



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Depto. de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas

Estudio preliminar de bioequivalencia "in vitro" de comprimidos genéricos de clorfenamina maleato comercializados en Chile

Memoria para optar al Título de Químico Farmacéutico

MARÍA FRANCISCA MORAGA FRÍAS

Profesor Patrocinante:

Dra. Q.F. María Nella Gai H.

Directora de Tesis:

Mg. QF. Edda Costa C.

Santiago, Chile

2008

*“Por ser parte de
este gran sueño
que hoy
comienza a
hacerse
realidad”*

*A mis padres y
hermana Marta*

AGRADECIMIENTOS

Tengo una profunda gratitud con tantas personas que ayudaron en mi carrera universitaria, que para enumerarlas a todas se necesitarían muchas páginas. He querido destacar a las siguientes:

A la profesora Edda Costa por su dedicación y apoyo.

Al Cuerpo Docente del laboratorio de Tecnología Farmacéutica, por sus consejos y ayuda en mi labor diaria.

Al Personal Técnico del laboratorio, por su colaboración y por hacer mas amenos los momentos de trabajo.

A mis padres, Olga y Augusto, por su amor incondicional, su esfuerzo, por ser mi ejemplo y mis mejores amigos. No hay forma de recompensar todo lo que han hecho por mí, la persona que soy es gracias a ustedes, los amo.

A mi familia, mis madrinas Sandra y Nancy, a mi tía Rosita que aunque ya no esta presente siempre esta conmigo y a tía Ani, por preocuparse siempre por mi, gracias

A Juan, el hombre que alegra mis días con su amor y ternura, por ser mi apoyo incondicional, eres mi presente y mi futuro, mil gracias.

A mis queridas amigas, Verónica, Patricia, y Gloria gracias por estar a mi lado en cada momento de mi vida, por sus consejos y ayuda en las etapas difíciles y en las situaciones de alegría. Siempre estarán en mi corazón.

Finalmente agradezco a Dios, que lo he sentido a mi lado en cada paso de este camino.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	vi
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	x
1 INTRODUCCIÓN	1
2 HIPÓTESIS	6
3 OBJETIVOS	7
3.1 Objetivo general	7
3.2 Objetivos específicos.....	7
4 MATERIALES	8
4.1 Equipos	8
4.2 Reactivos	8
4.3 Material de uso general.....	9
5 METODOLOGÍA.....	10
5.1 Validación de la metodología analítica	10
5.1.1 Exactitud	11
5.1.2 Especificidad	11
5.1.3 Precisión	11
5.1.4 Linealidad	12
5.2 Controles de calidad de los comprimidos de clorfenamina maleato	12
5.3 Cinética de disolución.....	14
6 RESULTADOS	18
6.1 Validación de la metodología	18
6.1.1 Exactitud	18
6.1.2 Precisión	19
6.1.3 Especificidad	19
6.1.4 Linealidad	20

6.2	Caracterización de los comprimidos	25
6.3	Controles de calidad	26
6.3.1	Características físicas.....	26
6.3.2	Uniformidad de contenido	28
6.3.3	Valoración.....	29
6.4	Cinéticas de disolución.....	30
6.4.1	Perfiles de disolución medio HCl 0,1N.....	30
6.4.2	Factor de diferencia (f_1) y factor de similitud (f_2) medio HCl 0,1N	32
6.4.3	Perfiles de disolución medio tampón acetato pH 4,5	33
6.4.4	Factor de diferencia (f_1) y factor de similitud (f_2) tampón acetato pH 4,5 .	35
6.4.5	Análisis estadístico de los porcentajes disueltos.	37
7	DISCUSIÓN	38
8	CONCLUSIONES.....	40
	ANEXO 1	43
	ANEXO 2	44
	ANEXO 3.....	47
	ANEXO 4.....	50
	ABREVIATURAS.....	56

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1: CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO.....	10
TABLA 2: CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA EVALUAR DISOLUCIÓN <i>IN VITRO</i> SEGÚN USP 30 ^b	14
TABLA 3: PRECISIÓN DE LAS METODOLOGÍAS OCUPADAS.....	19
TABLA 4: LINEALIDAD DE METODOLOGÍA EN ESPECTROFOTÓMETRO UV.....	21
TABLA 5: LINEALIDAD DE METODOLOGÍA EN HPLC MEDIO HCL 0,1N	22
TABLA 6: LINEALIDAD DE LA METODOLOGÍA EN HPLC MEDIO TAMPÓN ACETATO PH 4,5	24
TABLA 7: CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LOS COMPRIMIDOS ANALIZADOS.....	25
TABLA 8: PROMEDIO DE PESO, DUREZA Y DIMENSIONES DE COMPRIMIDOS ESTUDIADOS ...	26
TABLA 9: UNIFORMIDAD DE CONTENIDO (% SOBRE LO DECLARADO) DE LOS COMPRIMIDOS ENSAYADOS.	28
TABLA 10: VALORACIÓN DE LOS PRODUCTOS EN ESTUDIO (% SOBRE LO DECLARADO).....	29
TABLA 11: PORCENTAJE PROMEDIO DE CLORFENAMINA MALEATO LIBERADO DESDE LOS COMPRIMIDOS EN ESTUDIO.....	30
TABLA 12: F ₁ Y F ₂ PARA MEDIO HCL 0,1 N.....	33
TABLA 13: PORCENTAJE PROMEDIO DE CLORFENAMINA MALEATO LIBERADO DESDE LOS COMPRIMIDOS EN ESTUDIO, EN MEDIO TAMPÓN ACETATO PH 4,5.	33
TABLA 14: F ₁ Y F ₂ PARA MEDIO TAMPÓN ACETATO PH 4,5.....	36
TABLA 15: COMPARACIÓN DE LAS FORMULACIONES ESTUDIADAS EN AMBOS MEDIOS ESTUDIADOS.	37
TABLA 16: EXACTITUD DE LA METODOLOGÍA EN ESPECTROFOTÓMETRO UV.....	44
TABLA 17: EXACTITUD Y PRECISIÓN DE METODOLOGÍA EN HPLC EN MEDIO HCL 0,1N	44
TABLA 18: EXACTITUD Y PRECISIÓN DE LA METODOLOGÍA EN HPLC EN MEDIO TAMPÓN ACETATO PH 4,5.....	45
TABLA 19: VALORES DE DUREZA (Kp) DE LOS COMPRIMIDOS ANALIZADOS	48
TABLA 20: VALORES DE PESO Y PESO PROMEDIO DE LOS COMPRIMIDOS ANALIZADOS	49
FIGURA 1: MOLÉCULA DE CLORFENAMINA MALEATO	5

FIGURA 2: CURVA DE CALIBRACION HCL 0,01N.....	21
FIGURA 3: CURVA DE CALIBRACIÓN MEDIO HCL 0,1N.....	23
FIGURA 4: CURVA DE CALIBRACIÓN MEDIO TAMPÓN ACETATO PH 4,5.....	24
FIGURA 5: COMPARACIÓN DE PERFILES DE DISOLUCIÓN PROMEDIO EN MEDIO HCL 0,1N..	31
FIGURA 6: COMPARACIÓN DE PERFILES DE DISOLUCIÓN PROMEDIO EN MEDIO TAMPÓN ACETATO PH 4,5.....	35
FIGURA 7: PERFILES DE DISOLUCIÓN LABORATORIO A HCL 0,1N (12 COMPRIMIDOS)	50
FIGURA 8: PERFILES DE DISOLUCIÓN LABORATORIO B HCL 0,1N (12 COMPRIMIDOS)	51
FIGURA 9: PERFILES DE DISOLUCIÓN LABORATORIO C HCL 0,1N (12 COMPRIMIDOS).....	51
FIGURA 10: PERFILES DE DISOLUCIÓN LABORATORIO D HCL 0,1N (12 COMPRIMIDOS)	52
FIGURA 11: PERFILES DE DISOLUCIÓN LABORATORIO A MEDIO TAMPÓN ACETATO PH 4,5 (12 COMPRIMIDOS)	53
FIGURA 12: PERFILES DE DISOLUCIÓN LABORATORIO B MEDIO TAMPÓN ACETATO PH 4,5 (12 COMPRIMIDOS)	54
FIGURA 13: PERFILES DE DISOLUCIÓN LABORATORIO C MEDIO TAMPÓN ACETATO PH 4,5 (12 COMPRIMIDOS)	54
FIGURA 14: PERFILES DE DISOLUCIÓN LABORATORIO D MEDIO TAMPÓN ACETATO PH 4,5.	55

RESUMEN

Los estudios de bioequivalencia permiten demostrar si un principio activo tiene el mismo desempeño farmacocinético en el medicamento genérico como en el innovador o de referencia establecido por la autoridad sanitaria del país.

La clorfenamina maleato, es el primer fármaco seleccionado por el Instituto de Salud Pública (ISP) para optar a bioexención en Chile, ya que por su alta solubilidad y baja permeabilidad clasifica en el grupo 3 del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB), lo que le permite establecer bioequivalencia a través de ensayos *in vitro* en los medios de disolución determinados por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

En esta investigación se efectuó un estudio preliminar de bioequivalencia *in vitro* de clorfenamina maleato en comprimidos de 4 mg, de 4 laboratorios nacionales.

Se realizaron los controles de calidad de las formas farmacéuticas sólidas, los cuales estuvieron dentro de los rangos aceptados por The United States Pharmacopeia 30 (USP30).

Se validó la metodología a utilizar tanto en la valoración como en la cinética de disolución de los comprimidos a evaluar. La validación se realizó de acuerdo a los criterios estipulados en la USP 30.

La valoración de los productos de los distintos laboratorios a analizar se realizó según lo señalado en la USP30, cuantificando los comprimidos a través de espectrofotometría UV a 265 nm. La validación de la metodología estuvo dentro de los límites aceptados, cumpliendo así con las exigencias que establece la USP30.

Los perfiles de disolución fueron cuantificadas a través de la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Estos perfiles se compararon a través de un método estadístico modelo independiente, factor de diferencia (f_1) y de similitud (f_2), y a través de un programa estadístico ANOVA, los cuales revelaron que las curvas de disolución son distintas entre los productos del laboratorio de referencia y los laboratorios analizados, ya que f_1 y f_2 estuvieron fuera de los rangos establecidos en ambos medios estudiados. Sin embargo, para los efectos de demostrar bioequivalencia, estas diferencias no serían relevantes, ya que el proceso de disolución

desde la forma farmacéutica es muy rápida, en un tiempo menor al necesario para que se produzca el vaciamiento gástrico, lo que no afectaría el proceso de absorción.

Este es un estudio preliminar que sentó las bases y resolvió las dificultades para acometer en un futuro un estudio según lo establece la norma chilena, que estipula que el análisis debe hacerse sobre 3 lotes de fabricación del producto en estudio.

ABSTRACT

Preliminary bioequivalence studies “in vitro” of generic tablets of Clorfenamina maleato commercialized in Chile.

Studies on bioequivalence allow demonstrating whether an active principle presents the same pharmacokinetic performance in generic medicine as in the reference one or the innovative, established by the sanitary authority of the country.

Clorfenamina maleato is the first drug chosen by Public Health Institute (Instituto de Salud Publica- ISP) in order to qualify for bioexemption in Chile, due to its high quality for being diluted and low permeability make it feasible to belong to group 3 of the Biopharmaceutical Classification System which, at the same time, enables it to establish bioequivalence through *in vitro* experiments according to the means of dissolution stated by the WHO (World Health Organisation).

A preliminary study of bioequivalence *in vitro* was carried out in this investigation on clorfenamina maleato 4 mg. tablets, from four different national laboratories.

The controls of quality of the solid pharmaceutical forms were made which were within the ranks accepted by The United States Pharmacopeia 30 (USP30).

The methodology was validated to use as in the assay as in the kinetic one of dissolution of tablets to evaluate. The validation was made according to the stipulated criteria in technical guide G-BIOF 02.

Measurements of the different laboratories analysed was carried out according to the USP 30, quantifying the drugs through spectrophotometry UV at 265 nm.

The validation of the methodology was within the accepted limits, thus fulfilling with the exigencies that ICH Q2B establishes and of technical guide G-BIOF 02.

Dissolution profiles were quantified by high resolution liquid chromatography (HPLC). These profiles were compared through an independent statistical model method, difference factor (f_1) and similarity (f_2) and through ANOVA which revealed that the dissolution curves are different between the analyzed products of the reference laboratory and laboratories, since f_1 and f_2 were outside the ranks established in both studied means. However, this differences wouldn't be important to demonstrate

bioequivalence because the dissolution of the pharmaceutical form it happens in a minor time than the gastric voidance wich doesn't affect the absortion.

This is a preliminary study that laid the foundations and solved the difficulties in order to undertake a study in the future according to the Chilean standard, that stipulates that the analysis has to be done in 3 lots of manufacture.

1 INTRODUCCIÓN

Los medicamentos desempeñan un papel importante tanto en la salud de las personas como en la economía de los países.

En la actualidad se encuentran disponibles gran número de medicamentos, los cuales son distribuidos por variados fabricantes, importadores y distribuidores. Sin embargo, las leyes y reglamentos para su autorización y control son con frecuencia incompletos, lo que afecta el alcance de los objetivos contenidos en las políticas de salud¹.

El aumento en los precios de miles de productos de uso diario, hace que la población busque los mejores beneficios a los menores costos. Dentro de estos productos, se incluyen los medicamentos, donde los precios más económicos frecuentemente se encuentran en los llamados medicamentos genéricos. La venta de estos medicamentos superan el 39,38% en Chile², por lo tanto, el que estos productos cumplan con las normas de calidad y de bioequivalencia establecidas, es fundamental para proteger la salud de la población.

En Chile, existen especialidades farmacéuticas autorizadas por los organismos regulatorios sin estudios que demuestren que pueden ser intercambiados en la práctica clínica, sin riesgo para los pacientes. Los medicamentos que se expenden en nuestro país, por lo tanto, son similares en su denominación genérica, pero sin pruebas que demuestren su equivalencia terapéutica o bioequivalencia con el innovador, el cual es la primera especialidad farmacéutica que obtiene la autorización para comercializarse, comúnmente como producto patentado.

La reglamentación vigente define al “medicamento genérico” como aquel que se distribuye o expende rotulado con el nombre genérico del principio activo, o sea, sin una marca o nombre comercial³. Por lo tanto, el Instituto de Salud Pública (ISP) no registra medicamentos genéricos intercambiables con el innovador.

La gran cantidad de productos que son equivalentes farmacéuticos, es decir, que contienen los mismos principios activos o sus sales o ésteres, en idéntica cantidad

y vía de administración, hace imprescindible la evaluación de cada uno de ellos con el objetivo de que la intercambiabilidad entre ellos sea segura y cumplan con los mismos estándares de calidad, eficacia y seguridad que el producto de referencia o innovador⁴.

