



UNIVERSIDAD  
DE  
VALPARAISO  
C H I L E

Facultad de Farmacia

Química y Farmacia

**ANALISIS DE LOS PERFILES DE DISOLUCIÓN DE DICLOFENACO DESDE  
EL PRODUCTO DE REFERENCIA O COMPARADOR PARA ESTUDIOS DE  
BIOEQUIVALENCIA: FACTIBILIDAD COMO COMPARADOR PARA  
BIOEXENCION**

**TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO**

**CRISTIAN AMARAL ROJAS**

**Director: Alexis Aceituno, PhD**

**VALPARAÍSO. CHILE**

**2010**

**ABREVIATURAS**

EQT	Equivalencia terapéutica
FDA	US Food and Drug Administration
BE	Bioequivalencia
BD	Biodisponibilidad
API	Ingrediente farmacéutico activo
PA	Principio activo
BSC	Sistema de clasificación biofarmacéutico
FFSO	Forma farmacéutica sólida oral
FFSOLI	Forma farmacéutica sólida oral de liberación inmediata
FR	Factor de respuesta
CV	Coefficiente de variación
k`	Factor de capacidad

## INDICE DE TABLAS

**Tabla I:** Solubilidad de diclofenaco sódico obtenida de literatura científica.<sup>15</sup>

Dosis/Solubilidad (D/S).

**Tabla II:** Solubilidad de Diclofenaco potásico obtenida desde literatura científica.<sup>15</sup>

Dosis/Solubilidad (D/S).

**Tabla III:** Valores promedio (CV%) de parámetros farmacocinéticos de diclofenaco después de una dosis única oral de Cataflam<sup>®</sup> 50 y Voltarén<sup>®</sup> 50 liberación retardada.

**Tabla IV:** Matriz de diseño factorial completo de ocho ensayos.

**Tabla V:** Resultados y veredicto de la calibración química.

**Tabla VI:** Oxígeno disuelto en agua determinado con ECDO6 Dissolved Oxygen Sensor expresado como porcentaje respecto al O<sub>2</sub> presente en el aire.

**Tabla VII:** Desviación estándar relativa de la dispensación empleando el preparador de medios de disolución.

**Tabla VIII:** Repetibilidad de cuatro parámetros en HPLC de una muestra de diclofenaco sódico 0,0556mg/mL en medio buffer fosfato pH 6,8.

**Tabla IX:** Valores obtenidos para de la determinación de exactitud de flujo y su análisis estadístico.

**Tabla X:** Porcentaje de recuperación para una prueba de estabilidad de 48 horas, de soluciones de estándar de diclofenaco sódico y los productos farmacéuticos en estudio.

**Tabla XI:** Influencia de los factores de la metodología analítica sobre el área y su intervalo de confianza a pH 6,8.

**Tabla XII:** Influencia de factores de la metodología analítica sobre el tailing y su intervalo de confianza a pH 6,8.

**Tabla XIII:** Influencia de factores de la metodología analítica sobre  $k'$  y su intervalo de confianza a pH 6,8.

**Tabla XIV:** Influencia de factores de la metodología analítica sobre los platos teóricos y su intervalo de confianza a pH 6,8.

**Tabla XV:** Influencia de factores de la metodología analítica sobre el área y su intervalo de confianza a pH 4,5

**Tabla XVI:** Influencia de factores de la metodología analítica sobre el tailing y su intervalo de confianza a pH 4,5

**Tabla Nº XVII:** Influencia de factores de la metodología analítica sobre  $k'$  y su intervalo de confianza a pH 4,5.

**Tabla XVIII:** Influencia de factores de la metodología analítica sobre los platos teóricos y su intervalo de confianza a pH 4,5.

**Tabla XIX:** Influencia de factores de la metodología analítica sobre el área y su intervalo de confianza a pH 1,2.

**Tabla XX:** Influencia de factores de la metodología analítica sobre el tailing y su intervalo de confianza a pH 1,2.

**Tabla XXI:** Influencia de factores de la metodología analítica sobre  $k'$  y su intervalo de confianza a pH 1,2

**Tabla XXII:** Influencia de factores de la metodología analítica sobre los platos teóricos y su intervalo de confianza a pH 1,2.

**Tabla XXIII:** Parámetros estadísticos para el cálculo de la linealidad para una solución de estándar de diclofenaco sódico en siete niveles de concentración en tres medios de disolución.

**Tabla XXIV:** Evaluación de la repetibilidad en buffer pH 6,8 en tres niveles de concentración.

**Tabla XXV:** Evaluación de la precisión intermedia en buffer pH 6,8. Segundo día, tres niveles de concentración.

**Tabla XXVI:** Evaluación de la precisión intermedia en buffer pH 6,8. Tercer día, tres niveles de concentración.

**Tabla XXVII:** Evaluación de la repetibilidad en buffer pH 4,5 en tres niveles de concentración.

**Tabla XXVIII:** Evaluación de la precisión intermedia en buffer pH 4,5. Segundo día, tres niveles de concentración.

**Tabla XXIX:** Evaluación de la precisión intermedia en buffer pH 4,5. Tercer día, tres niveles de concentración.

**Tabla XXX:** Evaluación de la repetibilidad en solución pH 1,2 en tres niveles de concentración.

**Tabla XXXI:** Evaluación de la precisión intermedia en solución pH 1,2. Segundo día, tres niveles de concentración.

**Tabla Nº XXXII:** Evaluación de la precisión intermedia en solución pH 1,2. Tercer día, tres niveles de concentración.

**Tabla XXXIII:** Porcentaje de recuperación para cada nivel de concentración en tres medios de disolución y el CV (%) de las respuestas de las soluciones utilizadas.

**Tabla XXXIV:** Valores promedio de la cantidad disuelta (%) de diclofenaco sódico desde Voltarén<sup>®</sup> 50 en el proceso cinético de liberación-disolución en la etapa buffer pH 6,8 y el CV (%) de cada punto de muestreo.

**Tabla XXXV:** Valores promedio de la cantidad disuelta (%) de diclofenaco potásico desde Cataflam<sup>®</sup> 50 en el proceso cinético de liberación-disolución en la etapa buffer pH 6,8 y el CV (%) de cada punto de muestreo.

**Tabla XXXVI:** Parámetros analizados en la selección del modelo cinético de disolución de Voltarén<sup>®</sup> 50.

**Tabla XXXVII:** Parámetros analizados en la selección del modelo cinético de disolución de Cataflam<sup>®</sup> 50 en tres medios de disolución.

**Tabla XXXVIII:** Factor de similitud punto a punto (tiempo) para el perfil de disolución a pH 1,2 de diclofenaco potásico desde el producto comparador.

**Tabla XXXIX:** Factor de similitud punto a punto (tiempo) para el perfil de disolución a pH 4,5 de diclofenaco potásico desde el producto comparador.

## INDICE DE FIGURAS

**Figura N° 1:** Estructura química de diclofenaco.

**Figura N° 2:** Barrido del espectro de absorción de diclofenaco entre 200 nm y 400 nm.

**Figura N° 3:** Cromatograma inyección fase móvil.

**Figura N° 4:** Cromatograma inyección de medio de disolución pH 1,2.

**Figura N° 5:** Cromatograma inyección medio de disolución pH 1,2 más una gota de detergente.

**Figura N° 6:** Cromatograma inyección de estándar de diclofenaco sódico medio de disolución pH 1,2.

**Figura N° 7:** Cromatograma 3D obtenido para la cuantificación de Cataflam<sup>®</sup> 50 en medio de disolución pH 1,2.

**Figura N° 8:** Cromatograma luego de la exposición a pH 1,2 y luz solar de diclofenaco en Cataflam<sup>®</sup> 50 por cinco días.

**Figura N° 9:** Cromatograma inyección de medio de disolución pH 4,5.

**Figura N° 10:** Cromatograma inyección de medio de disolución pH 4,5 más una gota de detergente.

**Figura N° 11:** Cromatograma inyección del estándar de diclofenaco sódico al 100% de la concentración de trabajo, medio de disolución pH 4,5.

**Figura N° 12:** Cromatograma 3D obtenido para la cuantificación de Cataflam<sup>®</sup> 50 en medio de disolución pH 4,5.

**Figura N° 13:** Cromatograma resultante luego de la exposición a luz solar de Cataflam<sup>®</sup> 50 en medio de disolución pH 4,5 por cinco días.

**Figura N° 14:** Cromatograma inyección de medio de disolución pH 6,8.

**Figura N° 15:** Cromatograma inyección de medio de disolución pH 6,8 más una gota de detergente.

**Figura N° 16:** Cromatograma 3D obtenido para la cuantificación de Cataflam® 50 en medio de disolución pH 6,8.

**Figura N° 17:** Cromatograma resultante de la exposición a luz solar de Cataflam® 50 en medio de disolución pH 4,5 por cinco días.

**Figura N° 18:** Cromatograma resultante de la exposición a luz solar de Voltarén® 50 en medio de disolución pH 6,8 por cinco días.

**Figura N° 19:** Curva de calibrado para determinar linealidad del método analítico de diclofenaco en buffer pH 6,8.

**Figura N° 20:** Análisis de la influencia del intercepto en el eje de las ordenadas y el factor de respuesta en la linealidad de diclofenaco en buffer pH 6,8.

**Figura N° 21:** Curva de calibrado para determinar la linealidad del método analítico de diclofenaco en buffer pH 4,5.

**Figura N° 22:** Análisis de la influencia del intercepto en el eje de las ordenadas y el factor de respuesta en la linealidad de diclofenaco en buffer pH 4,5.

**Figura N° 23:** Curva de calibrado para determinar la linealidad del método analítico de diclofenaco en solución pH 1,2.

**Figura N° 24:** Análisis de la influencia del intercepto en el eje de las ordenadas y el factor de respuesta en la linealidad de diclofenaco en solución pH 1,2.

**Figura N° 25:** Regresión lineal de la cinética de disolución de diclofenaco sódico desde el producto Voltarén® 50 en medio de disolución pH 6,8.

**Figura N° 26:** Regresión lineal de la cinética de disolución de diclofenaco potásico desde el producto Cataflam® 50 en medio de disolución pH 6,8.

**Figura N° 27:** Comprimidos de diclofenaco sódico con recubrimiento entérico sometidos a una prueba de disolución en aparato 2 de la USP a 75 rpm, durante dos horas en medio buffer acetato pH 4,5.

**Figura N° 28:** Perfil de liberación disolución promedio de diclofenaco sódico desde Voltarén® 50 en medio de disolución buffer fosfato pH 6,8.

**Figura N° 29:** Perfil de liberación disolución promedio de diclofenaco potásico desde Cataflam® 50, en medio de disolución buffer fosfato pH 6,8.

**Figura N° 30:** Perfil de liberación disolución promedio de diclofenaco potásico desde Cataflam® 50, en medio de disolución buffer acetato pH 4,5.

**Figura N° 31:** Perfil de liberación disolución promedio de diclofenaco potásico desde Cataflam® 50, en medio de disolución HCl pH 1,2.

**Figura N° 32:** Perfil cinético de disolución individual de Cataflam® 50 en medio de disolución HCl pH 1,2.

**Figura N° 33:** Perfil cinético de disolución individual de Cataflam® 50 en medio de disolución buffer acetato pH 4,5.

## SUMMARY

The purpose of the present thesis project was to verify the feasibility of applying to biowaiver procedures for products containing Diclofenac, as sodium or potassium salts, through the determination and analysis of in vitro release/dissolution profiles from the pharmaceutical dosage forms selected as bioequivalence reference products, i.e. Voltaren™ 50, enteric coating tablets and Cataflam™50, sugar coated tablet, manufactured by Novartis Labs, Inc.

