MALLEY, W. E. *et al.*: Comparative physiological availability of "brand" and "generic" drugs in man: Chloranphenicol, Sulfisoxazole and diphenylhydantoine. *The Pharmacologist*; 10: 167 - (1968).
8. GLAZKO, A. J., KINKEL, A. W., ALEGNANI, W. C. *et al.*: An avaluation of the absortion characteristics of different chloranphenicol preparations in normal human subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.*; 9: 472 - 483 (1968).
9. LOZINSKI, E. Physiological Availability of dicumarol. *Canad. Med. Assoc. J.*; 88: 950 - (1963).
10. CATZ, R., GINSBURG, E., SOLENGER, S. Clinically inactive thyroid U. S. P. A preliminary report. *New Eng. J. Med.*; 266: 136 - 137 (1962).
11. PFEIFFER, C. C., GOLDSTEIN, I., MURPHREE, B. *et al.*: Bioassay of different formulations of aspirin by means of human E.E.G. *J. Pharm. Sci.*; 56: 1338 - 1340 (1967).
12. MORGAN, A. M., TRUITT, E. B. JR. Evaluation of acetylsalicytic acid enterase in aspirin metabolism: Interspecies comparison. *J. Pharm. Sci.*; 54: 1640 - 1646 (1965).
13. "Task Force on Prescription Drugs: Final Report". Dept. of Health, Education and Welfare - 1969 P. X.
14. "Cylinder Plate Assay for oxitetracycline in Serum". National Center for Antibiotics and Insulin Analysis Food and Drug Administration. Dept. of Health, Education and Welfare. Washington, D. C. 20206 - 1969.
15. KANAVAGH, FREDERICK. "Analytical Microbiology" 2th. Ed. Academic Press. Inc., New York - 1969.

pp. difusión: 4.

Inóculo: 47 - 55.

Concentraciones del antibiótico: 5 - 21.

Predifusión: 27 - 38 y 79 - 86.

Lecturas: 38 - 46.

Adsorción: 56 - 66.

Controles (g): 65 - 70.

Valoración de Tetraciclina: 344.

16. BARROW, GORDON H. "*Química Física*", Tomo 2, 2a. Ed., p. 841. Editorial Reverté S. A., Barcelona, 1968.
17. RESIGNO, ALDO and SEGRE, GIORGIOS. "*Drug and Tracer Kinetics*" 1st. Ed., pp. 4 - 23 Blaisdell Publishing Co. Waltham Mass. (1966).
18. *U. S. Pharmacopeia* XVIII ed., p. 468. Mack Printing Co. Easton PA - 1970.
19. BLISS, C. I. Quantitative aspects of biological assay. *J. Am. Pharm. A. (Scient. ed.)*; 24: 465 - 475 (1940).
20. GRANT, J. *Mathematics of Diffusion*. Oxford University Press, London, 1964.
21. GOLDSTEIN, A. Interactions of drugs and plasma proteins. *Pharmacol. Rev.*; 1: 102 - 165 (1949).
22. ARIENS, E. J. (ed.). *Molecular Pharmacology: "The Mode of action of Biological active Compounds"* Vol. I, Academic Press N. Y. 1964.