Para establecer intercambiabilidad se exige el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), especificaciones de calidad y equivalencia terapéutica⁴.

Para demostrar equivalencia terapéutica se realizan en forma comparativa estudios de biodisponibilidad, estudios farmacodinámicos y estudios clínicos *in vivo*. Gracias a los avances científicos y tecnológicos en el área de la biofarmacia, estos estudios han podido ser reemplazados para determinados medicamentos, por estudios comparativos de cinéticas de disolución *in vitro*³.

Los estudios de bioequivalencia permiten demostrar si un principio activo tiene el mismo desempeño farmacocinético en un medicamento genérico como en el innovador, para así considerarlos intercambiables y garantizar su eficacia clínica.









Hay que considerar, que los estudios de bioequivalencia no se utilizan solamente para los fármacos genéricos, sino que también por los laboratorios investigadores cuando se realizan modificaciones a la formulación. Además, constituyen la base para la autorización de la comercialización de los fármacos genéricos.

La demostración de la equivalencia terapéutica de los productos farmacéuticos sin necesidad de efectuar estudios comparativos *in vivo*, es lo que se conoce como bioexención, la que constituye una prueba *in vitro* y cuyos fundamentos teóricos se encuentran en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB)⁴.

La SCB es un marco científico de referencia que clasifica los principios activos basándose en su solubilidad en agua y permeabilidad intestinal⁴. Este considera tres factores principales que gobiernan la velocidad y el grado de absorción de los principios activos desde la forma farmacéutica sólida de dosificación inmediata o convencional que son³:

- Disolución
- Solubilidad
- Permeabilidad intestinal

Así los principios activos se clasifican de la siguiente manera:

- Clase 1: Fármacos de  solubilidad -  permeabilidad
- Clase 2: Fármacos de  solubilidad -  permeabilidad
- Clase 3: Fármacos de  solubilidad -  permeabilidad
- Clase 4: Fármacos de  solubilidad -  permeabilidad

Las condiciones para optar a bioexención de estudios *in vivo* son las siguientes⁵:

- Alta solubilidad
- Alta permeabilidad
- Disolución rápida y similar al producto innovador
- Fármacos con un margen terapéutico no estrecho
- Formulaciones no diseñadas para ser absorbidas en la cavidad oral

Si el medicamento cumple con estas condiciones (Clase 1), puede optar a la bioexención, realizándose pruebas de disolución *in vitro* que darán cuenta si es o no bioequivalente con el innovador.

En el año 2006, la OMS extendió la bioexención a los productos formulados con principios activos de la Clase 3 que tengan una muy rápida disolución, entiéndase a lo menos 85 % disuelto en 15 min, en los 3 medios de disolución establecidos (pHs: 1,2; 4,5 y 6,8).

El objetivo de este trabajo consistió en la determinación preliminar de equivalencia terapéutica *in vitro* de un medicamento de alto consumo en la población como es la clorfenamina maleato, ya que más de 300 millones de personas en el mundo sufren de asma y alergias respiratorias³, siendo este uno de los tratamientos más tradicionales para estas patologías tanto por su rápida acción y bajos costos.

La clorfenamina maleato o clorfeniramina es un derivado de la propilamina, fármaco de primera generación que compite con la histamina por los receptores H₁ presentes en las células efectoras, por consiguiente, evitan pero no revierten las respuestas mediadas sólo por la histamina. Antagoniza bien el aumento de la permeabilidad capilar, el prurito, la broncoconstricción y la contracción intestinal cuando son producidos estrictamente por la histamina. Las acciones antimuscarínicas producen un efecto secante en la mucosa oral. Atraviesa la barrera hematoencefálica y produce sedación debida a la ocupación de receptores H₁ cerebrales, que están implicados en el control de los estados de vigilia⁶.

Se absorbe bien tras la administración oral o parenteral. Su unión a las proteínas es de 72%. Se metaboliza principalmente en el hígado, su vida media es de 13 a 20 horas, la duración de la acción es de 4 a 6 horas y se elimina por vía renal⁶.

La clorfenamina posee un pK_a de 9,13 a 25°C, además consta de cualidades como ser altamente soluble (160 g/L) y tener una baja permeabilidad lo que la clasifica según la SCB en medicamento Clase 3⁶.

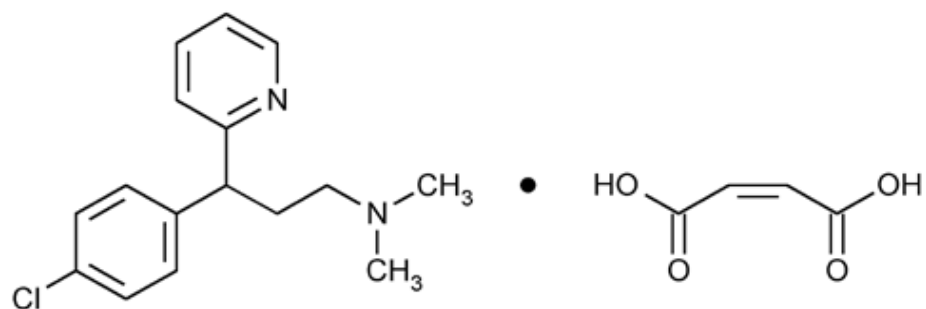


FIGURA 1: Molécula de clorfenamina maleato

En el mercado chileno se encuentran una gran variedad de medicamentos similares, entre los cuales existen ocho productos que se comercializan con el nombre del principio activo –clorfenamina-. Para este estudio, se eligieron 3 laboratorios nacionales más el laboratorio del producto de referencia el cual fue designado por el ISP en mayo del 2008¹³.

2 HIPÓTESIS

Se esperaría que la existencia de una variedad de productos genéricos de clorfenamina maleato fueran equivalentes terapéuticos, y de cuyas cinéticas de disolución se obtuvieran valores de factor de similitud y de diferencia dentro de los parámetros reglamentados por la norma chilena.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar en forma preliminar la bioequivalencia *in vitro* de comprimidos genéricos de clorfenamina maleato comercializados en Chile.

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar los parámetros analíticos que permitan validar el espectrofotómetro UV-VIS y HPLC utilizados en el estudio
- Evaluar las características físico-químicas de comprimidos genéricos y de referencia de clorfenamina maleato de 4 mg.
- Evaluar los perfiles de disolución de comprimidos genéricos de clorfenamina maleato de 4 mg de cuatro laboratorios nacionales comercializados en el mercado nacional.
- Establecer en forma preliminar la equivalencia terapéutica *in vitro* entre los productos evaluados y el producto de referencia a través de un modelo método independiente, factor de diferencia (f_1) y similitud (f_2).

4 MATERIALES

4.1 Equipos

- Bidestilador
- Balanza analítica DENWER Instrument
- Durómetro ERWEKA, modelo TBTIS
- Equipo de Disolución PHARMA TEST, modelo PTWSIII
- pHmetro, modelo PHSJ-3F
- Equipo de filtración al vacío Millipore, modelo XX5522050, N° de serie 0295
- Espectrofotómetro Milton Roy Spectronic, modelo Genesys 5
- Estufa Memmert (20 a 220°C)
- Equipo HPLC, compuesto por:
 - Bomba Merck Hitachi, modelo L-6200
 - Detector UV-Vis Merck Hitachi, modelo L-4250
 - Interface Merck Hitachi, modelo D-6000A
 - Muestreador Merck Hitachi, modelo LaChrom L-7250
 - Software para integración HMS versión 4.0
- Columna C8 Merck Purospher® STAR RP-8 5µm 4,6 x 250 mm

4.2 Reactivos

- Estándar secundario clorfenamina maleato
 - N° de análisis: SEC-0013
 - Potencia: 99,08%
 - Vencimiento: Noviembre 2008
- Solución Titrisol® NaOH 0,5N (Merck)
- Hexano p.a. (Merck)
- Ácido clorhídrico concentrado 10N p.a. (Merck)
- Acetonitrilo grado HPLC (Merck)
- Fosfato monobásico de potasio p.a. (Merck)

- Hidróxido de sodio en lentejas p.a. (Merck)
- Acido acético glaciado p.a. (Merck)
- Acetato de sodio p.a. (Winkler)
- Agua bidestilada
- Agua desaireada
- Solución de lavado Extran® al 2% (Merck)

4.3 Material de uso general

- Material de vidrio clase A de uso común en laboratorio
- Papel filtro Advantec, grado n°5A, tamaño 0,9cm
- Filtros membrana GV (Durapore) EM PVDF; 0,22µm de poro, 13 mm de diámetro, hidrofílica, blanca, lisa, 100/CX. Millipore
- Porta filtro Sweenex ® Millipore
- Jeringas plásticas de 10 mL
- Cubetas de cuarzo, calidad 2, tipo 1, material Q, de 1 cm.

5 METODOLOGÍA

5.1 Validación de la metodología analítica

La validación es una instancia fundamental para asegurar que los análisis obtenidos sean fiables. La USP30 establece los parámetros analíticos a validar según el procedimiento a realizar, de esta forma se encuentran 4 categorías⁸:

- Categoría I: los procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos.
- Categoría II: los procedimientos analíticos para determinación de impurezas
- Categoría III: los procedimientos analíticos para determinación de características de desempeño
- Categoría IV: los procedimientos analíticos de identificación.

TABLA 1: Características de desempeño analítico

Características	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Prueba límite cuantitativa	Prueba límite cualitativa		
Exactitud	Sí	Sí	*	*	No
Precisión	Sí	Sí	Sí	Sí	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	*	Sí
Limite Detección	No	No	Sí	*	No
Limite Cuantificación	No	No	No	*	No
Linealidad	Sí	Sí	No	*	No
Intervalo	Sí	Sí	*	*	No

* Pueden referirse de acuerdo a la naturaleza de la prueba analítica

En consecuencia, se realizaron los siguientes parámetros analíticos:

5.1.1 Exactitud

Corresponde a la cercanía entre el valor obtenido en el análisis y el valor considerado como verdadero⁹. Matemáticamente se expresa como porcentaje de recuperación y constituye un indicio de errores sistemáticos según la siguiente fórmula¹⁰:

$$R = \frac{\bar{X}}{\mu} \times 100$$

donde:

R= porcentaje de recuperación

μ = valor aceptado como verdadero

\bar{X} = Valor medio obtenido

La exactitud se realiza utilizando un mínimo de 9 determinaciones, por ejemplo 3 concentraciones por triplicado, en el rango específico de trabajo¹⁰.

Criterio: una recuperación del 95-105% es aceptable, donde el coeficiente de variación deberá ser $\leq 2\%$ ¹¹

5.1.2 Especificidad

Es la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya existencia resulta previsible. Se realizara a través de HPLC comparando una muestra estándar con una muestra de los productos a analizar.

5.1.3 Precisión

Denota el grado de concordancia entre una serie de mediciones obtenidas a partir de múltiples determinaciones de una misma muestra homogénea, se expresa usualmente como la varianza, desviación estándar o coeficiente de variación (CV %). En este estudio, se obtiene la repetibilidad que es una expresión de la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un corto período de tiempo, determinando así la precisión intraensayo⁹. La repetitividad puede ser evaluada usando un mínimo de 6 determinaciones al 100% de la concentración de trabajo o determinando 3 concentraciones por triplicado¹⁰.

Criterio: el coeficiente de variación no deberá ser mayor al 2%¹¹

5.1.4 Linealidad

Corresponde a la capacidad de un método de entregar resultados linealmente proporcionales a la concentración del analito a medir, a lo largo del rango del procedimiento analítico a validar⁹. Se determina directamente de analito, por la dilución de una solución estándar, a través de la regresión lineal entre la concentración de las muestras y las lecturas correspondientes, utilizando como parámetro el coeficiente de correlación (r). Para establecer linealidad se recomiendan como mínimo 5 concentraciones del estándar¹⁰.

Criterios: el coeficiente de determinación (r^2) no debe ser menor a 0,98 y el factor respuesta con coeficiente de variación menor al 5%¹¹

5.2 Controles de calidad de los comprimidos de clorfenamina maleato

- Características de los comprimidos de los 4 laboratorios a analizar.
- Dimensiones: se determina altura y diámetro a los comprimidos utilizando para ello un pie de metro. Se evalúan 10 comprimidos al azar de cada laboratorio.
- Dureza: en forma individual se determina la dureza de 10 comprimidos escogidos al azar de cada laboratorio, utilizando para ello un durómetro.
- Peso: se evalúa el peso de 20 comprimidos de clorfenamina de cada laboratorio, en una balanza analítica. Como criterio de aceptación se admite un coeficiente de variación menor al 10%, para comprimidos con una posología menor a 130 mg¹².
- Uniformidad de contenido: se desarrolla de acuerdo a la metodología indicada en la USP 30⁸. Se define como el grado de uniformidad en el contenido del fármaco entre las unidades de dosificación. Se basa en la valoración del contenido individual de un fármaco en un número de unidades de dosificación para determinar si el contenido individual se encuentra dentro de los límites fijados⁸. Para determinar el valor de aceptación (AV) se utiliza la siguiente formula:

$$AV = (M - \bar{x}) + k*s$$

donde:

M: valor de referencia el cual toma valores según el \bar{x} .

Si $\bar{x} < 98,5\%$, $M=98,5$

Si $\bar{x} > 101,5\%$, $M=101,5$

Si \bar{x} esta entre 98,5 y 101,5%, $M=\bar{x}$

\bar{x} : promedio de los contenidos individuales expresados como porcentaje de la cantidad evaluada.

k: constante de aceptabilidad, la cual toma valor de 2,4 cuando $n=10$, siendo n el numero de muestra.

s: desviación estándar.

Como criterio de aceptación $AV \leq 15$

- Valoración: este procedimiento se realiza según lo indicado en la USP 30, la cual tiene como exigencia que los comprimidos no deben contener menos de un 90% ni más de un 110% de lo declarado por el laboratorio⁸. En este ensayo se pesaron y pulverizaron 20 comprimidos de cada laboratorio a analizar. De esta mezcla se pesó el equivalente a 4 mg de clorfenamina maleato y fueron transferidos a un embudo de separación. Se agregaron 20 mL de HCl 0,01N y se agitó por 5 minutos. Luego se agregaron 20 mL de hexano, se agitó y filtró el ácido llevándolo a un segundo embudo de separación. A la fase orgánica se le agregan 2 porciones de 10 mL de HCl 0,01N. Se filtra la fase acuosa, llevándola al segundo embudo, desechando la fase orgánica. Al segundo embudo se le agrega 10 mL de NaOH al 10% y 50 mL de hexano. Se agita y transfiere la fase acuosa a un tercer embudo de separación que contenía 50 mL hexano. Nuevamente se agita y se desecha la fase acuosa. Se lava cada porción de hexano con 20 mL de agua bidestilada, desechando esta última. Se extrajeron las 2 soluciones de hexano con dos porciones de 20 mL de HCl 0,01N y una porción de 5 mL de HCl 0,01 N, extrayendo el primer embudo y luego el segundo, combinándose los extractos ácidos en un matraz volumétrico de 50 mL, diluyéndose a volumen para luego ser mezclados. Se toman 10 mL de la

muestra, se diluyen en 25 mL de HCl 0,01 N y se mide en un espectrofotómetro UV a 265 nm usando como blanco el ácido diluido⁸. Se realiza una curva de calibración con estándar de clorfenamina maleato, la cual se somete a los mismos procedimientos que las muestras de los comprimidos valorados. Criterio de aceptación según USP30, los comprimidos no deben contener menos del 90% y no más del 110% de lo declarado⁸.