The analytical method used was high performance liquid chromatography (HPLC), whereas dissolution kinetics was performed by the use of a dissolution apparatus. The analysis consisted of evaluating the reference product kinetic profile and deciding if this fulfilled the requirements established in the regulatory framework to apply for biowaivers to in vivo bioequivalence studies, i.e. rapid or very rapid dissolution kinetic profiles. Both sodium and potassium diclofenac reference products fulfill the cGMP manufacturing conditions, quality specifications and labeling.

Results indicated that the reference product selected as comparator for similar products containing sodium Diclofenac did not accomplish the conditions to consider it as a reference product for biowaiver studies, a finding that mostly is a consequence of the enteric coated dosage form type.

In contrast, the selected reference product for similar pharmaceutical products containing potassium Diclofenac in fact can be used to compare release dissolution profiles, as this one fulfills the requirements of rapid dissolution/release rate. These findings could be used to support regulatory normative steps for pharmaceutical similar products that contain either salts of this active ingredient.

## RESUMEN

El propósito del presente trabajo de tesis fue verificar la factibilidad de aplicar el procedimiento para optar a bioexención de productos que contengan el principio activo diclofenaco, en sus sales sódica y/o potásica, a través de la determinación y análisis de los perfiles de liberación-disolución *in vitro* desde la forma farmacéutica respectiva, considerada como producto de referencia a los estudios de bioequivalencia: diclofenaco sódico Voltarén® 50 mg comprimidos con recubrimiento entérico y Cataflám® grageas de 50 mg<sup>1</sup>, ambos productos elaborados por Laboratorios Novartis S.A. Para la metodología analítica, se empleó la técnica por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y en las pruebas de disolución, un equipo de disolución manual. El análisis se basó en evaluar el perfil cinético del comparador y decidir si éste se ajustaba a los requisitos que establece el marco regulatorio de aplicación de las bioexenciones a los estudios de bioequivalencia *in vivo*, esto es, determinación de cinéticas de rápida o de muy rápida liberación-disolución. Estos productos cumplen con las condiciones de manufactura cGMP, de las especificaciones de calidad y de rotulación. Los resultados indicaron que el producto comparador seleccionado para aquellos productos similares que contienen diclofenaco sódico, no cumplía con las condiciones requeridas para ser considerado el producto de referencia de los estudios de bioexención, un resultado probablemente atribuible al tipo de forma farmacéutica, de liberación retardada del mismo. En contraste, el producto comparador seleccionado para formas farmacéuticas similares que contienen diclofenaco potásico, efectivamente puede ser empleado para comparar perfiles

de liberación disolución, dado que éste cumple con los requisitos de rápida liberación disolución del activo. Los resultados obtenidos podrían ser empleados para el sustento de la toma decisiones normativo regulatorias en uno u otro sentido, para productos que contengan sales de este principio activo.

## TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCION .....	1
PROPIEDADES FISICOQUIMICAS Y FARMACOLOGICA DE DICLOFENACO .....	8
HIPOTESIS .....	12
OBJETIVOS .....	13
OBJETIVO GENERAL .....	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
METODOLOGIA.....	15
1. EQUIPOS Y MATERIALES .....	15
2. REACTIVOS .....	16
3. VALIDACION DEL MÉTODO DE DISOLUCION .....	17
3.1. Prueba de aptitud del sistema .....	17
3.1.1. Calibración y Verificación del equipo de disolución .....	17
3.1.3. Preparación de la solución amortiguadora .....	19
3.1.4. Verificación del funcionamiento del equipo HPLC .....	19
3.2. Validación del método analítico.....	20
3.2.1. Estabilidad del analito en muestras y estándares.....	22
3.2.2. Robustez .....	23
3.2.3. Especificidad .....	26
3.2.4. Linealidad .....	27
3.2.5. Precisión.....	27
3.2.6. Exactitud.....	28
4. DETERMINACION DE LOS PERFILES DE DISOLUCION. ....	29
RESULTADOS Y DISCUSION.....	31
1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE DISOLUCIÓN .....	31
1.1. Prueba de aptitud del sistema .....	31
1.1.1. Calibración y Verificación del equipo de disolución .....	31
a) Calibración mecánica.....	31
b) Calibración química .....	31
1.1.2. Verificación del equipo preparador de medios de disolución.....	32
1.1.3. Verificación del equipo analítico, HPLC Shimadzu .....	33
1.2. Validación del método analítico.....	34
1.2.1. Estabilidad .....	34
1.2.3. Robustez .....	35
1.2.4. Especificidad .....	38
1.2.5. Linealidad .....	46
1.2.6. Precisión.....	50
1.2.7. Exactitud.....	54
2. PERFILES DE DISOLUCIÓN.....	54
CONCLUSION .....	69
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	70

## INTRODUCCION

Dentro del contexto del desarrollo de estudios de bioequivalencia (BE), cuyos lineamientos normativos y reguladores nacen de las proposiciones técnicas que elabora la Sección de Biofarmacia del Subdepartamento de Seguridad, del Departamento de Control Nacional del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), se establece la necesidad de cumplir con los requisitos de calidad, eficacia, seguridad y equivalencia terapéutica (EQT), establecidos en la Política Nacional de Medicamentos vigente <sup>2</sup>.

El objetivo final de la exigencia de los estudios de BE, es asegurar la disponibilidad y acceso a toda la población de medicamentos indispensables, eficaces, seguros y en donde se sustente su intercambiabilidad <sup>2</sup>.

Para garantizar la intercambiabilidad de productos farmacéuticos de fuentes múltiples (productos similares) <sup>3</sup>, estos deben cumplir con idénticos estándares de calidad, seguridad y eficacia que el producto de referencia, esto último a través de la provisión de evidencia razonable que permita establecer que el producto en estudio es terapéuticamente equivalente con el producto de referencia <sup>2</sup>.

En los estudios de bioequivalencia, el producto de referencia o comparador, que generalmente corresponde al producto innovador, desarrollado por la industria farmacéutica de investigación <sup>4</sup>, es definido por la autoridad sanitaria del respectivo país <sup>5</sup>. Por ejemplo, en los productos de fuentes múltiples que contienen el principio activo diclofenaco, sea en sus sales sódicas como potásicas, los productos de referencia son Voltarén<sup>®</sup> y Cataflám<sup>®</sup>, respectivamente, ambos elaborados por Laboratorios Novartis. Los productos similares que cuenten con

registro vigente o estén en el proceso de solicitud de registro en el país, deberán presentar, cuando corresponda, estudios que permitan establecer EQT ya sea medida por métodos “*in vivo*” o “*in vitro*”, de acuerdo a lo que se establece en la **“Norma que define los criterios destinados a establecer equivalencia terapéutica en productos farmacéuticos en Chile”**, cuyas bases científicas están avaladas internacionalmente por organismos regulatorios o de referencia <sup>7</sup>.

La FDA define Biodisponibilidad como la velocidad y cuantía en que se absorbe el ingrediente activo o la fracción activa de un fármaco desde una forma farmacéutica y queda disponible en el sitio de acción. La bioequivalencia es la ausencia de diferencia significativa en la velocidad y cuantía en que el ingrediente activo o la fracción activa de equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas se encuentran disponible en el sitio de acción farmacológico, cuando se administran en la misma dosis molar bajo condiciones estándares, en un estudio diseñado apropiadamente <sup>8</sup>.

Los productos de fuentes múltiples deben demostrar sea por métodos más complejos o menos directos, que son terapéuticamente equivalentes al producto de referencia para considerarlos intercambiables. Los métodos de prueba para considerar equivalencia son:

- Estudios farmacocinéticos comparativos en humanos, donde el ingrediente farmacéutico activo y/o de su (s) metabolito (s) se mide en función del tiempo en un fluido biológico accesible como la sangre, plasma, suero u orina, para obtener medidas farmacocinéticas tales como área bajo la curva y concentración máxima, que son reflejo de la exposición sistémica.
- Estudios farmacodinámicos comparativos en seres humanos.

- Estudios clínicos comparativos.
- Estudios comparativos *in vitro* <sup>9</sup>.

Las bases teóricas y científicas para optar a exenciones de estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia *in vivo*, es decir, demostrar la EQT a través de estudios comparativos de cinéticas de liberación-disolución *in vitro*, se basan en el sistema de clasificación biofarmacéutico (BCS) <sup>2, 10</sup>. El BCS fue propuesto en 1995 por Gordon Amidon y cols., y es un marco científico diseñado principalmente para identificar productos orales sólidos de liberación inmediata, que se divide en cuatro grupos de ingredientes farmacéuticos activos de acuerdo a su solubilidad dentro del rango de pH esperable a lo largo del tubo digestivo y de las propiedades de permeabilidad a través de la mucosa gastrointestinal <sup>5, 11</sup>. Si un fármaco muestra una farmacocinética lineal respecto a la dosis, presenta un amplio rango terapéutico, es estable en el rango de pH gastrointestinal y su perfil de disolución es suficientemente rápido, se puede plantear que no tendrá problemas relacionados con la absorción <sup>12</sup>.

Sistema de Clasificación  
Biofarmacéutico (BCS)

<p><b>Clase 1:</b> Alta solubilidad – Alta permeabilidad</p> <p><b>Clase 2:</b> Baja solubilidad – Alta permeabilidad</p> <p><b>Clase 3:</b> Alta solubilidad – Baja permeabilidad</p> <p><b>Clase 4:</b> Baja solubilidad – Baja permeabilidad</p>
---

Se considera a la Bioexención como la prerrogativa de la autoridad regulatoria para eximir de la obligación de presentar estudios de bioequivalencia *in vivo* para el establecimiento de la equivalencia terapéutica, la cual puede demostrarse mediante estudios *in vitro*. Los estudios de BE *in vitro* se definen como las pruebas que mediante condiciones experimentales científicamente

definidas, permiten establecer el perfil cinético de disolución de un principio activo desde una forma farmacéutica sólida <sup>8</sup>, cuyo objetivo será predecir su comportamiento *in vivo* <sup>11</sup>. Adicionalmente, se debe demostrar que la materia prima activa posee las características de solubilidad y permeabilidad que exige el marco regulatorio del sistema BCS.

El presente trabajo busca caracterizar el perfil cinético de la disolución del producto de referencia para estudios de BE de diclofenaco sódico y diclofenaco potásico, con la finalidad de determinar el patrón de liberación-disolución de estos productos, contribuyendo con información científico técnica que le permita a la autoridad regulatoria, tomar decisiones fundamentadas respecto de la posibilidad de subrogar los estudios de bioequivalencia en sujetos humanos para este tipo de formas farmacéuticas.

Basado en el BCS, el diclofenaco sódico y/o potásico corresponden a fármacos clase II, es decir, de alta permeabilidad y baja solubilidad <sup>13, 14</sup>. Se considera a un ingrediente farmacéutico activo como altamente soluble cuando la dosis máxima de su forma sólida de liberación inmediata es soluble en 250 mL o menos de medio acuoso dentro de un rango de pH entre 1 y 6,8 <sup>14</sup>. Para el diclofenaco sódico en cantidad de 50 mg, se describe, bajo el concepto anterior mencionado, que a pH inferior a 6,0 éste no posee alta solubilidad, la cual decrece, a medida que aumenta la acidez del medio como se observa en la Tabla I.