5.3 Cinética de disolución

Se realizaron cinéticas de disolución a 12 comprimidos de cada uno de los laboratorios analizados, conforme a lo señalado en la norma⁴. Este estudio se realizó en un equipo de disolución Pharma Test Type PTW S III, de seis vasos. Las condiciones experimentales para evaluar la disolución *in vitro* se señalan en la Tabla 2:

TABLA 2: Condiciones experimentales para evaluar disolución *in vitro* según USP 30⁸

Método	Aparato 2 de la USP
Velocidad de rotación	50 rpm
Medios de disolución	Solución 0,1N de HCl Solución tampón acetato de pH 4,5
Volumen	900 mL
Temperatura	37 ± 0,5°C
Volumen de la muestra	10 mL
Cuantificación	HPLC con detección UV a 230 nm

Antes de comenzar con el estudio de disolución, se deben tomar en cuenta las siguientes variables:

- Desaireación de agua: este procedimiento se realiza mediante la ebullición sostenida del agua por 30 minutos y posterior enfriamiento en frascos tapados herméticamente. Este paso es fundamental ya que las burbujas en el medio de disolución podrían afectar el pH de la solución, el tipo de flujo y

la tensión superficial del medio, además podría afectar la humectación de los comprimidos alterando los resultados finales del ensayo de disolución.

- Preparación de los medios de disolución⁸
 - Medio HCl 0,1N: se mide con pipeta volumétrica 20 mL de HCl concentrado y se lleva a 2000 mL⁸
 - Medio tampón acetato pH 4,5: pesar 22 g de acetato de sodio, disolver con agua desaireada, agregar 12 mL de ácido acético glacial y llevar a 4 litros. La solución resultante deberá tener un pH de $4,5 \pm 0,05$.
- Inspección del aparato de disolución: se verifican tanto los vasos y las paletas del equipo de disolución comprobando que estos cumplan con los requerimientos de la USP 30⁷, la cual estipula que la distancia entre el fondo interno del vaso y el aspa debe ser de 25 ± 2 mm. La temperatura que debe mantener el medio al interior de los vasos es de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Una vez estabilizadas las condiciones del equipo y el medio de disolución, se procede a agregar una unidad de dosificación por vaso, con el espacio de tiempo necesario para, posteriormente, tomar las muestras dentro del tiempo establecido. La muestra debe ser obtenida desde una zona intermedia entre la superficie del medio de disolución y la parte superior del aspa rotatoria, que no esté a menos de 1 cm de la pared del vaso⁸.

Previo al ensayo de disolución, se realizó un *screening* de un comprimido de cada laboratorio para obtener los tiempos óptimos de muestreo, cumpliendo a lo menos con los puntos establecidos en la norma⁴. Inmediatamente después de la obtención de la muestra se repuso el mismo volumen con el medio de disolución, a la misma temperatura de trabajo (37°C). Tanto la toma de muestra, como la reposición de medio en estudio, se realizan con pipeta volumétrica de 10 mL

Cada muestra obtenida, se filtra con previa ambientación tanto del filtro como del embudo con aproximadamente 2 mL de la misma muestra. Las muestras se filtran nuevamente a través de filtros membrana GV (Durapore) y luego son llevadas a viales ámbar para ser cuantificadas por HPLC. Se analizan por triplicado a un flujo de 1,2 mL/min, con un tiempo de análisis de 7 minutos, a una longitud de onda de 230nm.

Soluciones

Buffer fosfato: para la preparación se deben disolver 13,6 g de fosfato monobásico de potasio en 2000 mL de agua y ajustar con una solución de hidróxido de potasio al 45% (p/p) a pH $5,0 \pm 0,1^8$

Sistema cromatográfico

Fase móvil: Buffer fosfato y acetonitrilo en una proporción 96/4 (mezcla filtrada por filtros diámetro $0,22 \mu\text{m}^8$).

Fase estacionaria: Columna C8

Flujo de la fase móvil: 1,2 mL/minuto.

Detector: 230 nm

Volumen de inyección: 400 μL de las soluciones a analizar

Los resultados fueron expresados como porcentaje disuelto sobre lo declarado.

Para establecer bioequivalencia se recopilarán los datos de los perfiles de disolución de los comprimidos a analizar, comparándolos a través de un método modelo independiente, factor de diferencia (f_1) y de similitud (f_2).

El f_1 refleja la diferencia acumulativa entre las curvas de disolución (producto referencia y de prueba) en todos los puntos de tiempo; se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$f_1 = \left\{ \sum_{t=1}^n (R_t - E_t) / \sum_{t=1}^n R_t \right\} \times 100$$

El f_2 es una medida de la similitud del proceso de disolución, es una función recíproca de la transformación de la raíz cuadrada media, de la suma de las distancias cuadradas en todos los puntos; se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \times \sum_{t=1}^n (R_t - E_t)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\}$$

donde:

n: número de tiempos de muestra

R_t : porcentaje promedio de lo disuelto del producto de referencia al tiempo t

E_t : porcentaje promedio de lo disuelto del producto en estudio al tiempo t

Como criterio de aceptación para establecer bioequivalencia, f_1 deberá ser ≤ 15 y $f_2 \geq 50$.

Además se obtienen los ordenes cinéticos de los perfiles de disolución, graficando los porcentajes disueltos y los logaritmos de los porcentajes no disueltos en función del tiempo.

6 RESULTADOS

6.1 Validación de la metodología

6.1.1 Exactitud

Se determinaron 3 concentraciones de estándar de clorfenamina maleato C1, C2, C3 (80, 100, 120%) cada una de ellas fue realizada por triplicado, leyéndose cada una de estas 3 veces, los resultados son expresados en el anexo 2. Se obtuvieron los porcentajes de recuperación de cada determinación obteniéndose un coeficiente de variación dentro de los rangos establecidos.

La exactitud se realizo para las tres metodologías ocupadas en el estudio.

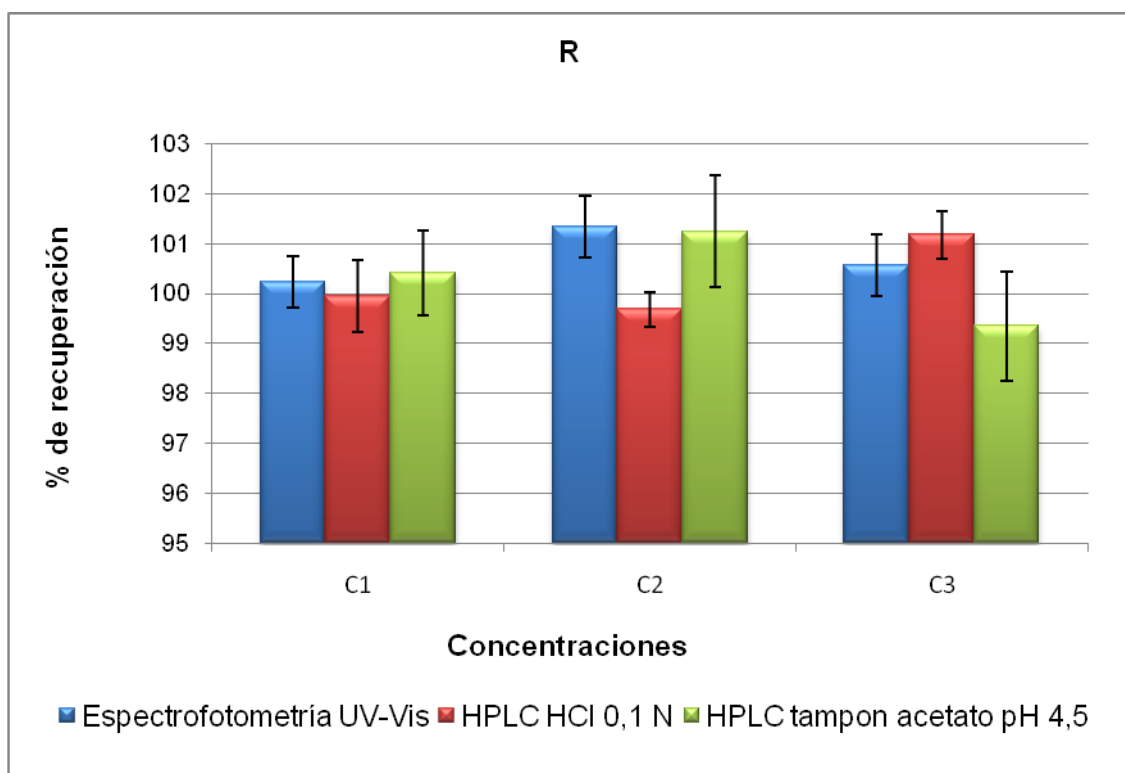


FIGURA 2: Porcentaje de recuperación de 3 concentraciones, en las tres metodologías ocupadas en el estudio

6.1.2 Precisión

Se realizaron 9 determinaciones de una concentración cercana al 100% de estándar de clorfenamina maleato, cuyos resultados se presentan en la siguiente tabla.

TABLA 3: Precisión de las metodologías ocupadas

Espectrofotometría UV		HPLC HPLC 0,1 N		HPLC pH 4,5	
Conc (mg/ml)	Abs	Conc (mg/ml)	Área	Conc (mg/ml)	Área
0,016	0,347	3,30E-03	675.005	3,30E-03	327.370
0,016	0,35	3,30E-03	679.562	3,30E-03	316.079
0,016	0,346	3,30E-03	687.474	3,30E-03	327.262
0,016	0,347	3,30E-03	680.524	3,30E-03	321.966
0,016	0,345	3,30E-03	682.243	3,30E-03	318.256
0,016	0,347	3,30E-03	688.665	3,30E-03	320.884
0,016	0,345	3,30E-03	683.023	3,30E-03	322.442
0,016	0,345	3,30E-03	684.891	3,30E-03	318.660
0,016	0,347	3,30E-03	676.353	3,30E-03	322.285
Prom	0,347	Prom	681.971	Prom	321.689
SD	0,002	SD	4.647,36	SD	3.830,98
CV %	0,459	CV %	0,68	CV %	1,19

6.1.3 Especificidad

Es la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya existencia resulta previsible. Se determinó a través de HPLC, comparando la muestra contra un estándar, ambos aproximadamente a una concentración de 4E-03. Se compararon los tiempos de retención, la forma y área de la señal. Los tiempos de retención dieron cercanos a 3,3 minutos ambas muestras y las áreas en torno a los 300.000.

Las condiciones del análisis fueron las siguientes:

Fase móvil: Buffer fosfato y acetonitrilo en una proporción 96/4 (mezcla filtrada por filtros diámetro 0,22 μm^8).

Fase estacionaria: Columna C8

Flujo de la fase móvil: 1,2 mL/minuto.

Detector: 265 nm

Volumen de inyección: 200 μL de las soluciones a analizar

Se adjunta cromatogramas en el anexo 1,

6.1.4 Linealidad

- Espectrofotómetro UV

Se midieron 6 concentraciones distintas de estándar de clorfenamina maleato por triplicado, cuyas lecturas estuvieron dentro del rango absorbancia 0,2 a 0,8 provenientes de una solución madre, y las diluciones se confeccionaron con el objetivo de cubrir todo el rango de trabajo. Tanto la solución madre como el medio empleado para las diluciones fue medio ácido clorhídrico 0,01N. En la tabla 4, 5 y 6 se presentan los datos de la linealidad de las distintas metodologías y en la Figura 3, 4 y 5 se presentan las curvas de calibración.

TABLA 4: Linealidad de metodología en espectrofotómetro UV

Concentración [mg/mL]	Área promedio	SD	CV %	FR
0,0127	0,265	0,002	0,58	20,917
0,0159	0,319	0,002	0,65	20,098
0,0190	0,371	0,005	1,36	19,516
0,0254	0,498	0,005	0,99	19,643
0,0317	0,616	0,004	0,59	19,425
0,0396	0,771	0,006	0,71	19,458
			Prom	19,843
			SD	0,581
			CV %	2,93

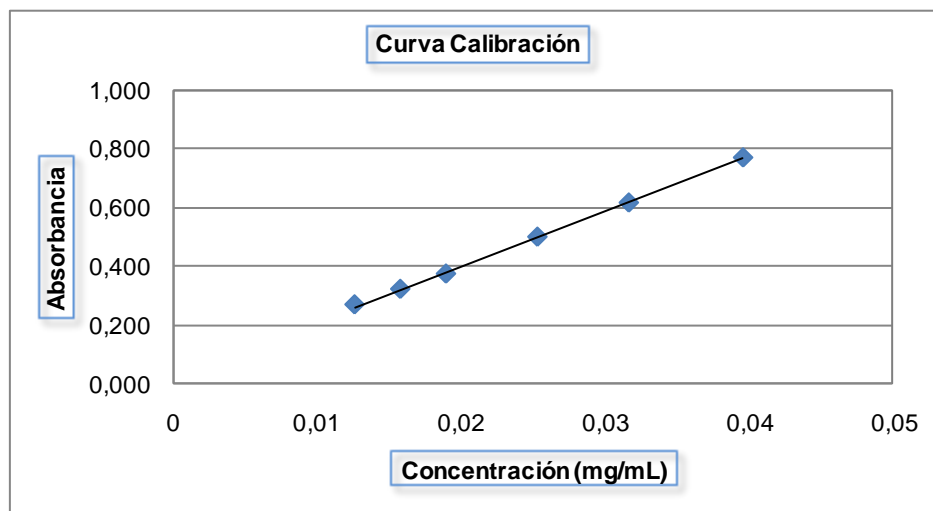


FIGURA 3: Curva de calibración HCl 0,01N

Los valores de la curva de calibración arrojaron un $r=0,9997$ y un $r^2= 0,9994$ con una ecuación de la recta de $y=18,886x+0,0193$ obteniendo un factor respuesta con un CV menor al 5%, por lo tanto el rango de trabajo se realizó entre 0,0127 mg/mL y 0,396 mg/mL.

○ HPLC medio HCl 0,1N

Se midieron 8 concentraciones distintas de estándar de clorfenamina maleato por triplicado. Tanto la solución madre como el medio empleado para las diluciones fue medio HCl 0,1N.

TABLA 5: Linealidad de metodología en HPLC medio HCl 0,1N

Concentración [mg/mL]	Área promedio	SD	CV %	FR
6,60E-03	1353876	3425	0,25	2,05E+08
5,77E-03	1169625	16382	1,40	2,03E+08
4,95E-03	1007367	2236	0,22	2,04E+08
4,12E-03	846173	1962	0,23	2,05E+08
2,47E-03	542029	6379	1,18	2,19E+08
1,65E-03	363094	1255	0,35	2,20E+08
8,25E-04	182996	1286	0,70	2,22E+08
4,12E-04	90338	1672	1,85	2,19E+08
			Prom	2,12E+08
			SD	8,59E+06
			CV %	4,05

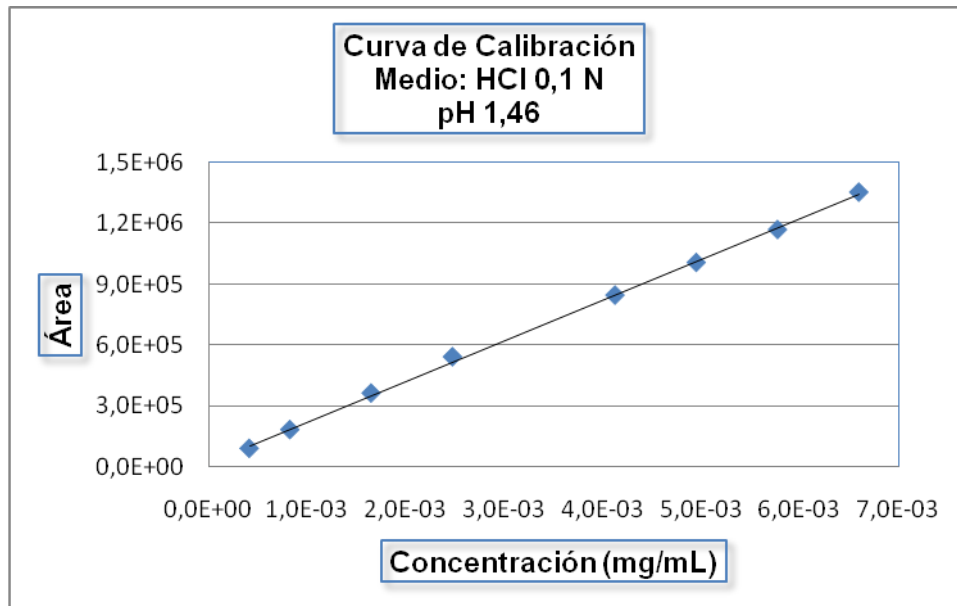


FIGURA 4: Curva de calibración medio HCl 0,1N

Los valores de la curva de calibración arrojaron un $r=0,9996$, y un $r^2=0,9993$ con una ecuación de la recta de $y=200735028x+22059$, además se obtuvo un factor respuesta menor al 5%, por lo tanto el rango de concentración de trabajo es de $6,60E-03$ a $4,12E-04$ mg/mL.

- HPLC medio tampón acetato pH 4,5

Se midieron 6 concentraciones distintas de estándar de clorfenamina maleato. Tanto la solución madre como el medio empleado para las diluciones fue tampón acetato pH 4,5.

TABLA 6: Linealidad de la metodología en HPLC medio tampón acetato pH 4,5

Concentración [mg/mL]	Área promedio	SD	CV %	FR
6,60E-03	641.400	19620	3,06	9,72E+07
5,77E-03	544.432	11678	2,14	9,43E+07
4,95E-03	471.870	5822	1,23	9,54E+07
4,12E-03	387.379	6599	1,70	9,40E+07
2,47E-03	255.175	3105	1,22	1,03E+08
1,65E-03	157.367	3105	1,97	9,54E+07
8,25E-04	81.958	1527	1,86	9,94E+07
4,12E-04	42.105	3802	9,03	1,02E+08
			Prom	9,76E+07
			SD	3,55E+06
			CV %	3,64

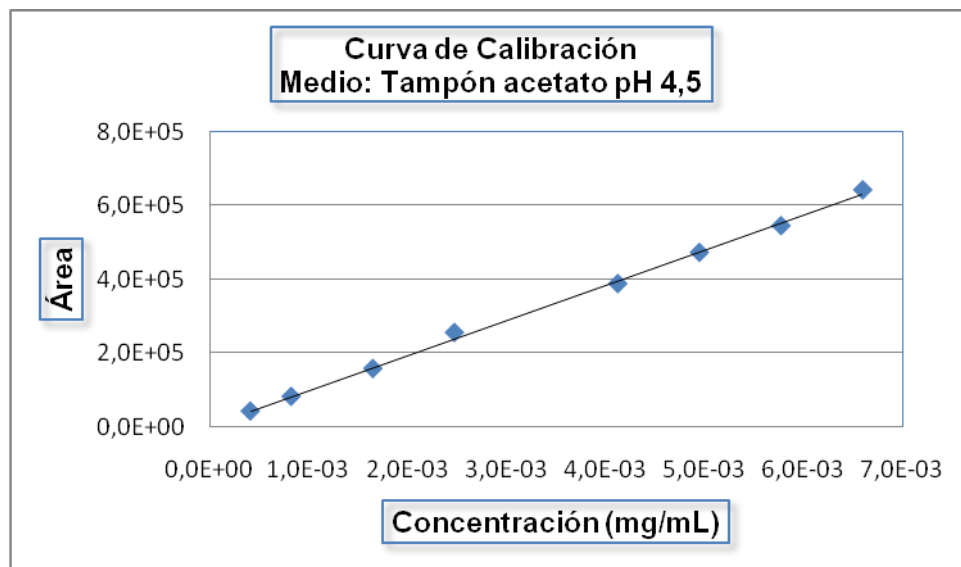


FIGURA 5: Curva de calibración medio tampón acetato pH 4,5

Los valores de la curva de calibración presentaron un $r=0,9992$, y un $r^2= 0,9985$ con una ecuación de la recta de $y=95042512x+4358$, además se obtuvo un CV % para

el factor respuesta menor al 5%, por lo tanto se define el rango de trabajo desde 6,60E-03 a 4,12E-04 mg/mL.

6.2 Caracterización de los comprimidos

- Principio activo: clorfenamina maleato
- Cantidad declarada por comprimido: 4 mg

Se analizaron 4 laboratorios denominados A, B, C y D, siendo A, el laboratorio considerado de referencia. Las características físicas de los comprimidos en estudio, sus números de serie y fechas de vencimiento se presentan en la Tabla 10.

TABLA 7: Características físicas de los comprimidos analizados

Laboratorio	A	B	C	D
Presentación	Comprimidos	Comprimidos	Comprimidos	Comprimidos
Lote/Serie	5tw2m01	007897	7a127a	cm041128
Vencimiento	11.2008	07.2009	01.2011	11.2008
Descripción	Amarillos, ranurados, redondos, inodoros	Blancos, ranurados, redondos, inodoros	Amarillos, ranurados, redondos, inodoros	Amarillos, ranurados, redondos, inodoros

6.3 Controles de calidad

6.3.1 Características físicas

Se realizó la determinación de peso, dureza, y dimensiones de los comprimidos analizados de los cuatro laboratorios en estudio. Los datos en extenso son expresados en el anexo 3.

TABLA 8: Promedio de peso, dureza y dimensiones de comprimidos estudiados

Laboratorios	A	B	C	D
Altura (cm)	0,297±0,003	0,316±0,008	0,312±0,006	0,299±0,009
Diámetro (cm)	0,649±0,002	0,730±0,006	0,666±0,006	0,574±0,004
Peso (gr)	0,100±0,002	0,133±0,005	0,107±0,006	0,075±0,001
Dureza (Kp)	8,68±0,47	3,38±0,38	2,53±0,36	2,80±0,33

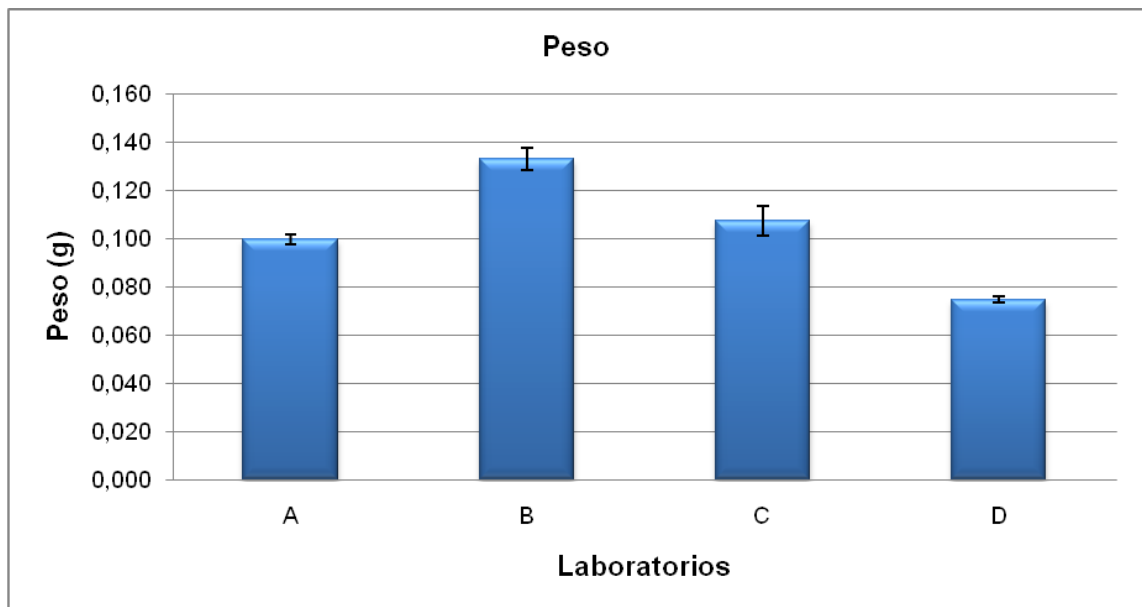


FIGURA 6: Pesos promedios de los comprimidos en estudio

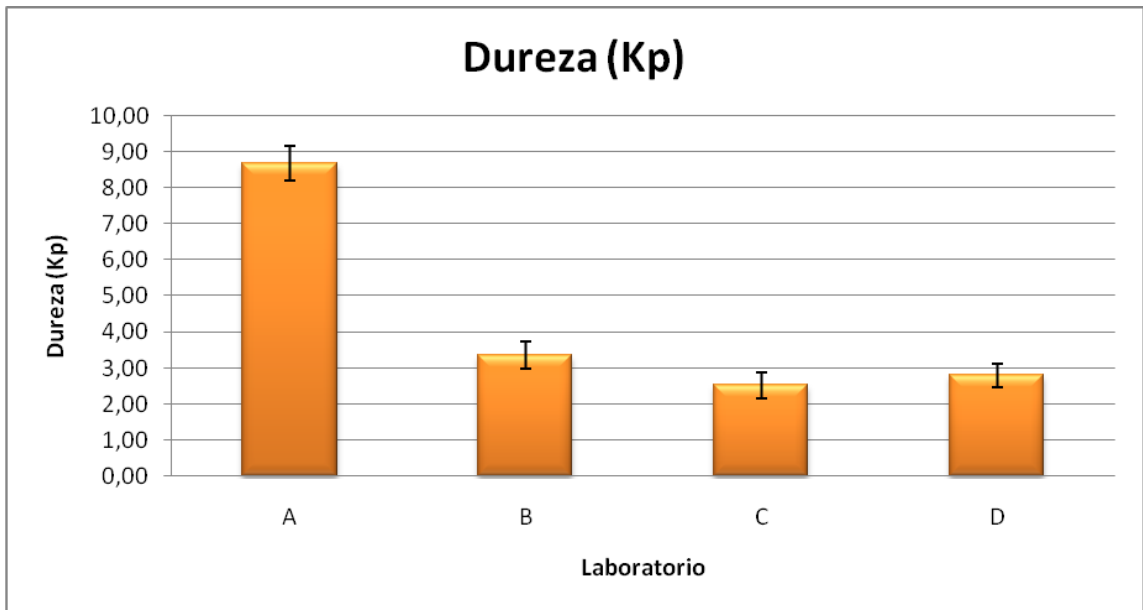


FIGURA 7: Dureza promedio de los comprimidos en estudio

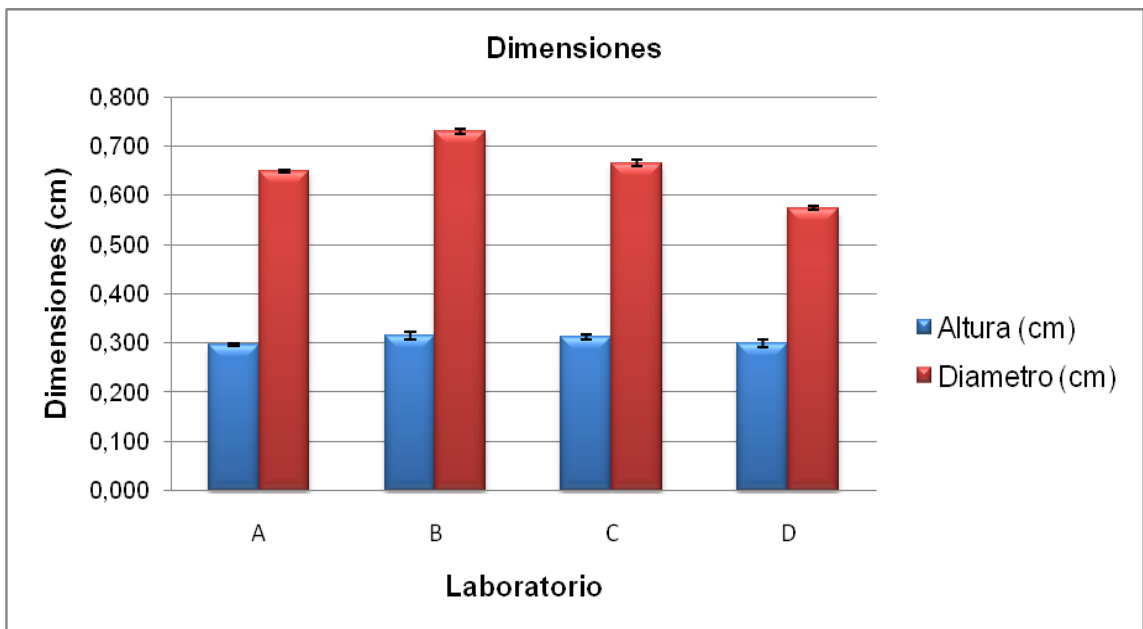


FIGURA 8: Dimensiones promedios de los comprimidos en estudio

6.3.2 Uniformidad de contenido

Se valoraron 10 comprimidos de los 4 laboratorios en estudio, tal como lo indica la USP30⁸. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 9.