**Tabla I.** Solubilidad de Diclofenaco sódico obtenida desde literatura. Dosis/Solubilidad (D/S) <sup>15</sup>.

pH	Medio	Solubilidad mg/mL (23 ±2°C)	mL de medio para solubilizar 50mg de diclofenaco sódico
1,2	0,1 HCl	0,0012	50000
2,0	0,01 HCl	0,0017	29412
3,0	0,001 HCl	0,28	179
4,5	Buffer acetato	0,0036	13889
5,5	Buffer acetato	0,036	1389
5,8	Buffer fosfato	0,14	357
6,0	Buffer fosfato	0,15	333
6,8	Buffer fosfato	0,67	75
7,4	Buffer fosfato	5,15	10

Una limitación en la clasificación biofarmacéutica por solubilidad del ingrediente farmacéutico activo (API), es que ésta no considera la dinámica natural del proceso de absorción <sup>16</sup>. La absorción del diclofenaco es cercana a un 100% y tiene lugar en el duodeno yeyuno <sup>15</sup>, zona en la que las condiciones fisiológicas de pH asegura está una alta solubilidad para el fármaco (Tabla 1). Los problemas de solubilidad del activo se presentan a valores de pH < 4,5, especialmente a valores bajo su  $pK_a = 3,8$  a 25°C <sup>15,17</sup>, situación en la cual el fármaco se halla principalmente como su forma de ácido libre (baja solubilidad en acuosa) <sup>18</sup>. La forma farmacéutica que se comercializa corresponde a comprimidos de 50 mg del principio activo, con recubrimiento entérico. Dado estas características, se consideraría entonces que la solubilidad no sería un riesgo potencial, conducente a problemas de bioequivalencia <sup>15</sup> y eventualmente formas farmacéuticas convencionales que contengan este principio activo podrían optar a bioexención. Esto se ha postulado en artículos de investigación y por paneles de expertos que

concuerdan con la posibilidad de extender los estudios de bioexención para los fármacos clase II del BCS. En consecuencia, para un ácido débil, una bioexención a los estudios de bioequivalencia podría ser considerada cuando la solubilidad de la dosis máxima en 250 mL de medio o menos a pH 6,8 resulta en un número de solubilidad menor a 1 (alta solubilidad) <sup>16, 19, 20</sup>. La misma argumentación podría aplicarse en el caso de la sal potásica del principio activo, aunque se observan ligeros cambios de su solubilidad en función del pH del medio (Tabla II).

**Tabla II.** Solubilidad de Diclofenaco potásico obtenida desde literatura. Dosis/Solubilidad (D/S) <sup>15</sup>.

pH	Medio	Solubilidad (mg/mL) (23 ±2°C)	mL de medio para solubilizar 50mg de diclofenaco potásico
4,5	Buffer acetato	0,0014	35714
6,8	Buffer fosfato	0,7167	70
7,4	Buffer fosfato	2,341	21

Respecto de la permeabilidad intestinal de diclofenaco, ésta se ha estudiado tanto *in vivo* como *in vitro* <sup>15</sup>. Por ejemplo, un estudio realizado en células monocapa Caco-2 para determinar la permeabilidad de diclofenaco en dirección tanto apical-basolateral como basolateral-apical, mostró un coeficiente de permeabilidad ( $P_{\text{caco-2}}$ ) de  $20,2 \cdot 10^{-6}$  y  $21,3 \cdot 10^{-6}$  cm/s, respectivamente, mientras que con metoprolol y verapamilo, moléculas que se utilizan como referencia de alta permeabilidad, en las mismas condiciones, se obtuvo un  $P_{\text{caco-2}}$  de  $43,4 \cdot 10^{-6}$  cm/s;  $34,1 \cdot 10^{-6}$  cm/s y  $15,8 \cdot 10^{-6}$  cm/s;  $21,1 \cdot 10^{-6}$  cm/s, respectivamente <sup>21</sup>.

En 1995, la introducción del sistema de clasificación biofarmacéutico (BCS), permitió simplificar los procedimientos para la demostración de EQT *in vivo*, al hacer posible reemplazar los estudios de BE en sujetos humanos, por pruebas de

disolución *in vitro* (bioexención); las pruebas *in vitro* tiene además otras ventajas tales como la disminución del costo de los estudios, la agilización en el desarrollo de nuevas formulaciones y el evitar exponer a potenciales riesgos de la medicación a voluntarios sanos<sup>19</sup>. Inicialmente los procedimientos de bioexención estuvieron dirigidos a formas farmacéuticas sólidas orales de liberación inmediata, en donde el principio activo fuera perteneciente a la clase I del BCS y la forma farmacéutica tuviera perfiles de muy rápida o rápida liberación-disolución. No obstante, se ha establecido un consenso respecto de que este sistema es particularmente conservador al momento de establecer los límites de solubilidad y permeabilidad del API, además de los criterios de disolución de la forma farmacéutica<sup>22</sup>. Un número importante de publicaciones científicas han establecido los argumentos que justifican la posibilidad de extender los procedimientos de bioexención, y estimular su adopción por entidades regulatorias especialmente en países en vías de desarrollo<sup>19</sup>.

Dentro de los estudios de BE, la etapa final es el análisis estadístico de los resultados obtenidos. Esta etapa es de crucial importancia ya que es donde se decide si el producto de prueba es o no bioequivalente respecto al producto de referencia<sup>23</sup>. En las pruebas de comparación de perfiles de disolución, además de cumplir con los criterios de aceptación en cada etapa de la validación de la metodología analítica<sup>13</sup>, el criterio para establecer BE es en base al cálculo del factor de similitud entre las cinéticas de liberación-disolución del producto comparador y el producto en estudio, que se deben realizar en las mismas condiciones experimentales. Para caracterizar cada cinética de liberación disolución, se toman como mínimo cuatro puntos de muestreo antes que un 85%

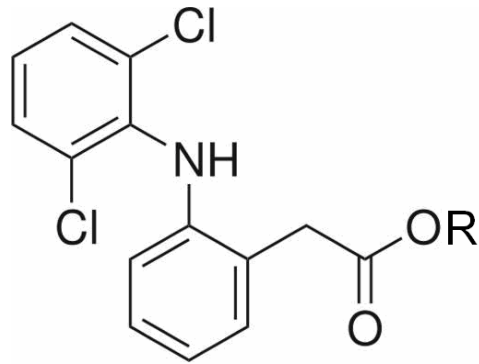
del fármaco se disuelva, y un punto como mínimo después de haber alcanzado ese porcentaje<sup>7</sup>.

La extensión de bioexenciones para los principios activos de carácter ácido débil, pertenecientes a la clase II del BCS (asumida por la OMS en el año 2006) ha estimulado el desarrollo de este trabajo experimental. Para ser candidatos a bioexención, el API en su potencia máxima comercializada, debería ser soluble en 250 mL o menos de un medio a pH 6,8, siempre que la forma farmacéutica presente un perfil de rápida liberación-disolución del activo. Adicionalmente, los productos en estudio deberían tener un comportamiento similar al comparador a pH 1,2 y 4,5<sup>4,5</sup>.

El diclofenaco, en sus sales sódicas y potásicas, cumple con el criterio de solubilidad (tablas 1 y 2), y existe evidencia suficiente y clara respecto de sus características de permeabilidad alta, de tal modo que el propósito de este trabajo de tesis es establecer, por medio de la generación de los perfiles de liberación-disolución si adicionalmente cumple con este requisito de la forma farmacéutica. Con este objetivo, se evaluarán los perfiles de disolución de los productos seleccionados como comparador para las sales sódicas (Voltarén<sup>®</sup> 50) y potásicas (Cataflam<sup>®</sup> 50) del principio activo a pH 6,8.

### **Propiedades Físicoquímicas y Farmacológica de Diclofenaco**

El diclofenaco, ya sea como su sal sódica o potásica, es un derivado fenilacético, cuyo nombre químico es ácido 2-[2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil]acético, y su fórmula molecular es  $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$  y  $C_{14}H_{10}Cl_2NKO_2$ , respectivamente<sup>6, 15, 24, 25</sup>. Su estructura se observa en la figura 1:



**Figura N° 1:** Estructura química de diclofenaco.

R = Na: Diclofenaco sódico; R = K: Diclofenaco potásico.

Los pesos moleculares de la sal sódica y potásica son 318,14 y 334.25 g/mol, respectivamente. El fármaco como ácido libre es fácilmente soluble en metanol, soluble en etanol, prácticamente insoluble en cloroformo, éter y ácido diluido. La sal sódica tiene una solubilidad en agua que es dependiente del pH, mientras que la sal potásica posee un comportamiento similar. El coeficiente de partición octanol/agua, en ambas sales es de 13,4 a pH 7,4 y 1545 a pH 5,2. Ambas sales tienen una sola constante de disociación ( $pK_a$ ) que en agua a 25°C es de  $3,8 \pm 0,2$  <sup>6, 15, 24, 25</sup>.

El código para diclofenaco según el sistema de clasificación anatómica terapéutica es M01AB05, es decir, se clasifica como un producto antiinflamatorio y antirreumático no esterooidal, derivado del ácido acético y sustancias relacionadas <sup>26</sup>.

La formulación de diclofenaco sódico (Voltarén<sup>®</sup> 50) contiene los siguientes ingredientes inactivos: dióxido de silicio, celulosa microcristalina, estearato de magnesio, lactosa monohidratada, almidón de maíz, polividona,

carboximetilalmidón sódico, hipromelosa, óxido de hierro amarillo, óxido de etileno con aceite de ricino hidrogenado, óxido de hierro rojo, talco, dióxido de titanio, resina acrílica de ácido metacrílico y del éster metacrílico, Macrogol 8000, y emulsión de simeticona.

La formulación de diclofenaco potásico (Cataflam<sup>®</sup> 50) contiene los siguientes ingredientes inactivos: fosfato cálcico tribásico, óxido de hierro rojo, celulosa microcristalina, estearato de magnesio, polietilen glicol, povidona, almidón glicolato sódico, almidón de maíz, sacarosa, macrogol, talco, dióxido de titanio y palmitato de cetilo.

El anión de diclofenaco, como fármaco es un antiinflamatorio no esterooidal (AINES), presenta actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética. Su mecanismo de acción es mediante la inhibición estereoespecífica, competitiva y reversible de la enzima ciclooxigenasa (COX) <sup>27</sup>, lo que resulta en una disminución de la síntesis de prostaglandinas <sup>5, 6</sup>. El diclofenaco no es un inhibidor selectivo de COX-2, sin embargo muestra mayor afinidad por esta que por COX-1 <sup>28</sup>.

Respecto de las propiedades farmacocinéticas, entre Voltarén<sup>®</sup> 50 y Cataflam<sup>®</sup> 50, se observan pequeñas variaciones, originadas principalmente por la diferencias en la formulación que modifica el patrón de liberación que influye a su vez en la absorción, como se observa en la siguiente tabla <sup>25</sup>.

**Tabla III:** Promedio (CV%) de los parámetros farmacocinéticos de diclofenaco después de una dosis única oral de Cataflam<sup>®</sup> 50 y Voltarén<sup>®</sup> 50 liberación retardada<sup>25</sup>.