TABLA 9: Uniformidad de contenido (% sobre lo declarado) de los comprimidos ensayados.

N°	A	B	C	D
	Uniformidad de Contenido	Uniformidad de Contenido	Uniformidad de Contenido	Uniformidad de Contenido
1	104,19%	96,25%	101,22%	92,61%
2	104,86%	96,75%	103,04%	91,29%
3	104,36%	97,58%	102,54%	91,95%
4	102,87%	96,58%	101,05%	92,28%
5	103,53%	96,25%	103,37%	90,79%
6	104,03%	97,74%	103,86%	91,78%
7	103,86%	98,24%	101,38%	91,12%
8	104,36%	96,42%	101,55%	92,78%
9	104,69%	97,24%	102,71%	91,29%
10	103,20%	96,09%	102,37%	94,43%
Prom	104,00%	96,91%	102,31%	92,03%
SD	0,64%	0,74%	0,97%	1,07%
CV %	0,61	0,76	0,95	1,16
AV	-0,01	0,03	0,02	0,09

El valor de aceptación (AV) obtenido fue menor a 15 para todos los comprimidos evaluados.

6.3.3 Valoración

Se realizó la valoración de los productos de los 4 laboratorios tal como lo indica la USP30. Los valores obtenidos se aprecian en al Tabla 10.

TABLA 10: Valoración de los productos en estudio (% sobre lo declarado)

Laboratorios	VALORACIÓN				
	Muestra	Contramuestra	Promedio	SD	CV %
A	103,59%	103,20%	103,39%	0,27%	0,26
B	97,41%	97,52%	97,47%	0,08%	0,08
C	102,59%	102,76%	102,68%	0,12%	0,11
D	92,23%	92,00%	92,12%	0,16%	0,17

Los valores obtenidos se encuentran dentro de los límites establecidos por la USP30, no menos de 90% ni más de 110% de lo declarado.

6.4 Cinéticas de disolución

6.4.1 Perfiles de disolución medio HCl 0,1N

En la Tabla 11 se presenta el porcentaje promedio de clorfenamina maleato liberado desde los comprimidos de los laboratorios en estudio. Los resultados se presentan como porcentaje sobre lo declarado.

TABLA 11: Porcentaje promedio de clorfenamina maleato liberado desde los comprimidos en estudio.

Tiempo	A			B		
	Prom (%)	SD	CV %	Prom (%)	SD	CV %
1,5	6,83	1,26	0,18	1,58	0,31	0,19
2,5	16,49	2,76	0,17	9,72	1,75	0,18
3,5	27,90	2,42	0,09	26,77	2,45	0,09
5,0	54,54	2,79	0,05	46,07	3,29	0,07
7,0	84,01	7,04	0,08	65,19	6,21	0,10
9,0	98,51	3,46	0,04	77,01	7,61	0,10
12,0	101,16	1,40	0,01	91,57	4,73	0,05
15,0	100,63	1,62	0,02	98,52	3,32	0,03

Tiempo	C			D		
	Prom (%)	SD	CV %	Prom (%)	SD	CV %
1,5	18,37	3,04	0,17	5,01	0,88	0,18
2,5	74,07	5,52	0,07	11,92	2,03	0,17
3,5	86,27	4,43	0,05	17,58	1,66	0,09
5,0	94,89	4,13	0,04	26,36	1,79	0,07
7,0	96,91	2,89	0,03	43,43	3,51	0,08
9,0	99,17	1,24	0,01	50,93	4,73	0,09
12,0	100,34	1,58	0,02	65,94	6,17	0,09
15,0	100,76	1,91	0,02	77,73	5,49	0,07

En la siguiente figura se representan los perfiles de disolución promedio (expresados en la Tabla 11) de los 4 laboratorios estudiados, con el objetivo de apreciar las diferencias en cada una de ellos.

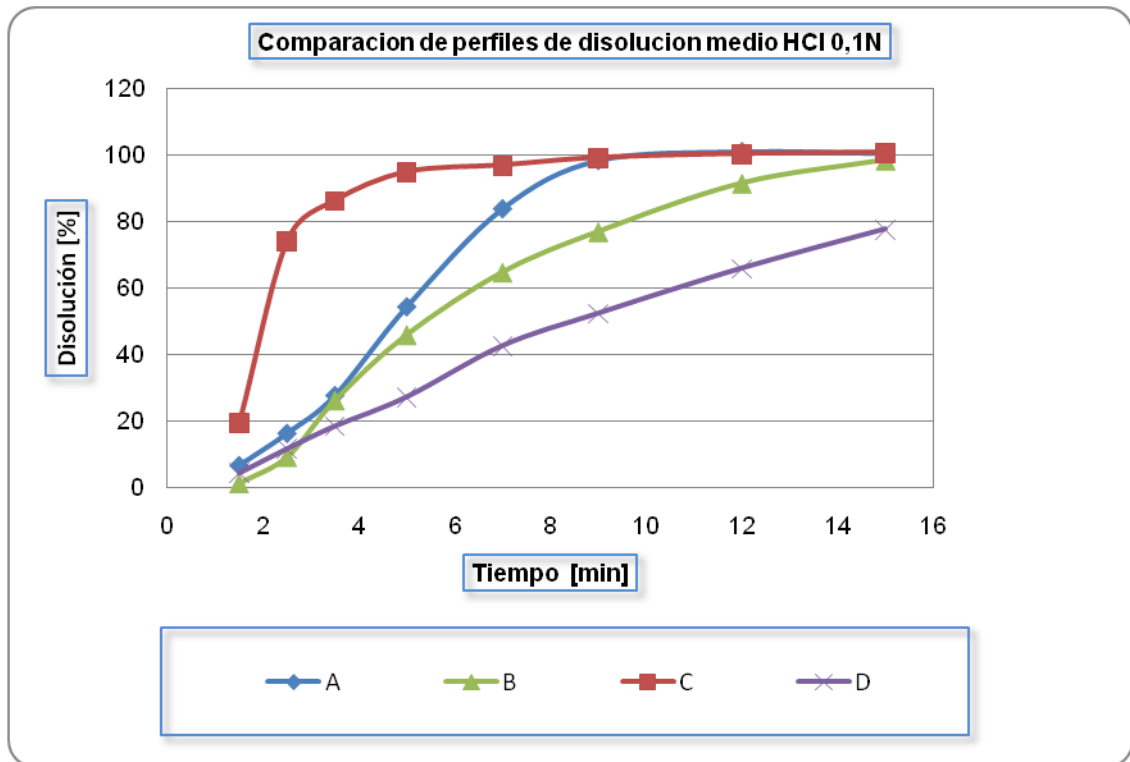


FIGURA 9: Comparación de perfiles de disolución promedio en medio HCl 0,1N

6.4.2 Factor de diferencia (f_1) y factor de similitud (f_2) medio HCl 0,1N

La siguiente figura muestra los porcentajes disueltos a los 15 minutos de los comprimidos estudiados.

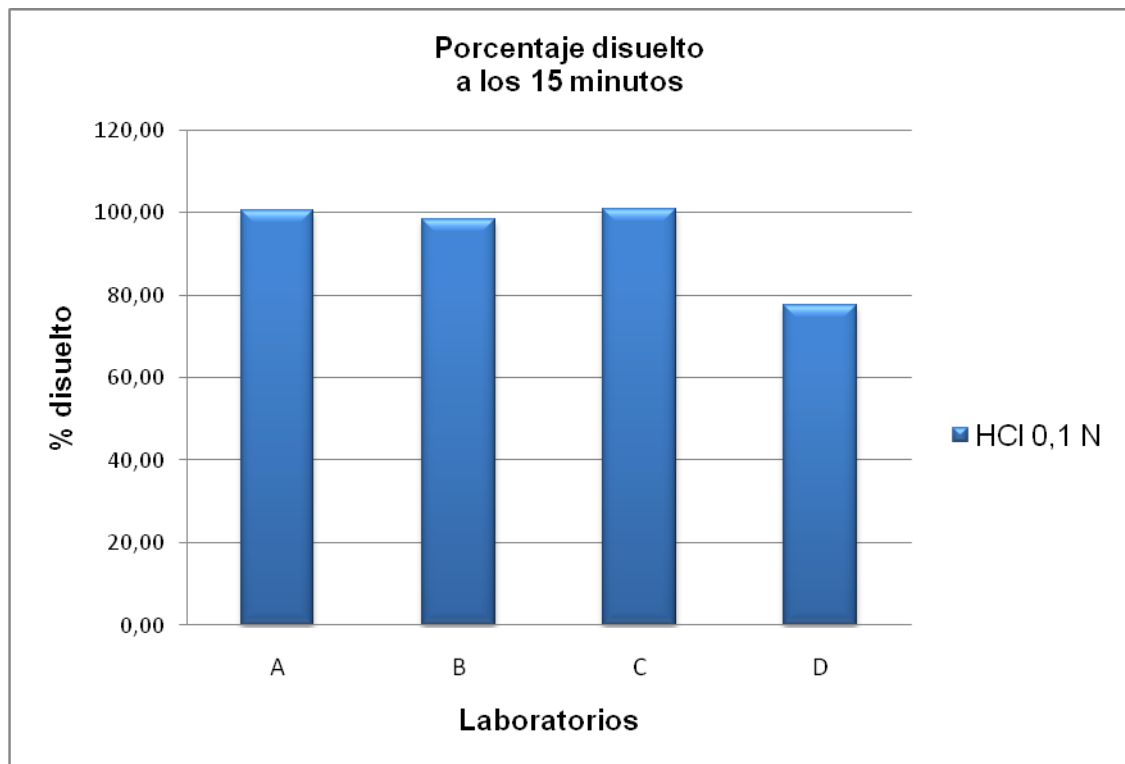


FIGURA 10: Porcentaje disuelto a los 15 minutos en medio HCl 0,1 N

Se observa que los laboratorios A, B y C poseen una disolución muy rápida ya que se disuelve más del 85% de lo declarado antes de los 15 minutos, este resultado hace que el calcular f_1 y f_2 no sean necesarios para probar bioequivalencia terapéutica, solo si esta tendencia se mantiene en el medio fosfato pH 6,8. Sin embargo los comprimidos del laboratorio D no alcanza una disolución del 85% a los 15 minutos por lo que sería necesario el cálculo de f_1 y f_2 .

TABLA 12: f_1 y f_2 para medio HCl 0,1 N

Laboratorio	Medio HCl 0,1N			
	f_1	Aceptación	f_2	Aceptación
A-B	20,64	NO	50,14	SÍ
A-C	248,82	NO	16,02	NO
A-D	46,15	NO	27,33	NO

6.4.3 Perfiles de disolución medio tampón acetato pH 4,5

En la Tabla 13 se muestra el porcentaje promedio de clorfenamina maleato liberado desde los comprimidos de los laboratorios analizados en medio tampón acetato pH 4,5. Los resultados se presentan como porcentaje sobre lo declarado.

TABLA 13: Porcentaje promedio de clorfenamina maleato liberado desde los comprimidos en estudio, en medio tampón acetato pH 4,5.

Tiempo	A			B		
	Prom (%)	SD	CV %	Prom (%)	SD	CV %
0,5	15,46	3,48	0,23	5,80	1,05	0,18
1,5	23,79	1,68	0,07	15,54	2,86	0,18
2,5	34,13	3,14	0,09	30,16	2,85	0,09
3,5	54,57	3,79	0,07	45,11	3,88	0,09
5,0	77,99	5,24	0,07	61,18	4,11	0,07
7,0	91,17	4,01	0,04	78,65	4,74	0,06
9,0	98,08	1,99	0,02	91,39	3,25	0,04
15,0	101,63	1,49	0,01	98,92	1,54	0,02

Tiempo	C			D		
	Prom (%)	SD	CV %	Prom (%)	SD	CV %
0,5	12,41	2,04	0,16	5,13	0,86	0,17
1,5	69,77	6,89	0,10	14,63	2,72	0,19
2,5	87,15	3,22	0,04	26,11	2,58	0,10
3,5	93,46	1,89	0,02	38,90	3,72	0,10
5,0	97,42	1,26	0,01	51,43	5,10	0,10
7,0	100,04	1,51	0,02	63,20	4,71	0,07
9,0	101,79	0,86	0,01	74,01	4,10	0,06
15,0	102,84	1,10	0,01	81,71	2,78	0,03

En la Figura 10 se representan los perfiles de disolución promedio (datos presentados en la Tabla 13) de los 4 laboratorios analizados, con el objetivo de apreciar las diferencias en cada una de ellos.

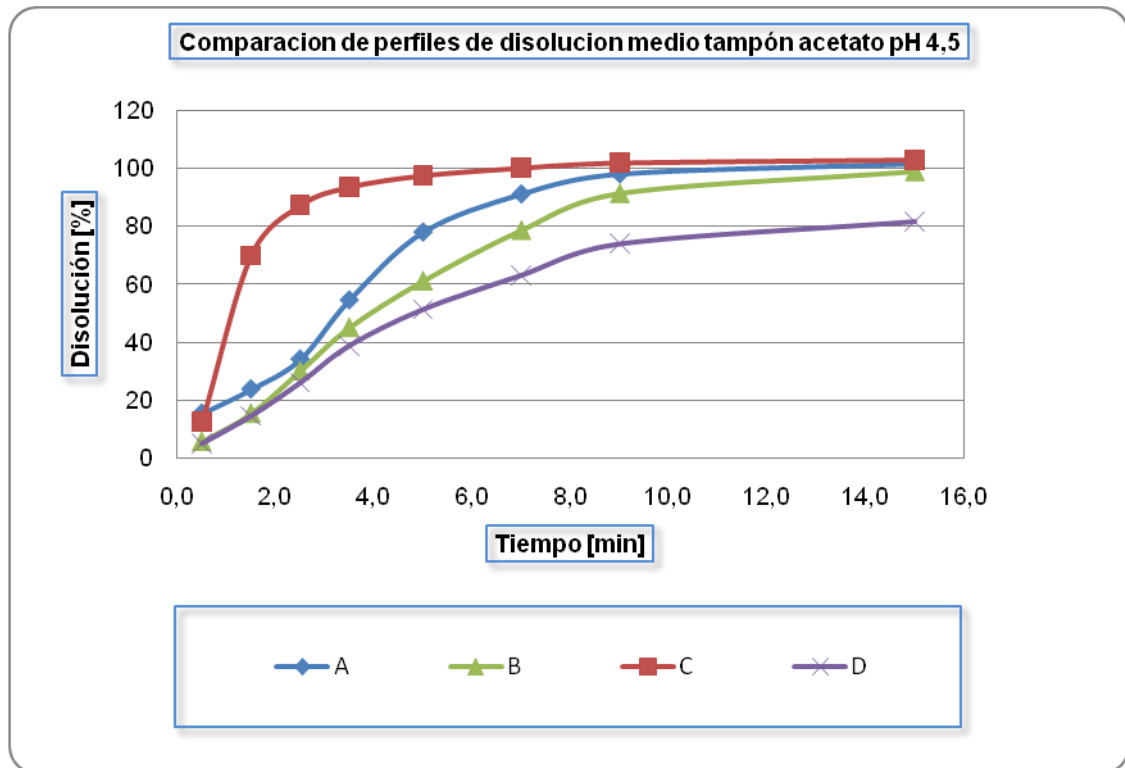


FIGURA 11: Comparación de perfiles de disolución promedio en medio tampón acetato pH 4,5

6.4.4 Factor de diferencia (f_1) y factor de similitud (f_2) tampón acetato pH 4,5

En la figura 12 se observan los porcentajes disueltos a los 15 minutos de los comprimidos estudiados.

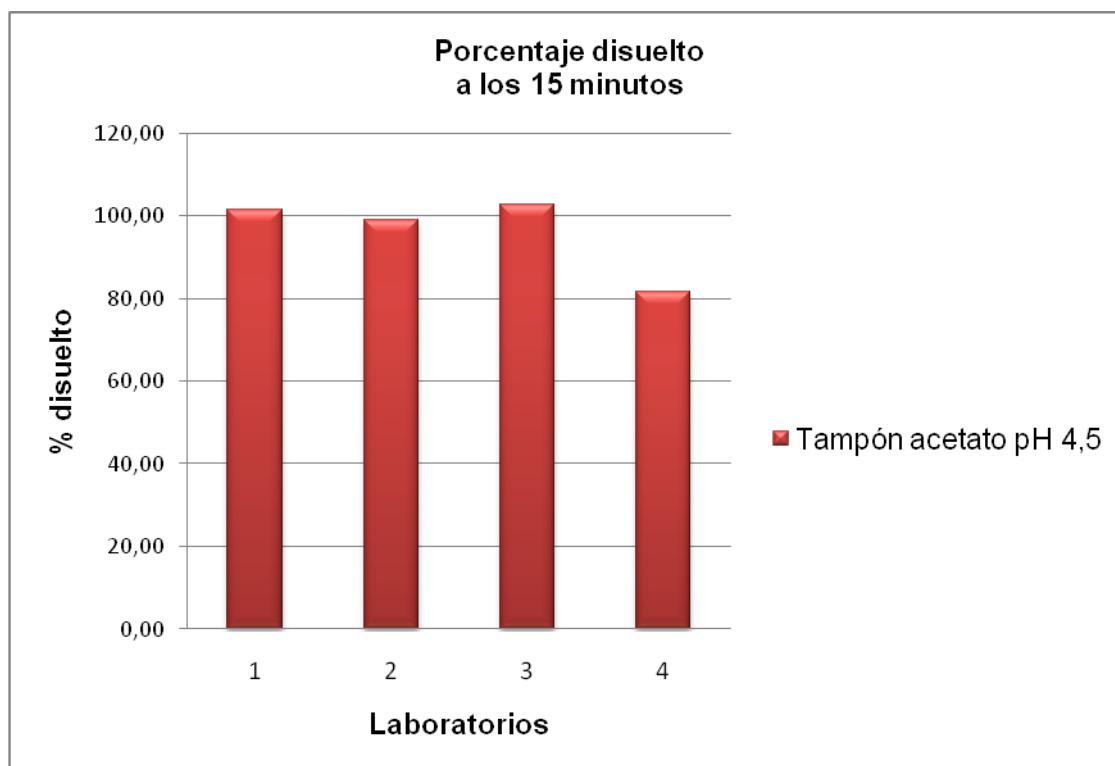


FIGURA 12: Porcentaje disuelto a los 15 minutos en medio HCl 0,1 N

Los laboratorios A, B y C poseen una disolución muy rápida ya que se disuelve más del 85% de lo declarado antes de los 15 minutos, lo que hace que el cálculo de f_1 y f_2 no sean necesarios para probar bioequivalencia terapéutica en el caso de que la tendencia de disolución se mantenga en el otro medio estipulado por la norma. Pero los comprimidos del laboratorio D no alcanzan una disolución del 85% a los 15 minutos por lo que sería necesario el cálculo de f_1 y f_2 .

TABLA 14: f_1 y f_2 para medio tampón acetato pH 4,5

Laboratorio	Medio tampón acetato pH 4,5			
	f_1	Aceptación	f_2	Aceptación
A-B	20,42	NO	48,14	NO
A-C	134,47	NO	18,97	NO
A-D	33,25	NO	36,23	NO

6.4.5 Análisis estadístico de los porcentajes disueltos.

Se realizó un análisis estadístico (ANOVA) efectuado a los porcentajes disueltos a los 15 minutos en 2 condiciones de pH

TABLA 15: Comparación de las formulaciones estudiadas en ambos medios estudiados.

Formulaciones comparadas	Medio HCL 0,1 N	Tampón acetato pH 4,5
A - B	p= 0.145	p= 0.0014 *
A - C	p= 0.9986	p= 0.214
A - D	p < 1 x 10 ⁻⁸ *	p < 1 x 10 ⁻⁸ *
C - B	p= 0.146	p= 0.0002 *
C - D	p < 1 x 10 ⁻⁸ *	p < 1 x 10 ⁻⁸ *
B - D	p < 1 x 10 ⁻⁸ *	p < 1 x 10 ⁻⁸ *

*: estadísticamente significativo

Se observa una diferencia significativa entre los comprimidos de los laboratorios estudiados, pero esta diferencia no posee importancia fisiológica en los comprimidos de los laboratorios A, B y C, ya que estos poseen una disolución muy rápida, menor a 15 minutos, ya que este tiempo es inferior al tiempo de vaciamiento gástrico, lo que hace que estos comprimidos sean bioequivalentes terapéuticos.

7 DISCUSIÓN

En este trabajo se realizó un estudio preliminar de bioequivalencia *in vitro* entre 4 productos farmacéuticos que contienen clorfenamina maleato, analizando sólo un lote de fabricación de cada producto.

El estudio de la bioequivalencia entre dos formulaciones farmacéuticas alude al concepto de la intercambiabilidad entre ellas. Los productos genéricos son, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, "productos farmacéuticos de múltiples orígenes intercambiables". Por ello, para fines de intercambiabilidad, una prueba de bioequivalencia con el producto innovador es indispensable. Nuestro país cuenta con un producto de referencia estipulado por la autoridad sanitaria pertinente, laboratorio denominado A, ya que es el producto con el registro más antiguo en el mercado nacional ¹³.

Varias agencia regulatorias no aceptan hasta el momento que los fármacos de clase 3 según la SCB, como es la clorfenamina maleato, puedan optar a una bioexención. Sin embargo, la autoridad chilena ha acogido las sugerencias de la OMS de incluir estos fármacos en estudios de bioexención, por lo que el medicamento estudiado en este trabajo, fue el primer fármaco autorizado en Chile para optar a esta forma de determinación de equivalencia terapéutica.

Para poder establecer equivalencia terapéutica se debe realizar este estudio en los 3 medios que establece la norma chilena. Estas condiciones simulan las condiciones de pH que se espera encontrar desde el estómago hasta la parte media del yeyuno, de forma de asegurar que la dosis se encuentra disuelta en una región del tracto gastrointestinal donde todavía tiene grandes oportunidades de ser absorbida.

Tanto la validación de las metodologías estudiadas y los controles de calidad realizados a los comprimidos estudiados estuvieron dentro de los límites fijados por la USP 30.

Se utilizó un método modelo independiente f_1 y f_2 para probar la bioequivalencia. Los resultados arrojaron que, preliminarmente, los perfiles de disolución de los comprimidos en estudio no son bioequivalentes con el de referencia.

Además, la comparación de los perfiles de disolución de los productos estudiados muestra una diferencia significativa al ser evaluados a través de un sistema estadístico ANOVA.

A pesar de que los dos métodos ocupados muestran diferencias importantes, estas no son de relevancia fisiológica ya que la disolución de los comprimidos en los laboratorios A, B y C es menor al de vaciamiento gástrico, lo que hace que el proceso de absorción no este perjudicado.

Es importante señalar lo ocurrido con los comprimidos del laboratorio C y D. Los comprimidos del laboratorio C alcanzaron porcentajes de disolución superiores al 85% en menos de 4 minutos, este resultado puede deberse a la baja dureza que se observó al realizar los controles de calidad de los comprimidos. Por el contrario, los comprimidos del laboratorio D fueron los únicos que no alcanzaron el 85% en menos de 15 minutos en los 2 medios estudiados, siendo interesante evaluar su comportamiento en el medio tampón fosfato pH 6,8. Para realizar un análisis más profundo de las causas que llevaron a estos resultados, sería necesario contar con la formulación de los comprimidos.

Las modificaciones recientes de la norma chilena, establecen que deberá ensayarse 3 lotes del producto en estudio y uno del innovador, además incluye un cambio en la velocidad de agitación del Aparato 2, que originalmente era de 50 rpm, ha sido aumentada a 75 rpm, lo que podría modificar, eventualmente, en alguna medida los resultados de este estudio.

Es primordial resaltar el beneficio que tienen los estudios de bioequivalencia entre productos equivalentes farmacéuticos en la prescripción con el fin de garantizar que al intercambiar una formulación genérica por otra, realmente se esté asegurando una respuesta terapéutica similar, por esta razón, dichos intercambios no sólo se deben realizar teniendo en cuenta el factor económico sino también la calidad.

Finalmente, es necesario insistir en la necesidad de evaluar la bioequivalencia de muchos productos existentes en nuestro país, a fin de optimizar la terapia farmacológica.

8 CONCLUSIONES

La validación de la metodología analítica para la valoración de los comprimidos analizados y para la cuantificación de las cinéticas de disolución estuvieron dentro de los márgenes establecidos por la guía técnica G-BIOF 02 y la USP30. Lo que hace que los datos obtenidos sean fiables.

Los controles de calidad realizados a los comprimidos evaluados, peso, dureza, dimensiones, valoración y uniformidad de contenido, estuvieron dentro de los rangos aceptados, certificando que los comprimidos cumplen con lo declarado.

Los perfiles de disolución de los comprimidos analizados de los 4 laboratorios en estudio mostraron un coeficiente de variación dentro de los rangos estipulados por la norma chilena, los cuales fueron para los primeros puntos un CV % < 20% y un CV % < 10% para el resto. Los perfiles de disolución fueron evaluados de acuerdo a un método modelo independiente f_1 y f_2 . Los resultados obtenidos demostraron en forma preliminar que los productos de los laboratorios analizados con este método no serían similares.

Además, los perfiles de disolución revelaron que el fármaco estudiado sería de una disolución muy rápida, ya que se disuelve más del 85% en menos de 15 minutos, en 2 de los 3 medios requeridos por la norma chilena por lo que en forma preliminar, estos productos serían similares entre sí, siendo irrelevante los resultados f_1 y f_2 , excepto el producto del laboratorio D el cual no alcanza una disolución del 85% a los 15 minutos, posiblemente debido a los excipientes ocupados y a la manufactura del medicamento.

BIBLIOGRAFÍA

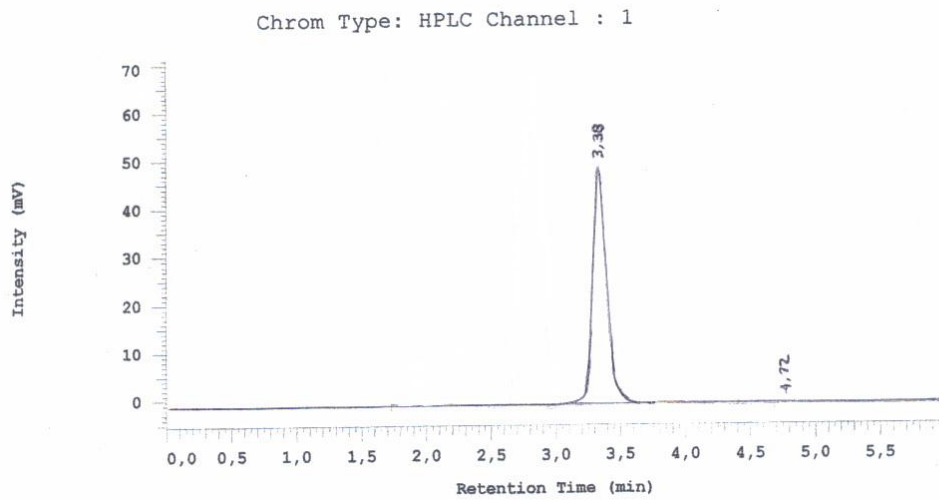
1. IV Conferencia Panamericana para la armonización de la reglamentación farmacéutica, Marzo 2005. Criterios científicos para establecer estudios de bioequivalencia, bioexenciones y marco estratégico para su implementación. Red panamericana para la armonización de la reglamentación farmacéutica.
2. Dr. Q.F. RAMOS, G. Dra. QF. PEZOA, R. Ministerio de salud/ instituto de salud publica de Chile. Genéricos y bioequivalencia: pruebas, necesidad (pertinencia de bioequivalencia en genéricos) [power point] Lima, Noviembre 2005.
3. Gobierno de Chile. Política Nacional de Medicamentos en la Reforma de Salud, Abril 2004. Ministerio de Salud
4. Resolución exenta N°727/05. Norma que define los criterios destinados a establecer equivalencia terapéutica a productos farmacéuticos en Chile. Publicado en el Diario Oficial de 29.11.05
5. FDA Guía para la industria: Exención de los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia in vivo para formas posológicas orales sólidas de liberación inmediata en base a un sistema de clasificación de biofarmacéuticas. 2001.
6. Farmacología Humana por Jesús Flórez "et al", 3º ed. Masson S.A. 1997. 310-312p.
7. CLARKES. Clarkes's Analysis of Drugs and Poisons. London Pharmaceutical Press. Versión Electrónica, 2004
8. The United States Pharmacopeia 30 (USP 30), The National Formulary 25 U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville, MD. 2007. Editions CD
9. ICH Steering Committee. Text on Validation of Analytical Procedures Q2A. ICH Harmonised Tripartite Guideline, 1994.
10. ICH Steering Committee. Text of Analytical Procedures: Methodology Q2B. ICH Harmonised Tripartite Guideline, 1996.
11. Instituto de Salud Pública de Chile, Departamento de Control Nacional, Subdepartamento de Seguridad, Sección de Biofarmacia. Guía Técnica G-BIOF 02: Bioexención de los estudios de Biodisponibilidad/Bioequivalencia para

establecer Equivalencia Terapéutica de Formas Farmacéuticas Sólidas Orales. Santiago de Chile 2007.