<b>Fármaco</b>	<b>Dosis (mg)</b>	<b>AUC (ng•hr/mL)</b>	<b>Cmax (ng/mL)</b>	<b>Tmax (hr)</b>
<b>Cataflam</b>	50	1309 (21,7%)	1312 (44,1%)	1,00 (74,6%)
<b>Voltarén</b>	50	1429 (38,4%)	1417 (22,4%)	2,22 (49,8%)

El diclofenaco, luego de la administración oral, se absorbe en un 100%, basado en estudios de recuperación del fármaco en la orina, que determinan su disposición en comparación a la administración intravenosa<sup>6, 29</sup>. El efecto de primer paso hepático limita su biodisponibilidad a un 50%. Su unión a proteínas plasmáticas es de 99%, su clearance y volumen de distribución es de ~350 mL/min y ~550 mL/Kg, respectivamente. Tiene una vida media plasmática aproximada de dos horas, sin embargo su acumulación en el líquido sinovial, donde consigue una vida media cercana a 7 horas, explica la duración de su efecto<sup>6, 25</sup>. El fármaco se elimina por orina (65%) y por bilis (35%), tras sufrir 4'-hidroxilación (reacción catalizada por el citocromo P450 CYP2C9) y conjugación<sup>27, 30</sup>.

El diclofenaco está indicado en el tratamiento agudo y crónico de los signos y síntomas de la artritis reumatoidea, osteoartritis, y espondilitis anquilosante, dolor agudo de diversa etiología asociado a inflamación como dismenorrea primaria, postoperatorio, postparto, cólico renal. La dosis oral habitual es de 50 mg cada 8 horas<sup>27</sup>.

## **HIPOTESIS**

Dado que el diclofenaco en sus sales sódicas y potásicas posee una solubilidad dependiente del pH, la cual satisface los requerimientos de bioexención a pH superiores a 6 (fármacos clase II), el análisis de las características del perfil cinético de liberación-disolución de diclofenaco en sus sales sódicas y potásicas, desde los productos considerados comparadores para los estudios de bioequivalencia, permitirá concluir si estos comparadores cumplen con los requisitos técnicos establecidos en el marco regulatorio de los estudios biofarmacéuticos con fines de bioexención, respecto de las características de la forma farmacéutica.

## OBJETIVOS

### **Objetivo general:**

Obtener, analizar y concluir si los perfiles cinéticos de liberación disolución de diclofenaco como sal sódica y/o potásica, desde los productos considerados como referencia o comparador para los estudios de bioequivalencia se adecúan a los requisitos que establece el marco regulatorio de las bioexenciones.

### **Objetivos específicos:**

- Realizar la validación de la metodología analítica por HPLC para la cuantificación de diclofenaco sódico y potásico y la calibración del equipo de disolución.
- Realizar la prueba de desafío del recubrimiento entérico de Voltaren® comprimidos con recubrimiento entérico de 50 mg, según lo especifica la USP (31)<sup>24</sup>.
- Analizar los perfiles de liberación disolución de diclofenaco sódico desde la forma farmacéutica considerada como producto de referencia en buffer fosfato pH 6,8 (Voltaren comprimidos con recubrimiento entérico 50 mg).
- Analizar los perfiles de liberación disolución de diclofenaco potásico desde la forma farmacéutica considerada como producto de referencia, en buffer pH 1,2; 4,5 y 6,8 (Cataflam grageas 50 mg).

- Decidir de acuerdo a los resultados anteriores, si los productos de referencia permiten que sus características de liberación disolución los consideren indicados como comparadores para estudios biofarmacéuticos con fines de bioexención.

## METODOLOGIA

### **1. EQUIPOS Y MATERIALES**

- Equipo cromatógrafo HPLC Shimadzu LC-20A Prominence Liquid Chromatograph, equipado con sistema de inyección automática SIL-20A Prominence Autosampler, detector SPD-M20A Prominence Diode Array Detector (DAD) (Longitud de onda de extracción para la detección de Diclofenaco = 254nm), integrador CBM-20A Prominence Communicator Bus Module. Software LCsolution.
- Columna packing L7 (C8, end capped) 250 mm de largo, diámetro interno 4,6 mm, tamaño de partícula de 5 $\mu$ .
- Equipo de disolución ERWEKA DT 700, aparato 2 a 75 rpm <sup>13</sup>.
- Preparador de medios de disolución Media Preparator EMP-21 de Electrolab.
- Purificador de agua Barnstead, modelo NANO pure Diamond.
- Balanza analítica Sartorius, modelo CP225D 0,00001 g
- Balanza granataria Belltronic Scales, modelo ES-6000H
- pH-metro Fisher Scientific, Accumment model 15
- Baño ultrasónico MRC, modelo DC 50H
- Agitador magnético con placa térmica Torrey Pines Scientific, modelo HS 1112
- Filtros para jeringa de membrana GV PVDF 0,22  $\mu$ m, Millipore
- Filtros de membrana de esteres de celulosa 0,22  $\mu$ m, Millipore
- Medidor de oxígeno disuelto ECDO6 Handy 12mm Dissolved Oxygen Sensor, Eutech Instruments.

## **2. REACTIVOS**

- Estándar secundario de diclofenaco sódico, (primarizado con estándar USP diclofenaco sódico); Pureza: 99,4%
- Estándar ácido salicílico RS USP
- Estándar prednisona RS USP
- Tabletas ácido salicílico RS USP lote Q0D200
- Tabletas prednisona RS USP lote P0E203
- Metanol grado HPLC (Merck)
- Fosfato monobásico de sodio (J.T. BAKER)
- Fosfato monobásico de potasio (J.T. BAKER)
- Acido fosfórico 85% (MERCK)
- Acetato de sodio (MERCK)
- Acido acético glacial (MERCK)
- Acido clorhídrico 37% (Riedel de Haën)
- Cloruro de potasio (J.T. BAKER)
- Hidróxido de sodio lentejas (J.T. BAKER)
- Fosfato dibásico de potasio (J.T. BAKER)

### **3. VALIDACION DEL MÉTODO DE DISOLUCION**

#### **3.1. Prueba de aptitud del sistema**

##### **3.1.1. Calibración y Verificación del equipo de disolución<sup>7</sup>**

###### **a) Calibración mecánica:**

- Se realizó una inspección visual general del equipo: limpieza, detección de grietas, roturas, etc.
- Se realizó una inspección del equipo que comprenda horizontalidad, nivel del baño y vibración externa presente.
- Se inspeccionó el sistema de agitación: vaivén del eje mediante un dial indicador, centrado de los vástagos en relación a los vasos mediante un disco de centrado, la altura de las paletas en relación al fondo de cada vaso utilizando un patrón de medida, se evalúa la velocidad de rotación a través de un tacómetro, la temperatura y fluctuaciones del baño con termómetro calibrado<sup>13</sup>. (Anexo)
- Esta prueba además se realizó antes de ejecutar cada estudio cinético de disolución<sup>31</sup>.

###### **b) Calibración química:**

Se realizaron pruebas de confiabilidad del equipo de disolución usando comprimidos calibradores USP de prednisona (con desintegrante) y ácido salicílico (sin desintegrante). Los resultados obtenidos en estas pruebas luego de seguir el procedimiento descrito en la USP 31 para el aparato de

disolución 2, deben estar dentro de los límites de aceptación del lote evaluado <sup>13, 32</sup>.

### **3.1.2. Verificación del equipo preparador de medios de disolución EMP-21.**

Se verificó la capacidad del preparador y dispensador de medios de disolución (desgasificador).

La desgasificación se evaluó utilizando un medidor de oxígeno disuelto y se realizó comparando los resultados al analizar el medio (agua bidestilada en este caso) antes y después de ser desgasificados. El resultado se expresa en porcentaje de oxígeno disuelto, calibrando el instrumento a 100% cuando el electrodo se encuentra expuesto al aire. El agua sin desgasificar tiene aproximadamente un 85% de saturación de oxígeno y el preparador de medios de disolución logra reducir este porcentaje hasta un 40% <sup>33</sup>. Se realizan tres lecturas al agua sin desairear y cinco lecturas al agua posterior a la desgasificación e inmediatamente después de ser dispensada.

El equipo realiza la desgasificación del medio, llevándolo a vacío a 760 mmHg y haciéndolo recircular; además, el proceso se ve favorecido puesto que el equipo es capaz de llevar el medio de disolución a 41°C, como lo indica la USP 31 <sup>33</sup>.

La verificación de la dispensación se realizó pesando un número determinado (6) de dispensaciones de 750 mL en vasos de disolución, luego se calcula el volumen en función de la densidad del agua a la temperatura de ésta cuando se realizó la pesada, y se determina la exactitud de la dispensación respecto del valor nominal, cuyo error debe ser menor al 2% <sup>33</sup>.

### 3.1.3. Preparación de la solución amortiguadora

Los medios de disolución se elaboraron siguiendo las instrucciones de la USP 31 sobre la preparación de soluciones amortiguadoras. Para la solución de pH 1,2 se utilizó 0,75 g de cloruro de potasio y 6,76 mL de ácido clorhídrico (37%) por litro; la solución amortiguadora pH 4,5 se obtuvo por adición de 1,89 g de acetato de sodio y 1,68 mL de ácido acético glacial por litro; la solución amortiguadora pH 6,8 se obtuvo por adición de 6,81 g de fosfato monobásico de potasio y 0,88 g de hidróxido de sodio por litro. Las tres soluciones amortiguadoras se ajustaron con HCl 0,1 N y NaOH 0,1 N según necesidad, para mantener el pH siempre dentro de  $\pm 0,05$  unidades respecto del valor especificado <sup>13, 24</sup>.

### 3.1.4. Verificación del funcionamiento del equipo HPLC

El ruido de la señal base se evaluó antes de cada análisis y siempre fue menor a  $5 \cdot 10^{-4}$  Volt.

Se verificó la intensidad de la lámpara de deuterio utilizada por el detector y la exactitud de longitud de onda a través de un sistema de autochequeo incluido en el software LCsolution.

Al evaluar el funcionamiento de la bomba cuaternaria se observó una falla, la que consiste en un arrastre de contenido del canal A cuando se utiliza el canal B y/o C. Esta situación se presumía también por observarse una disminución lenta y progresiva de la presión del sistema cuando se realizaron los primeros ensayos, provocado por el aumento de la proporción de fase orgánica en la fase móvil al ingresar una cantidad de acetonitrilo (canal A) que no estaba considerada nominalmente. Al utilizar los canales A o D no se presenta esta falla. Por este

motivo, se decidió preparar la fase móvil manualmente y hacerla correr solo por el canal D.

En estas condiciones se realizó una prueba de aptitud del sistema (en las condiciones cromatográficas del método analítico empleado) por medio de un análisis de repetibilidad. Esto permite en función de la respuesta (área), tiempos de retención, factor de capacidad, platos teóricos y tailing evaluar indirectamente el volumen de inyección, la longitud de onda y la integración<sup>34, 35</sup>. Además se evaluó la exactitud de flujo.

La exactitud del flujo se determinó programando la velocidad de flujo de la bomba en 1,0 mL/min. Se recibe el flujo en un matraz aforado de 10 mL y con un cronometro se mide el tiempo empleado en llegar al aforo. El límite aceptable de variación es de 10%<sup>34</sup>.

### **3.2. Validación del método analítico**

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa es el método analítico seleccionado. La capacidad de este método de separar los componentes de una muestra en función de la distinta afinidad de estos por la fase móvil y fase estacionaria nos da una gran ventaja en sensibilidad y selectividad sobre la molécula en análisis, además de permitirnos detectar eventuales interferencias provenientes, por ejemplo, de la matriz de la muestra, productos de degradación, fase móvil, etc. El sistema de detección con arreglo de diodos acoplado al HPLC favorece aún más la selectividad<sup>36</sup>.

El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar si es apto e idóneo respecto de su finalidad<sup>37</sup>. La USP (31) clasifica en cuatro

categorías (I, II, III, IV) los métodos analíticos para establecer los parámetros requeridos para su validación. En la categoría III están los métodos analíticos empleados para evaluar características de desempeño, como liberación-disolución de fármacos, por lo tanto, se evaluarán los parámetros requeridos para la categoría III.

De los siguientes parámetros, para la categoría III, solo la precisión se exige siempre, los demás se requerirán dependiendo de la naturaleza de cada prueba específica: linealidad, exactitud, precisión, especificidad, límites de cuantificación y detección del analito e intervalo. Además de la precisión (precisión intermedia y repetibilidad), se evaluará exactitud, especificidad, linealidad, robustez y estabilidad del analito <sup>13</sup>. La validación se realiza para los tres medios de disolución (pH 1,2; pH 4,5; pH 6,8).

La validación del método analítico comienza con las pruebas de estabilidad y robustez, con la finalidad de determinar la manipulación adecuada de las muestras y especificar las condiciones cromatográficas del método, respectivamente.

Respecto a las concentraciones de las soluciones utilizadas en la etapa de validación, se considera una concentración de 100% cuando, a pH 6,8 esta sea cercana a 0,0556 mg/mL (representando la concentración resultante de la dosis unitaria en el volumen del medio de disolución: 50mg/900mL), a pH 4,5 ~0,01mg/mL y a pH 1,2 ~0,003mg/mL (ambas correspondientes a una concentración cercana a la máxima solubilidad del diclofenaco a estos pH).

En la manipulación del diclofenaco en sus sales sódicas y potásicas a pH 1,2 se observó en las señales cromatográficas la aparición de un nuevo peak

( $t_r \sim 5,5$  minutos) cuya intensidad (área uV) aumenta de forma proporcional a una disminución del peak principal ( $t_r \sim 10$  minutos) en función del tiempo. Esto probablemente puede ser el resultado de la mayor proporción de diclofenaco como ácido libre respecto del anión, debido al ambiente ácido proporcionado por el medio de disolución pH 1,2. Esto modificaría la polaridad del analito, por lo tanto, su distribución hacia las fases móvil y estacionaria (comportamiento a través de la columna), lo que justificaría el origen del nuevo peak ( $t_r \sim 5,5$  minutos). La velocidad de disminución en la señal del analito se determinó como  $0,0827 \mu\text{g/h}$ . Teniendo en cuenta el tiempo que toman los ensayos, desde la cinética de disolución hasta la lectura de todas las muestras, que sería de aproximadamente 24 h, es evidente que el resultado podría verse alterado. Por lo tanto, las muestras analizadas a pH 1,2, luego de ser recolectadas desde los vasos de disolución, son filtradas y llevadas a un pH  $>$  a 4,0 por adición de una solución buffer fosfato 0,1 M pH  $\sim 8,0$ , en una proporción de 1mL por cada 4mL de muestra. En cada paso de la validación a pH 1,2 se realizó el mismo procedimiento.

### **3.2.1. Estabilidad del analito en muestras y estándares.**

La estabilidad se evaluó tanto para el estándar utilizado como para las muestras en análisis. Se preparan soluciones de concentración conocida y cercana al 100% de estándar en las condiciones de trabajo. Luego, éstas se almacenan en condiciones que favorezcan su estabilidad (en matraces de vidrio color ámbar, a objeto de evitar la degradación fotoquímica del diclofenaco)<sup>38</sup>. Las muestras se analizaron a tiempo cero, a las 24 horas y 48 horas desde su preparación, en condiciones de refrigeración y temperatura ambiente. El mismo

procedimiento se aplicó a las muestras de análisis obtenidas desde los vasos de disolución. Se realizan tres lecturas de cada muestra, cada día y el porcentaje de recuperación debe encontrarse entre 98 y 102% del valor promedio <sup>13</sup>.

### **3.2.2. Robustez**

La robustez permite observar y analizar estadísticamente como se comporta el método ante pequeños pero deliberados cambios en las condiciones operacionales <sup>36</sup>. Se seleccionan factores operacionales que sean susceptibles de variar durante la utilización del método <sup>36</sup> y el rango se determina en función de la incertidumbre asociada al factor <sup>39</sup>. En los análisis por HPLC, los factores a modificar pueden ser: porcentaje de los componentes de la fase móvil, pH de la fase móvil, temperatura de la columna, velocidad de flujo, tipo de columna, variación de la longitud de onda del detector, etc., siendo los parámetros a evaluar el factor de capacidad, la resolución, el número de platos teóricos, las áreas, el tailing, etc <sup>36</sup>.

La robustez debe determinarse en la etapa inicial de la validación, puesto que podría ser indicativa de la necesidad de efectuar cambios en las condiciones cromatográficas, evitando tener que repetir algún proceso y así disminuyendo la utilización de reactivos, equipos y tiempo <sup>36</sup>.

Las condiciones cromatográficas del método analítico se detallan a continuación y se obtienen de las especificaciones de la USP 31 para el análisis de diclofenaco sódico y potásico por HPLC, con algunas modificaciones tales como el flujo, que aumenta de 1,0 mL/min a 1,4 mL/min, con el objetivo de disminuir el tiempo de retención de la muestra.

Tipo de columna : Columna packing L7 (C8, end capped) 250 mm de largo, diámetro interno 4,6 mm, tamaño de partícula de 5 $\mu$ , marca Kromasil.

Fase móvil : Metanol: Solución amortiguadora fosfato de sodio 0,01 M pH 2,5  $\pm$ 0,005 (70:30)

Velocidad de flujo : 1,4 mL/minuto

Vol. de inyección : 20  $\mu$ L

Temperatura : 25° C

Longitud de onda : 254 nm

Tiempo retención :  $\approx$ 10 minutos.

Se seleccionó el diseño factorial completo de ocho experimentos ( $2^3$ ), es decir, se evaluó la influencia de tres factores combinados. La matriz y los factores utilizados se detallan a continuación:

**Tabla IV:** Matriz del diseño factorial completo de ocho ensayos ( $2^3$ ).

Ensayo	Factores		
	A	B	C
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

El signo + o – ubicado en las columnas de los factores A, B, C, corresponde a la desviación diseñada del factor respecto de su valor nominal.

Factor A = Composición de la fase móvil (factor combinado): Se seleccionó este factor para controlar el error proveniente del material volumétrico utilizado en la mezcla de los componentes de la fase móvil (metanol: buffer; 70:30) y el rango se determinó en base a la incertidumbre absoluta proveniente del error ( $\pm$ ) de las probetas utilizadas, el cual corresponde para la fracción de metanol medida en una probeta de 1000 mL, a  $\pm 5$  mL y para la fracción de buffer en una probeta de 500 mL, a  $\pm 2$  mL, resultando un rango de ( $\pm 0,01$ :  $\pm 0,004$  %), respectivamente <sup>39</sup>.

Factor B = Velocidad de flujo. El rango utilizado se determinó multiplicando la incertidumbre del flujo obtenido experimentalmente por 5 (constante definida por defecto) <sup>39</sup>:

Intervalo de confianza del flujo  $0,001\pm \cdot 5 = \pm 0,005$  mL

Factor C = Longitud de onda del detector. El rango utilizado se determinó multiplicando por 5 el error absoluto de la exactitud de la longitud de onda del detector determinado en la calificación de operación del equipo HPLC:

$\pm 0,3\text{nm} \cdot 5 = \pm 1,5$  nm

Los parámetros a evaluar son: factor de capacidad ( $k'$ ), asimetría del peak (tailing), platos teóricos y área.

Para la evaluación estadística de los resultados, se comienza con la determinación de la influencia de cada factor y luego se calcula su intervalo de confianza, el que debe incluir el cero <sup>36</sup>.

Factor A =  $(R2+R4+R6+R8)/4 - (R1+R3+R5+R7)/4$

Factor B =  $(R3+R4+R7+R8)/4 - (R1+R2+R5+R6)/4$

Factor C =  $(R5+R6+R7+R8)/4 - (R1+R2+R3+R4)/4$

Siendo "R" el valor del parámetro evaluado en cada ensayo.

Se realizan 4 lecturas en cada ensayo.

### 3.2.3. Especificidad

Se continúa con la especificidad, pues debe conocerse en que grado la respuesta del método es únicamente consecuencia del analito y no corresponde a interferencias<sup>36</sup>. Se relaciona con la capacidad para determinar y/o identificar inequívocamente el analito en la presencia de componentes cuya presencia sea previsible. Típicamente estos componentes incluyen impurezas, productos de degradación, componentes de la matriz, etc<sup>37</sup>. Se deben incluir pruebas que garanticen la identificación del analito, la evaluación de interferencia de impurezas, los productos de degradación, los residuos de solventes y los excipientes en la señal del analito<sup>36</sup>. Las pruebas realizadas corresponden a lecturas en las condiciones de trabajo del estándar, las muestras, los medios de disolución, los medios de disolución más una gota de detergente empleado en el lavado del material de vidrio utilizado, la lectura de la fase móvil y la lectura de estándar y las muestras en las condiciones de trabajo sometidas a estrés con calor y luz para establecer la resolución de la molécula en análisis respecto de sus productos de degradación<sup>36</sup>. El criterio de aceptación para este caso es una resolución  $\geq 1,5$  y se realizan cinco lecturas de cada muestra.

La resolución (R) corresponde a la razón de la distancia (tiempo) entre dos peaks y ancho medio de ellos, como lo indica la siguiente fórmula<sup>35</sup>:

$$R = 2 * \frac{t_{r2} - t_{r1}}{w_2 + w_1}$$

Donde  $t_r$  es el tiempo de retención y  $w$  el ancho de cada Peak.

### 3.2.4. Linealidad

La linealidad determina la aptitud para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido <sup>22</sup>. Para formas farmacéuticas de liberación modificada, como en este caso, liberación retardada, la linealidad se realizó entre 3 - 150 % <sup>40</sup> (el 100% equivale a la dosis unitaria del fármaco disuelto en el medio de disolución: 50 mg/ 900 mL), se utilizan 7 puntos incluyendo el 100%, y se realizan cinco lecturas de cada punto.

Para considerar el método lineal se debe evaluar a través de visualización de la curva resultante <sup>40</sup>. Además, desde la ecuación de la recta, el coeficiente de determinación no debe ser menor a 0,98; el coeficiente de variación de las cinco determinaciones de cada punto de la curva no debe ser mayor a 2% <sup>13, 36</sup>.

También se realizó un gráfico que involucra el factor de respuesta ajustado con el intercepto del eje de las ordenadas ( $FR_i = (\text{respuesta} - \text{intercepto})/\text{concentración}$ ) de cada punto en función de su concentración. En este gráfico se debe observar una función constante, es decir, la recta debe ser paralela al eje de las abscisas.

### 3.2.5. Precisión

La precisión refleja la medida en que los valores de una serie repetida de ensayos analíticos que se realizan a una muestra homogénea son semejantes entre si <sup>41</sup>.