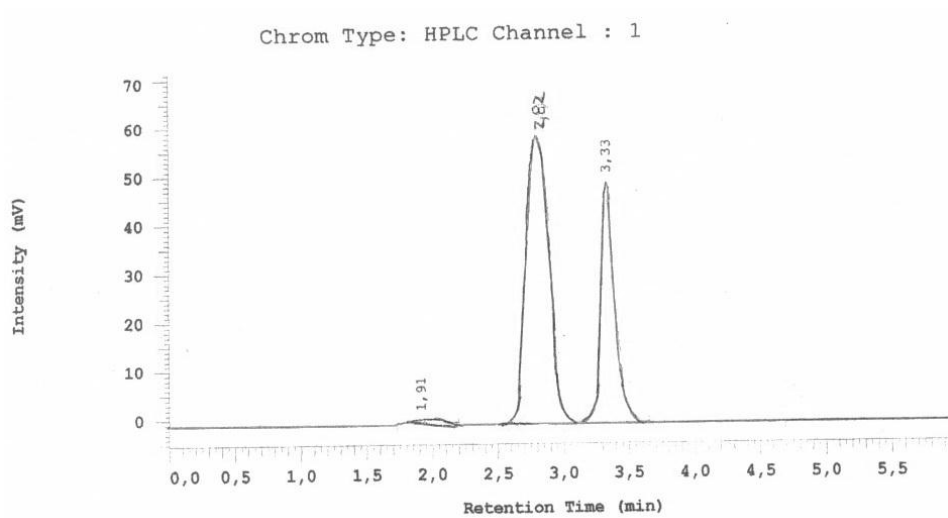
12. REMINGTON. Remington's Pharmaceutical Sciences. 6^a ed Board Members and Editors,1980. 1559p.
13. Resolución exenta N°3.225. Establece fecha de vigencia para la exigencia de estudios de bioequivalencia de productos farmacéuticos monodroga que contienen clorfenamina maleato y carbamazepina. Publicado en el Diario Oficial de 30.05.08

ANEXO 1

Cromatograma HPLC estándar de clorfenamina maleato.



Cromatograma HPLC comprimido de clorfenamina maleato



ANEXO 2

TABLA 16: Exactitud de la metodología en espectrofotómetro UV

C1	Abs prom	SD	CV %	Conc. Interpolada	R
0,0140	0,284	0,002	0,538	0,0140	100,15
0,0140	0,285	0,002	0,535	0,0141	100,78
0,0140	0,283	0,002	0,736	0,0139	99,77
Prom	0,284			Prom	100,234
SD	0,001			SD	0,510
CV %	0,47			CV %	0,51
C2	Abs prom	SD	CV %	Conc. Interpolada	R
0,0175	0,356	0,003	0,743	0,0178	102,04
0,0175	0,352	0,002	0,434	0,0176	100,93
0,0175	0,353	0,002	0,590	0,0177	101,03
Prom	0,354			Prom	101,334
SD	0,002			SD	0,614
CV %	0,57			CV %	0,61
C3	Abs prom	SD	CV %	Conc. Interpolada	R
0,0210	0,418	0,003	0,602	0,0211	100,78
0,0210	0,415	0,004	0,913	0,0209	99,85
0,0210	0,419	0,002	0,551	0,0212	101,03
Prom	0,417			Prom	100,553
SD	0,002			SD	0,621
CV %	0,59			CV %	0,62

TABLA 17: Exactitud y precisión de metodología en HPLC en medio HCl 0,1N

C1	Área promedio	SD	CV %	Conc. Encontrada	R
5,77E-03	1184283	12248	1,03	5,79E-03	100,32
5,77E-03	1170315	11655	1,00	5,72E-03	99,11
5,77E-03	1185060	6822	0,58	5,79E-03	100,38
Prom	1179886			Prom	99,94
SD	8298			SD	0,72
CV %	0,70			CV %	0,72
C2	Área promedio	SD	CV %	Conc. Encontrada	R
3,30E-03	679517	4103	0,60	3,28E-03	99,31
3,30E-03	682232	2665	0,39	3,29E-03	99,72
3,30E-03	684164	6791	0,99	3,30E-03	100,01
Prom	681971			Prom	99,68
SD	2334			SD	0,35
CV %	0,34			CV %	0,35
C3	Área promedio	SD	CV %	Conc. Encontrada	R
1,24E-03	273341	2550	0,93	1,25E-03	101,22
1,24E-03	272000	1982	0,73	1,25E-03	100,68
1,24E-03	274343	951	0,35	1,26E-03	101,62
Prom	273228			Prom	101,17
SD	1175			SD	0,47
CV %	0,43			CV %	0,47

TABLA 18: Exactitud y precisión de la metodología en HPLC en medio tampón acetato pH 4,5

C1	Área promedio	SD	CV %	Conc. Encontrada	R
5,77E-03	560.036	6907	1,23	5,85E-03	101,30
5,77E-03	554.593	9918	1,79	5,79E-03	100,31
5,77E-03	550.851	5350	0,97	5,75E-03	99,63
Prom	555.160			Prom	100,41
SD	4.618			SD	0,84
CV %	0,83			CV %	0,84
C2	Área promedio	SD	CV %	Conc. Encontrada	R
3,30E-03	323.926	2992	0,92	3,36E-03	101,95
3,30E-03	317.665	1388	0,44	3,30E-03	99,95
3,30E-03	323.477	3352	1,04	3,36E-03	101,81
Prom	321.689			Prom	101,24
SD	3.492			SD	1,11
CV %	1,09			CV %	1,10
C3	Área promedio	SD	CV %	Conc. Encontrada	R
1,24E-03	120.072	441	0,37	1,22E-03	98,44
1,24E-03	120.761	865	0,72	1,22E-03	99,03
1,24E-03	122.569	1166	0,95	1,24E-03	100,57
Prom	121.134			Prom	99,35
SD	1.289			SD	1,10
CV %	1,06			CV %	1,10

ANEXO 3

- Dimensiones

Las dimensiones fueron evaluadas en base a 10 comprimidos de cada laboratorio.

N°	A		B		C		D	
	Altura (cm)	D (cm)	Altura (cm)	D (cm)	Altura (cm)	D (cm)	Altura (cm)	D (cm)
1	0,300	0,645	0,310	0,725	0,310	0,670	0,310	0,580
2	0,300	0,650	0,320	0,730	0,320	0,660	0,300	0,570
3	0,300	0,650	0,310	0,730	0,320	0,665	0,300	0,570
4	0,295	0,650	0,295	0,730	0,320	0,665	0,290	0,570
5	0,300	0,650	0,320	0,725	0,310	0,670	0,300	0,570
6	0,295	0,650	0,320	0,735	0,310	0,655	0,300	0,575
7	0,295	0,650	0,320	0,720	0,300	0,660	0,300	0,575
8	0,295	0,650	0,320	0,730	0,310	0,670	0,300	0,580
9	0,295	0,645	0,320	0,740	0,310	0,670	0,280	0,575
10	0,295	0,645	0,320	0,730	0,310	0,670	0,310	0,570
Prom	0,297	0,649	0,316	0,730	0,312	0,666	0,299	0,574
SD	0,003	0,002	0,008	0,006	0,006	0,006	0,009	0,004
CV %	0,869	0,372	2,636	0,754	2,027	0,827	2,928	0,718

- Dureza:

Con la ayuda del durómetro se midió la dureza a 10 comprimidos seleccionados al azar, de los 4 laboratorios a analizar.

TABLA 19: Valores de dureza (Kp) de los comprimidos analizados

N°	A	B	C	D
	Dureza (Kp)	Dureza (Kp)	Dureza (Kp)	Dureza (Kp)
1	8,50	3,50	2,25	3,25
2	9,50	3,50	2,50	2,75
3	8,00	3,25	2,75	2,75
4	8,75	3,00	2,50	3,00
5	8,50	3,00	2,75	2,50
6	9,00	3,75	3,00	3,00
7	8,50	3,50	2,50	3,25
8	8,00	2,75	2,00	2,50
9	9,00	3,50	2,00	2,75
10	9,00	4,00	3,00	2,25
Prom	8,68	3,38	2,53	2,80
SD	0,47	0,38	0,36	0,33
CV %	5,44	11,18	14,35	11,76

- Peso

Se pesaron 20 comprimidos al azar, de cada laboratorio, en una balanza analítica.

TABLA 20: Valores de peso y peso promedio de los comprimidos analizados

N°	A	B	C	D
	Peso g	Peso g	Peso g	Peso g
1	0,096	0,124	0,105	0,073
2	0,099	0,131	0,110	0,074
3	0,098	0,130	0,107	0,075
4	0,103	0,132	0,110	0,077
5	0,100	0,137	0,117	0,074
6	0,101	0,133	0,112	0,075
7	0,098	0,128	0,112	0,074
8	0,100	0,134	0,111	0,072
9	0,103	0,142	0,105	0,074
10	0,100	0,134	0,102	0,075
11	0,097	0,142	0,108	0,075
12	0,101	0,134	0,109	0,075
13	0,099	0,138	0,121	0,076
14	0,099	0,128	0,097	0,074
15	0,103	0,128	0,103	0,074
16	0,098	0,134	0,097	0,074
17	0,099	0,131	0,104	0,075
18	0,098	0,136	0,104	0,073
19	0,099	0,129	0,102	0,075
20	0,099	0,133	0,112	0,077
Prom	0,100	0,133	0,107	0,075
SD	0,002	0,005	0,006	0,001
CV %	1,943	3,477	5,647	1,656

ANEXO 4

- Perfiles de disolución de los 12 comprimidos analizados de cada laboratorio en estudio.

➤ Medio HCl 0,1 N

Las figuras siguientes representan los perfiles de disolución de 12 comprimidos individuales, en medio HCl 0,1N, de los laboratorios analizados.

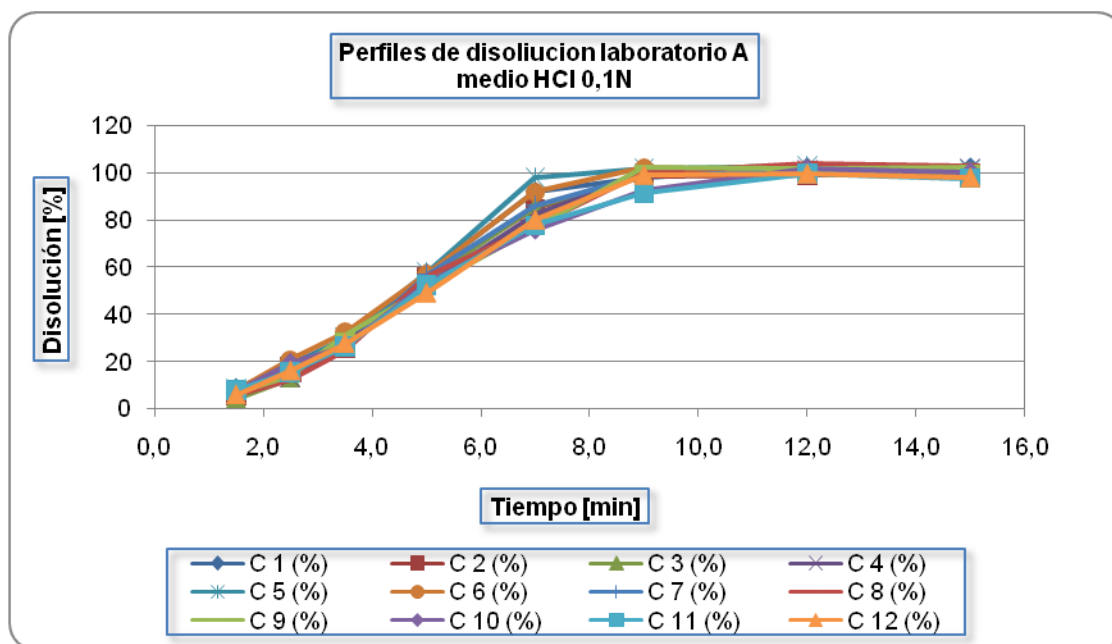


FIGURA 13: Perfiles de disolución laboratorio A HCl 0,1N (12 comprimidos)

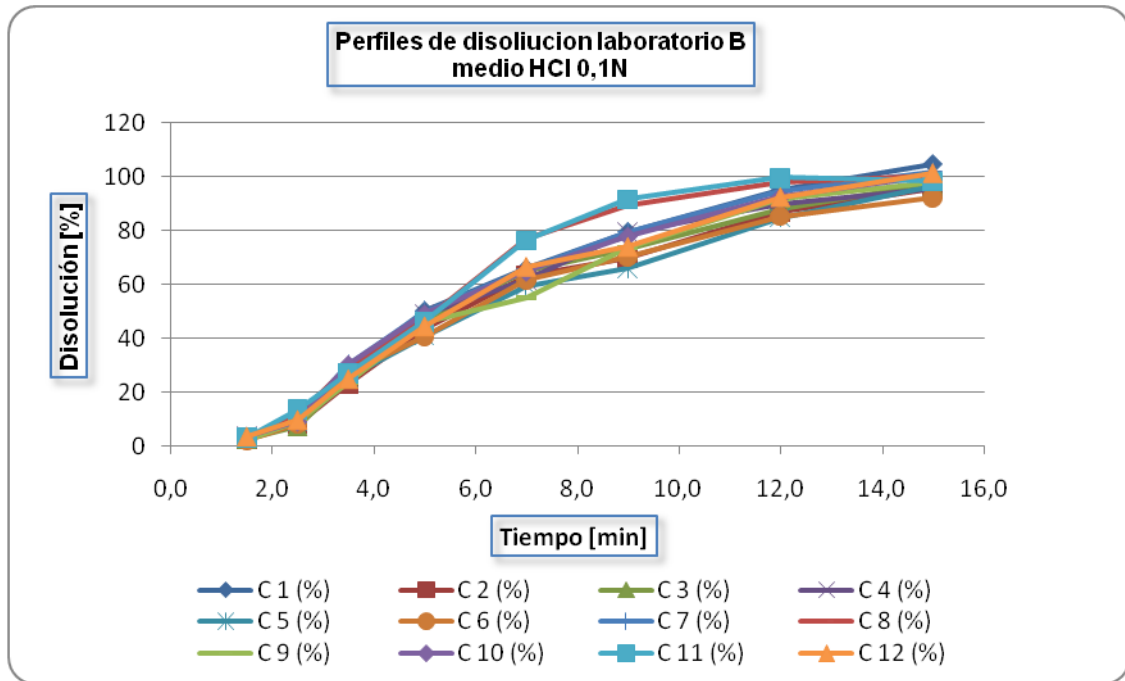


FIGURA 14: Perfiles de disolución laboratorio B HCl 0,1N (12 comprimidos)