Para la determinación de precisión se estudió la repetibilidad y la precisión intermedia:

**Precisión intermedia:** estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, pero en condiciones operativas distintas y en un mismo laboratorio. Se evalúan los efectos causados al variar una serie de factores, como el día del ensayo, el analista, el instrumento <sup>13, 36</sup>.

Para esta validación se consideró adecuado variar el día de cada ensayo. La estimación de la precisión intermedia se realiza con el cálculo del coeficiente de variación global de las respuestas obtenidas y no debe ser mayor a 2% <sup>13, 36</sup>.

**Repetibilidad:** estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas, en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto. Se expresa matemáticamente por coeficiente de variación y no debe ser mayor a 2% <sup>13, 36</sup>.

En ambas pruebas se realizaron seis determinaciones a tres niveles de concentración, incluidas en el rango de linealidad: bajo, medio (100%) y alto, con pesadas independientes cada uno <sup>40</sup>.

### 3.2.6. Exactitud

En la exactitud se expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental obtenido <sup>36</sup>. Se realizó empleando el método de adición patrón <sup>41</sup>. Se trabaja a tres niveles de concentración dentro del intervalo de linealidad, con pesada independiente (70% - 100% - 120%, por ejemplo), y se procede de la siguiente forma:

Se preparó una solución con las muestras en análisis (Voltarén<sup>®</sup> 50 y Cataflam<sup>®</sup> 50) de concentración desconocida, pero dentro del rango de linealidad.

Esta solución la llamaremos “blanco madre”. Se agrega a un matraz de aforo una cantidad de estándar que permita llegar a una concentración cercana al nivel correspondiente (70%, 100% o 120%); se agrega una alícuota de “blanco madre” al matraz, con el mismo grado de precisión en cada nivel de concentración (utilizando pipetas del mismo volumen e incertidumbre) y se lleva a aforo con el medio de disolución correspondiente. La solución resultante la llamaremos “blanco de trabajo”. Se prepara una solución de estándar para determinar la concentración de ambos “blancos” y así obtener el porcentaje de recuperación, el cual debe estar entre 95 y 105 %. Se realizan mínimo tres lecturas de cada “blanco” con coeficientes de variación no mayor a 2% <sup>13, 24, 40</sup>.

$$\frac{(\text{mg de estándar} + \text{concentración "blanco madre"} \cdot \text{mL alícuota}) \cdot 100\%}{\text{Concentración "blanco de trabajo"} \cdot \text{mL de aforo}} = 95-105\%$$

#### **4. DETERMINACION DE LOS PERFILES DE DISOLUCION.**

- 12 unidades posológicas (12 vasos) de diclofenaco sódico de un mismo lote de fabricación (361231) a pH 6,8 y 12 unidades posológicas de diclofenaco potásico de un mismo lote de fabricación (Z0093) a pH 1,2; 4,5 y 6,8 <sup>13</sup>.
- Los vasos de disolución contienen 900 mL de medio de disolución a 37±0,5°C <sup>24</sup>.
- Se utilizó el método B de la USP (31) para formas farmacéuticas de liberación retardada, con el objeto de evaluar la resistencia del recubrimiento entérico (diclofenaco sódico): El procedimiento se realiza en dos etapas: etapa ácida (HCl 0,1 N) y etapa buffer (buffer fosfato pH 6,8). Durante la etapa ácida se colocan 900 mL de medio HCl 0,1 N a 37±0,5°C, 1 unidad de dosificación para cada vaso y se pone en funcionamiento el equipo disolutor a 75 rpm durante 2

horas. Se retira una alícuota de cada vaso y se procede de inmediato con la etapa buffer. Luego se alcaliniza el pH las alícuotas y se realiza un análisis cuantitativo del principio activo, mediante HPLC.

- Etapa buffer: Se retira el medio ácido del vaso y luego el comprimido o la porción mayor si este no estuviese intacto. Seguidamente, se procede a lavar cada vaso, colocándolos nuevamente en el equipo disolutor, y se agrega a cada uno de ellos, 900 mL de la solución buffer fosfato pH 6,8, equilibrando el medio a una temperatura de  $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se transfiere la unidad de dosificación a su respectivo vaso y se pone en funcionamiento el equipo disolutor a 75 rpm durante 60 minutos, retirando alícuotas de 5 mL de cada vaso a intervalos regulares de tiempo (minutos 5 – 10 – 15 – 22 – 30 – 45 y 60).

Se establece que como mínimo deben obtenerse cuatro puntos y al menos uno después de disuelto el 85% <sup>13</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE DISOLUCIÓN

#### 1.1. Prueba de aptitud del sistema

##### 1.1.1. Calibración y Verificación del equipo de disolución <sup>7</sup>

a) Calibración mecánica: Todos los parámetros analizados para la calificación física y mecánica del equipo de disolución estuvieron siempre dentro del rango de aceptación establecidos por la USP 31. (Anexo)

b) Calibración química: Luego de seguir el procedimiento según la USP 31 para la calibración química con el aparato 2 de disolución usando comprimidos calibradores USP de prednisona (con desintegrante) lote N0E330 y ácido salicílico (sin desintegrante) lote K0F112, los resultados obtenidos son los siguientes:

**Tabla V:** Resultados y veredicto de la calibración química.

Comprimido USP	% Disuelto	Limite de aceptación %	Veredicto
Prednisona	43,87	30 - 57	Cumple
Ac. Salicílico	21,15	17 - 25	Cumple

Estos resultados permiten evaluar indirectamente factores que no se pueden verificar a través de la calibración mecánica, como la geometría y simetría de los vasos y del sistema de agitación, el sistema de muestreo, el grado de desgasificación del medio de disolución. De esta forma podremos predecir que el método de disolución funcionará correctamente en los posteriores ensayos.

### 1.1.2. Verificación del equipo preparador de medios de disolución.

Se realizaron mediciones de oxígeno disuelto en agua antes y después de desgasificarla. Los resultados obtenidos se detallan en la siguiente tabla:

**Tabla VI:** O<sub>2</sub> en agua determinado con ECDO6 Dissolved Oxygen Sensor expresado como porcentaje respecto al O<sub>2</sub> presente en el aire.

Porcentaje de oxígeno disuelto (37° C)	
Agua antes de desgasificar	Agua desgasificada
84,6	39,8
82,8	41,5
84,6	40,2
-	42,4
-	40,8

Los resultados muestran que el empleo del equipo preparador de medios permite disminuir en un 51% el O<sub>2</sub> presente en el agua. Los resultados son consistentes con las especificaciones del equipo, las que aseguran un 40% de disminución del O<sub>2</sub> disuelto.

Para la verificación del volumen de dispensación del preparador de medios, se pesaron seis dispensaciones de 750 mL de agua, se midió su temperatura, se determinó el volumen en función de su densidad y se calculó la desviación estándar relativa, la que debe ser menor a 2% (ver Tabla N° 7).

**Tabla VII:** Determinación de la desviación estándar relativa de la dispensación desde el preparador de medios de disolución.

Peso (g)	Temperatura (° C) - Densidad (g/mL)	Volumen real dispensado (mL)	DE%
741,5	34,0 - 0,99443	745,6	0,58
742,7	34,0 - 0,99443	746,9	0,42
743,3	31,0 - 0,99541	746,7	0,44
743,1	32,0 - 0,99509	746,8	0,43
743,4	30,0 - 0,99571	746,6	0,45
743,8	31,0 - 0,99541	747,4	0,34

### 1.1.3. Verificación del funcionamiento del equipo analítico, HPLC Shimadzu

En la tabla N° 8 se observan los resultados de la prueba de aptitud del equipo HPLC a través del análisis de repetibilidad en los parámetros constante de capacidad ( $k'$ ), área, platos teóricos y tailing, cuyo coeficiente de variación debe ser menor a 2%:

**Tabla VIII:** Repetibilidad de cuatro parámetros en HPLC de una muestra de diclofenaco sódico 0,0556mg/mL en medio buffer fosfato pH 6,8.

	$k'$	Area	Platos teóricos	Tailing
	4,144	910624	10916	1,013
	4,169	910301	10879	1,015
	4,153	911285	10952	1,011
	4,179	911232	10852	1,005
	4,143	911411	10940	1,013
Promedio	4,158	910971	10908	1,011
CV%	0,382	0,05292	0,38533	0,38

La exactitud de la velocidad de flujo se establece al determinar la desviación porcentual del valor obtenido experimentalmente respecto del valor nominal (1,0 mL/min). El detalle de los resultados se expresa en la siguiente tabla:

**Tabla IX:** Valores obtenidos para la determinación de exactitud de flujo y su análisis estadístico.

Volumen (mL)	Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Estadísticas del flujo	Valor
5	5,0083	0,9983	Promedio	0,9978
5	5,0108	0,9978	DE	0,001
5	5,0202	0,996	Error absoluto	0,0022
5	5,0085	0,9983	% Desviación	0,2221
5	5,0078	0,9984	Intervalo de confianza ( $\pm$ )	0,001

## 1.2. Validación del método analítico

### 1.2.1. Estabilidad

La estabilidad se determinó por el porcentaje de recuperación de soluciones de estándar de diclofenaco sódico y de las muestras en análisis después de 24 horas y 48 horas en condiciones de refrigeración y temperatura ambiente, ambas en matraces color ámbar. La concentración determinada a tiempo cero se considerara como el 100% y el criterio de aceptación es de 98-102%.

El resumen de los resultados para cada medio de disolución se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla X:** Porcentaje de recuperación para una prueba de estabilidad a 48 horas de soluciones de estándar de diclofenaco sódico y los productos en estudio.

		% de recuperación				
		Tiempo cero	24 horas T°ambiente	24 horas refrigerado	48 horas T°ambiente	48 horas refrigerado
pH 1,2	Estándar	100	99,01	98,85	98,2	98,54
	Cataflam®	100	99,27	99,02	98,46	98,22
pH 4,5	Estándar	100	99,37	99,21	98,75	98,12
	Cataflam®	100	100,61	101,13	98,74	98,18
pH 6,8	Estándar	100	99,84	99,61	99,96	99,14
	Voltaren®	100	100,08	99,8	99,54	99,1
	Cataflam®	100	99,43	99,57	98,41	98,01

Los resultados, en todos los medios de disolución, cumplen con los criterios de aceptación, es decir, las muestras durante el tiempo que son manipuladas y analizadas (en ningún caso excede las 24 horas y las soluciones con estándar se preparan el mismo día de su lectura) se mantienen estables.

### 1.2.3. Robustez

Por medio de la matriz factorial completa ( $2^3$ ) observamos si el método analítico es robusto dentro de los rangos establecidos en esta prueba, basados en la incertidumbre de los factores seleccionados.

A continuación se observan los resultados de la influencia de cada factor y su intervalo de confianza respectivo ( $n-2$ ,  $\alpha=0,05$ ).

Robustez en medio de disolución Buffer pH 6,8 desde las tablas N° 11 a la 14:

**Tabla XI:** Influencia de los factores sobre el área y su intervalo de confianza.

Análisis del parámetro AREA		IC factor $\pm t \cdot S_{exp} / \sqrt{n}$
Influencia factor A	4931,375	-57921; +67783
Influencia factor B	6295,875	-56556; +69148
Influencia factor C	6295,875	-233796; -108091
DE	91485,992	

**Tabla XII:** Influencia sobre el tailing y su intervalo de confianza.

Análisis del parámetro Tailing		IC factor $\pm t \cdot S_{exp} / \sqrt{n}$
Influencia factor A	-0,00037	-0,00219 +0,00144
Influencia factor B	-0,00125	-0,00307 +0,00057
Influencia factor C	-0,00125	-0,00307 +0,00057
DE	0,00265	

**Tabla XIII:** Influencia de los factores sobre  $k'$  y su intervalo de confianza

Análisis del parámetro $k'$		IC factor $\pm t \cdot S_{exp}/\sqrt{n}$
Influencia factor A	0,00594	-0,00042; 0,01229
Influencia factor B	0,00621	-0,00014; 0,01257
Influencia factor C	-0,00019	-0,00654; 0,00617
DE	0,00925	

**Tabla XIV:** Influencia sobre los platos teóricos y su intervalo de confianza.

Análisis parámetro Platos teóricos		IC factor $\pm t \cdot S_{exp}/\sqrt{n}$
Influencia factor A	-11,798	-47,550; 23,954
Influencia factor B	31,133	-4,6190; 66,885
Influencia factor C	-14,136	-49,888; 21,616
DE	52,040	

Robustez en medio de disolución Buffer pH 4,5 desde las tablas N° 15 a la 18:

**Tabla XV:** Influencia de los factores sobre el área y su intervalo de confianza.

Análisis del parámetro AREA		IC factor $\pm t \cdot S_{exp}/\sqrt{n}$
Influencia factor A	8522	-2205 19251
Influencia factor B	-6181	-16909 4547
Influencia factor C	21295	10567 32023
DE	15615	

**Tabla XVI:** Influencia sobre el tailing y su intervalo de confianza.

Análisis del parámetro Tailing		IC factor $\pm t \cdot S_{exp}/\sqrt{n}$
Influencia factor A	0,00188	-0,00080; 0,00455
Influencia factor B	-0,00250	-0,00518; 0,00018
Influencia factor C	-0,00087	-0,00355 0,00180
DE	0,00317	

**Tabla N° XVII:** Influencia sobre  $k'$  y su intervalo de confianza.

Análisis del parámetro $k'$		IC factor $\pm t \cdot S_{exp}/\sqrt{n}$
Influencia factor A	0,00694	-0,00945 0,02332
Influencia factor B	0,01231	-0,00407; 0,02870
Influencia factor C	-0,00019	-0,01657 0,01620
DE	0,02385	

**Tabla XVIII:** Influencia sobre los platos teóricos y su intervalo de confianza.

Análisis parámetro Platos teóricos		IC factor $\pm t \cdot S_{exp}/\sqrt{n}$
Influencia factor A	-30,754	-111,21 49,703
Influencia factor B	76,014	-4,4429 156,47
Influencia factor C	30,901	-49,556 111,36
DE	117,11	

Robustez en medio de disolución pH 1,2 desde las tablas N° 19 a la 22:

**Tabla XIX:** Influencia de los factores sobre el área y su intervalo de confianza.

Análisis del parámetro AREA		IC factor $\pm t \cdot S_{exp}/\sqrt{n}$
Influencia factor A	91	-1119 1301
Influencia factor B	146	-1064 1356
Influencia factor C	-3544	-4753 -2334
DE	1806	

**Tabla XX:** Influencia sobre el tailing y su intervalo de confianza.

Análisis del parámetro Tailing		IC factor $\pm t \cdot S_{exp}/\sqrt{n}$
Influencia factor A	0,00319	-0,00087 0,00724
Influencia factor B	0,00381	-0,00024 0,00787
Influencia factor C	-0,00031	-0,00437 0,00374
DE	0,00605	

**Tabla XXI:** Influencia sobre  $k'$  y su intervalo de confianza.

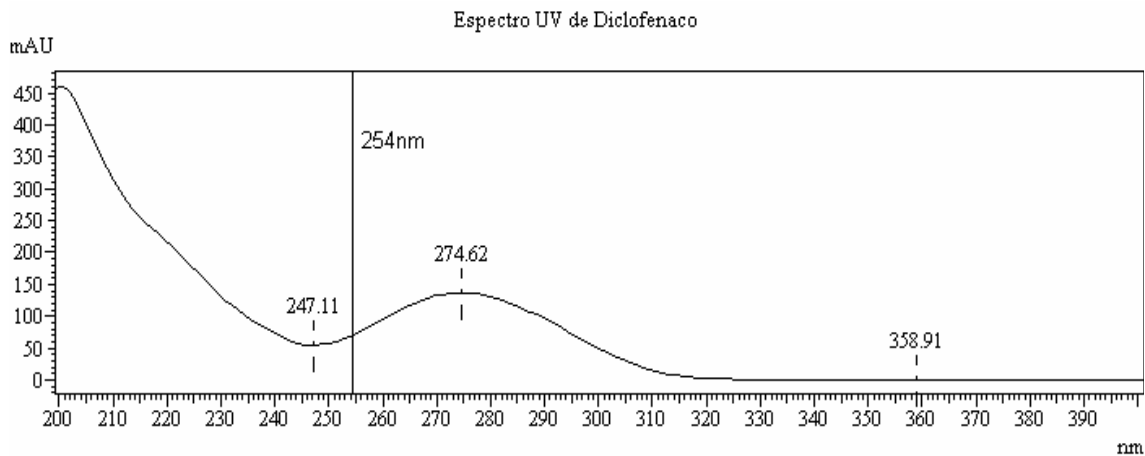
Análisis del parámetro $k'$		IC factor $\pm t \cdot S_{exp}/\sqrt{n}$
Influencia factor A	0,00338	-0,00817 0,01492
Influencia factor B	0,01038	-0,00117 0,02192
Influencia factor C	0,00012	-0,01142 0,01167
DE	0,01723	

**Tabla XXII:** Influencia sobre los platos teóricos y su intervalo de confianza.

Análisis parámetro Platos teóricos		IC factor $\pm t \cdot S_{exp}/\sqrt{n}$
Influencia factor A	-27,856	-156,07 100,36
Influencia factor B	-13,42020	-13,420 243,005
Influencia factor C	-112,24132	-112,24 144,18
DE	191,407021	

De los cuatro parámetros analizados sólo el área se vio influenciada por el factor longitud de onda, es decir, el intervalo de confianza no incluye el cero, situación observada en los tres pH. Al observar en el espectro de absorción UV de diclofenaco (Figura N° 2), el punto en la curva donde se localiza la longitud de onda empleada, 254 nm, está en una posición cercana al punto de inflexión, donde podemos predecir por la pendiente de esta zona, que la absorbancia

variará significativamente entre valores de longitud de onda cercanos a los 254 nm. Sin embargo, la exactitud de longitud de onda del detector demostrada en la etapa de verificación del equipo HPLC asegura resultados confiables en este aspecto.

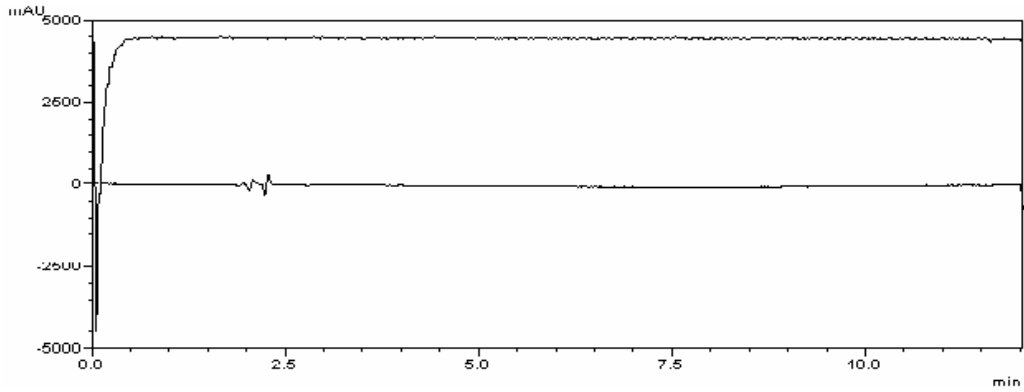


**Figura N° 2:** Barrido del espectro de absorción entre 200nm y 400nm de longitud de onda, para el estándar de diclofenaco sódico empleado en los análisis, por medio del detector DAD acoplado al equipo HPLC.

Los demás factores no afectan el resultado de los parámetros analizados. Se observa en cada uno de ellos que el intervalo de confianza incluye el cero.

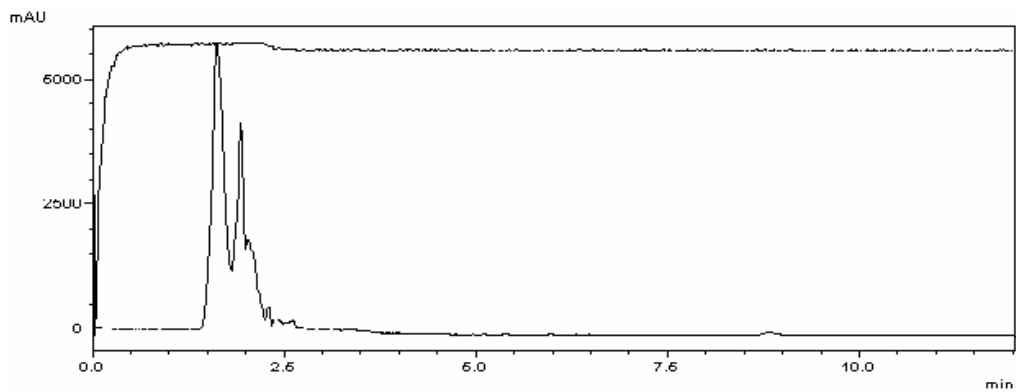
#### 1.2.4. Especificidad

La especificidad o selectividad del método se aprecia al observar los cromatogramas de los ensayos seleccionados y se presentan desde las figuras N° 3 a la N° 18.