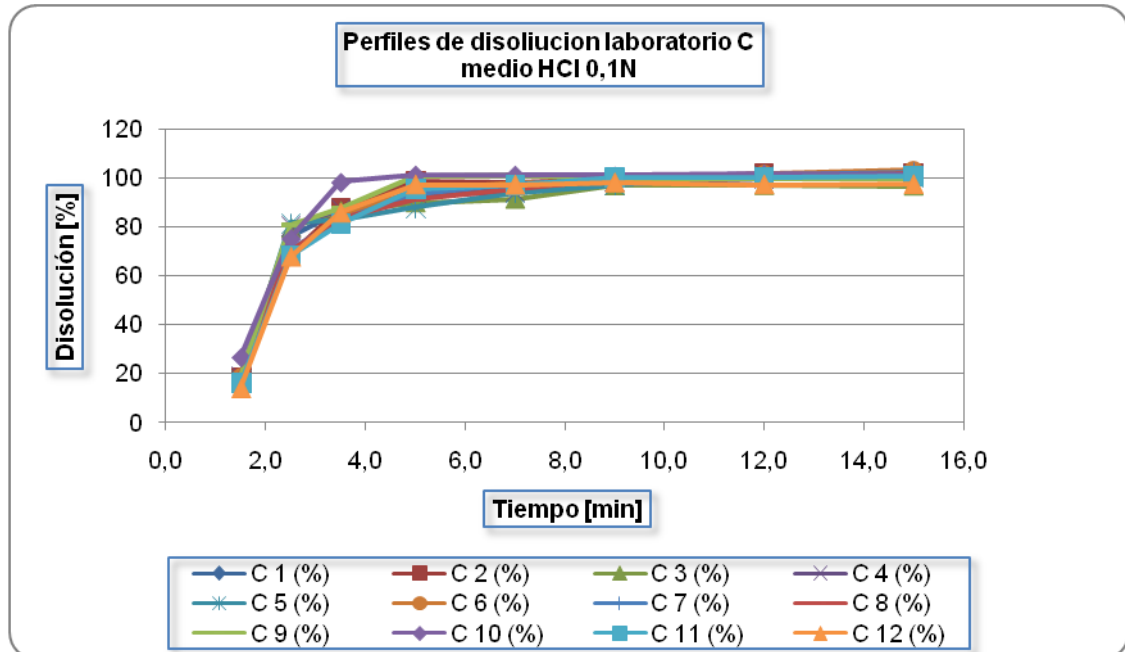


FIGURA 15: Perfiles de disolución laboratorio C HCl 0,1N (12 comprimidos)

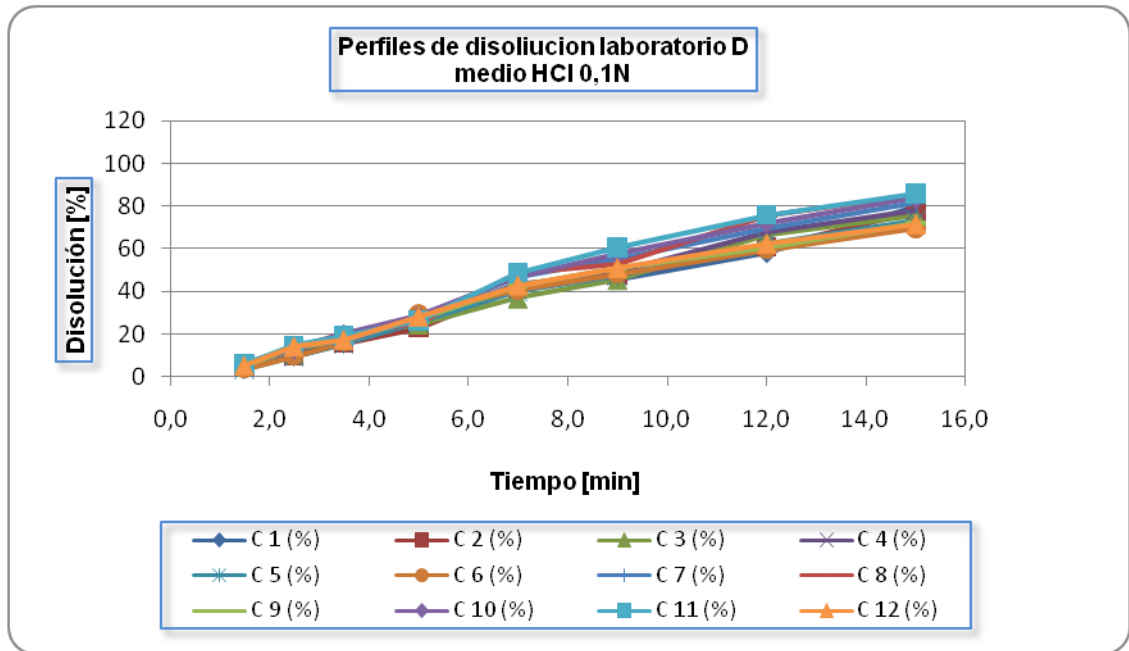


FIGURA 16: Perfiles de disolución laboratorio D HCl 0,1N (12 comprimidos)

➤ Medio tampón acetato pH 4,5

Las figuras que se presentan a continuación evidencian los perfiles de disolución de 12 comprimidos individuales, en medio tamponado acetato pH 4,5, de los laboratorios estudiados.

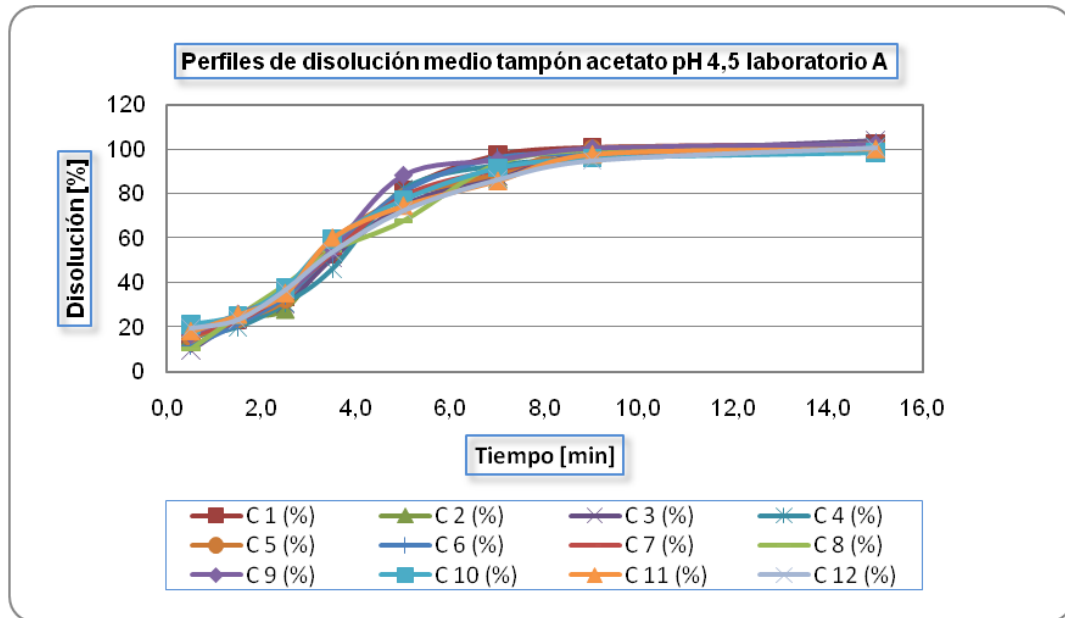


FIGURA 17: Perfiles de disolución laboratorio A medio tampón acetato pH 4,5 (12 comprimidos)

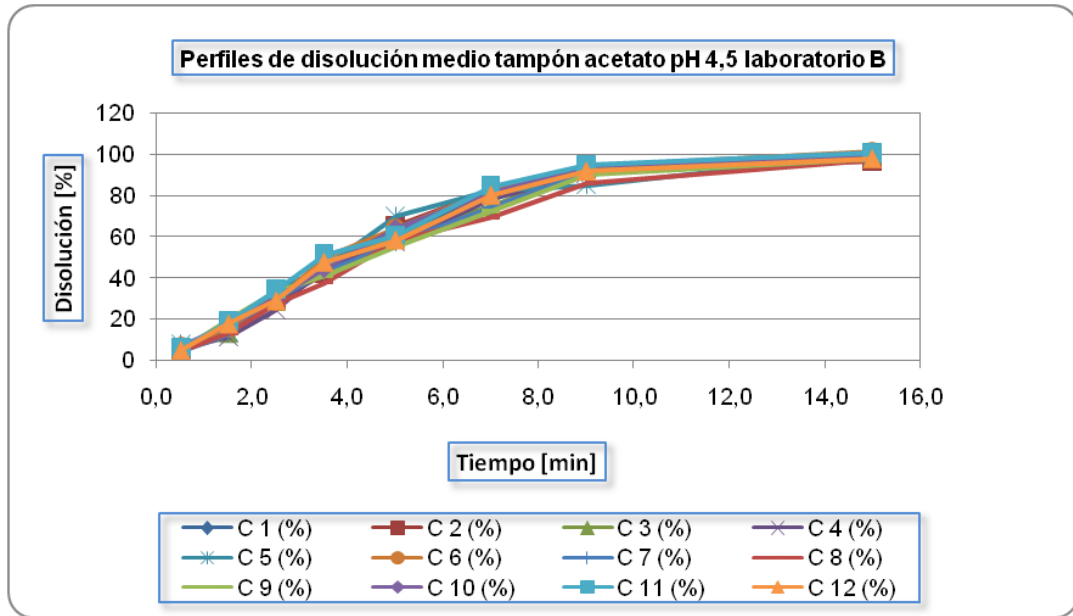


FIGURA 18: Perfiles de disolución laboratorio B medio tampón acetato pH 4,5 (12 comprimidos)

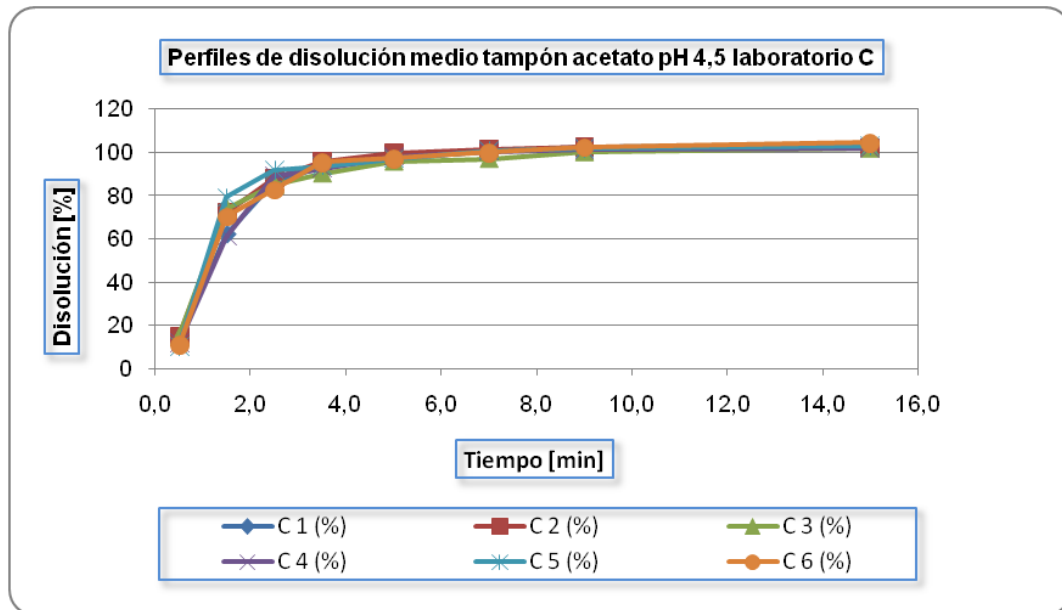


FIGURA 19: Perfiles de disolución laboratorio C medio tampón acetato pH 4,5 (12 comprimidos)

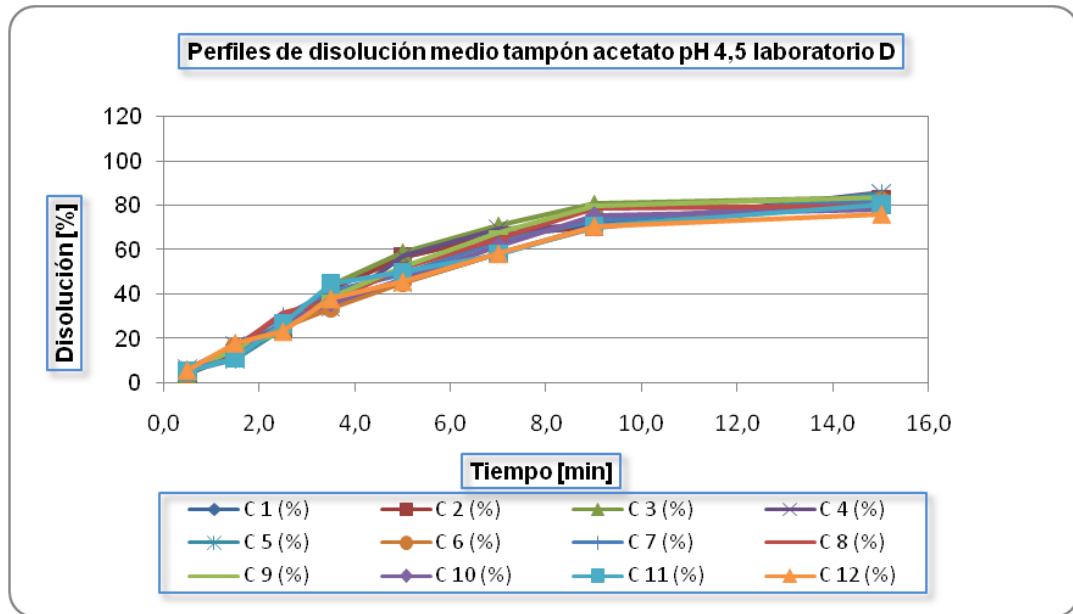


FIGURA 20: Perfiles de disolución laboratorio D medio tampón acetato pH 4,5

ABREVIATURAS

- Abs: absorbancia
- CV %: coeficiente de variación expresado en porcentaje
- Conc: concentración
- FR: factor respuesta
- D: diámetro
- Prom: promedio
- SD: desviación estándar.