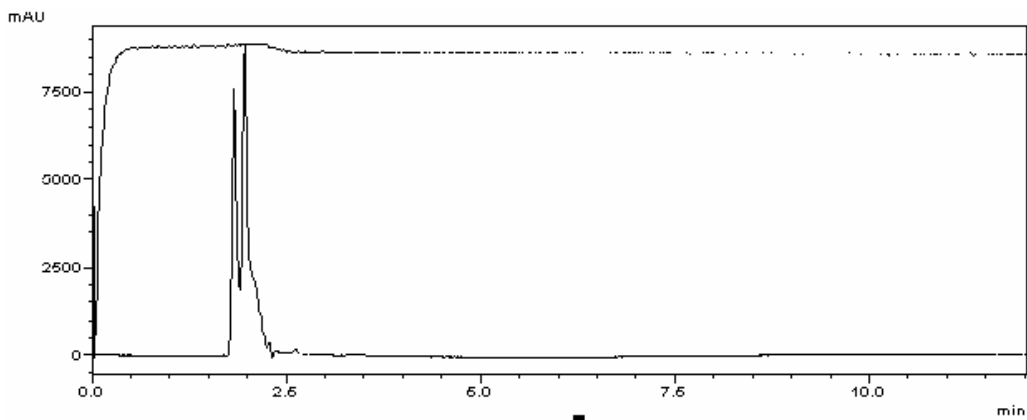


**Figura N° 3:** Cromatograma para la inyección de fase móvil.

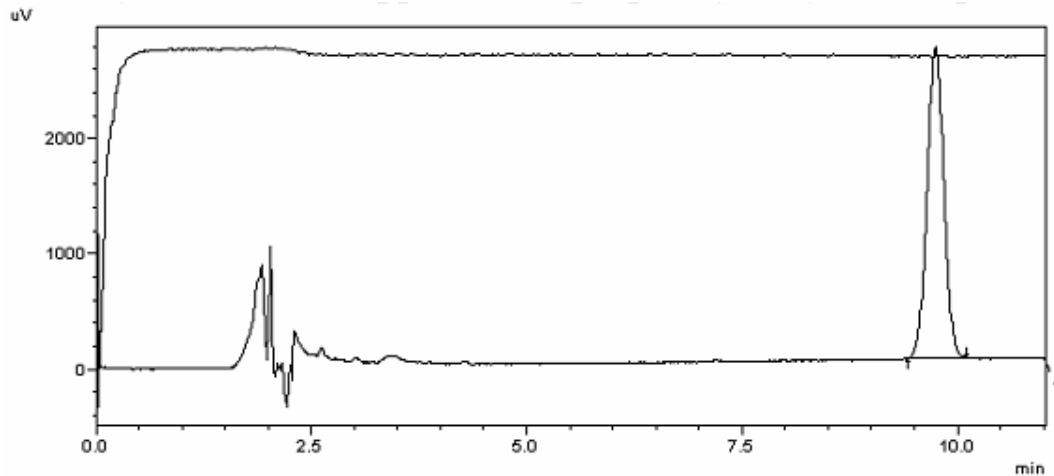
### Especificidad en medio de disolución pH 1,2:



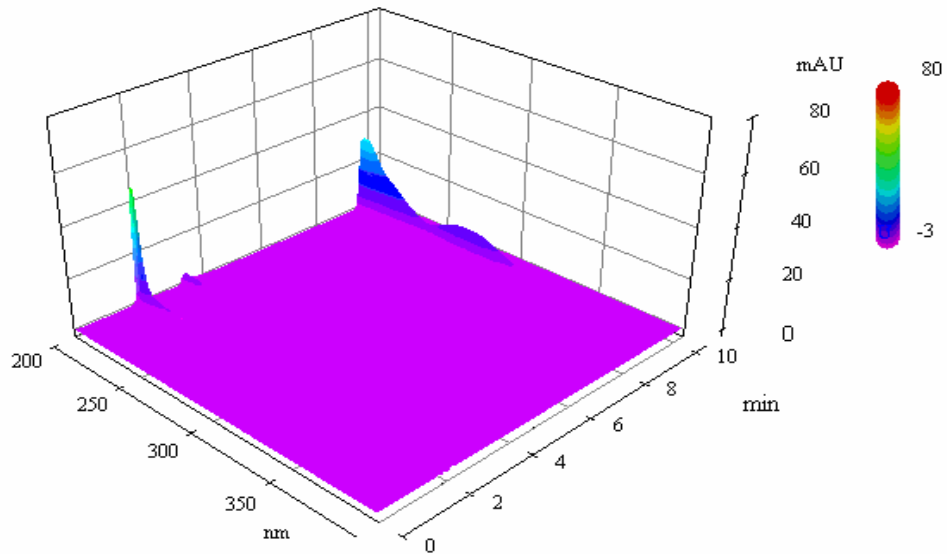
**Figura N° 4:** Cromatograma para la inyección de medio de disolución pH 1,2.



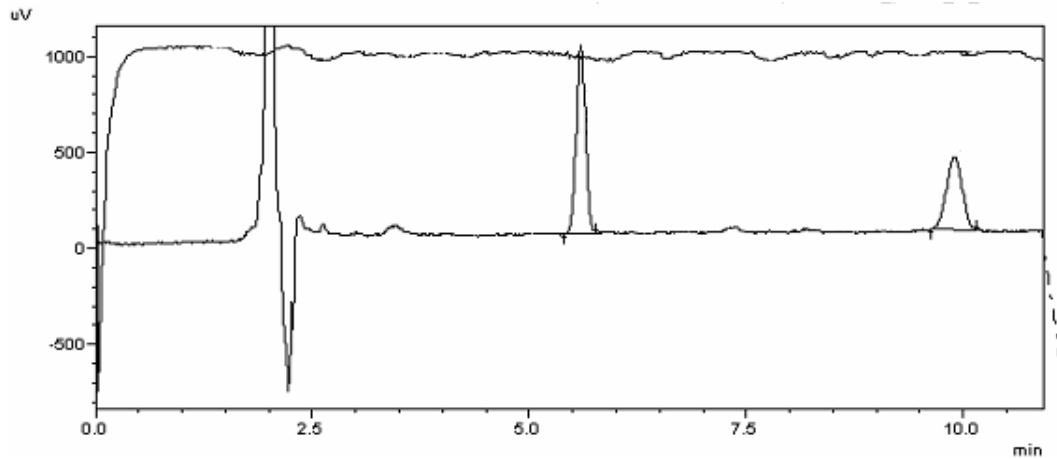
**Figura N° 5:** Cromatograma para medio de disolución pH 1,2 más una gota de detergente empleado en el lavado del material de vidrio utilizado.



**Figura N° 6:** Cromatograma para la inyección de estándar de diclofenaco sódico en el solvente resultante para la prueba a pH 1,2.

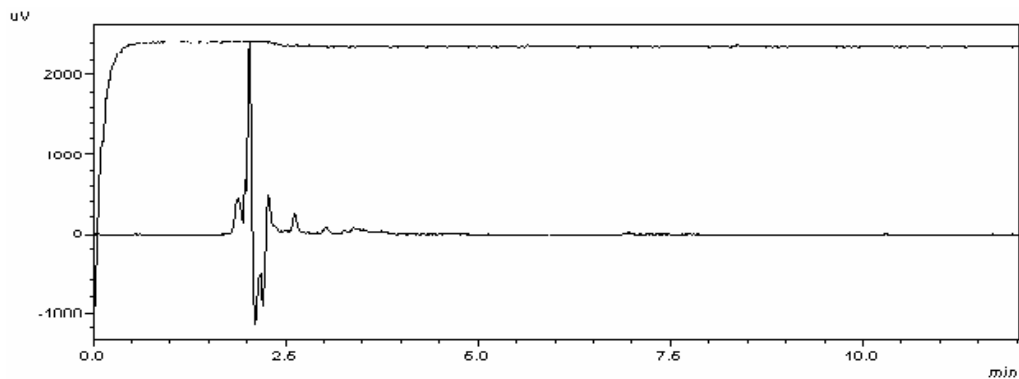


**Figura N° 7:** Cromatograma 3D obtenido para la cuantificación de Cataflam® 50 en el solvente resultante para la prueba a pH 1,2.

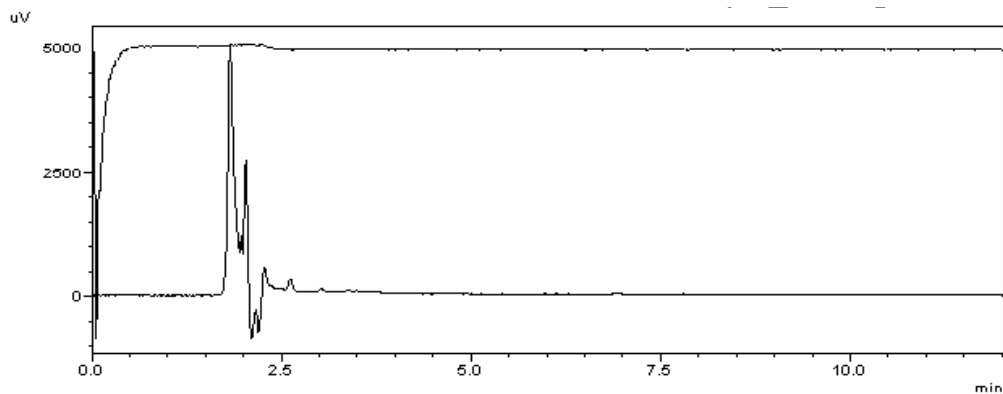


**Figura N° 8:** Cromatograma resultante de la exposición a pH 1,2 y luz solar de Cataflam<sup>®</sup> 50 durante cinco días. La resolución del peak del analito (tiempo de retención de 9,9 minutos) es de 15,295.

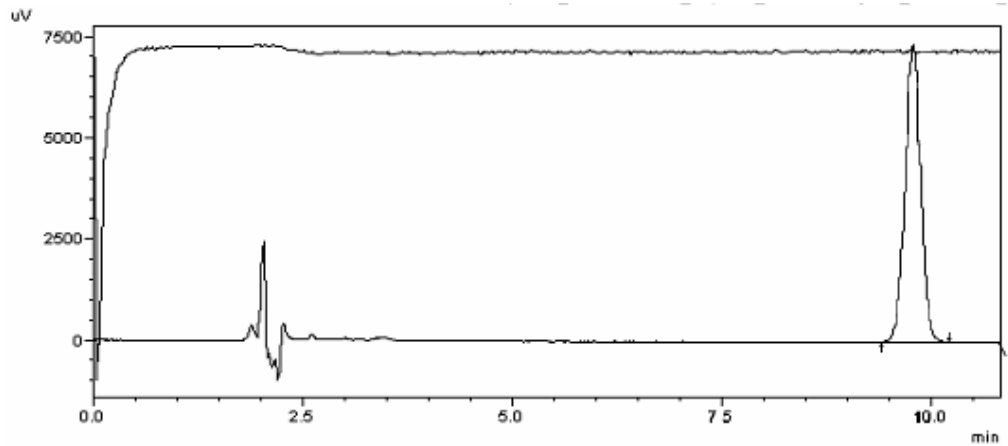
**Especificidad en medio de disolución pH 4,5:**



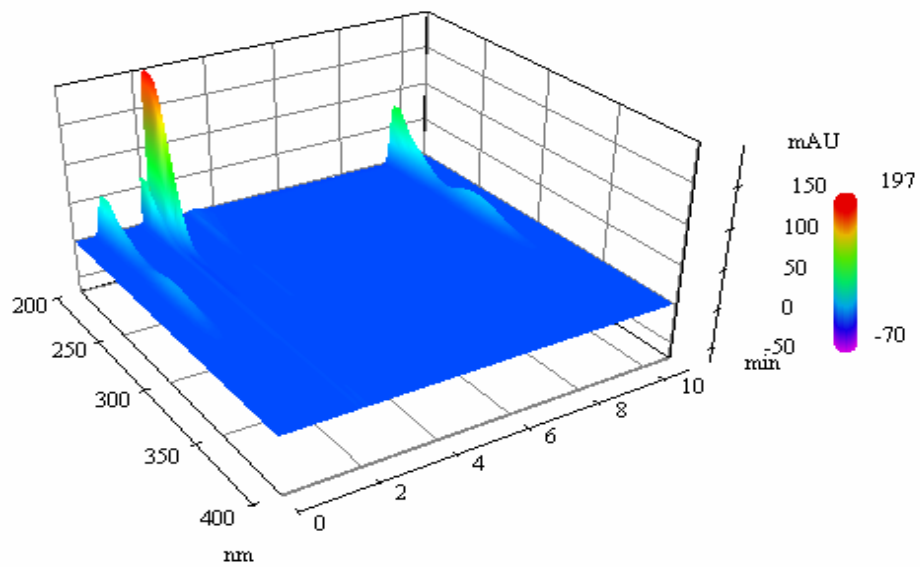
**Figura N° 9:** Cromatograma para la inyección de medio de disolución pH 4,5.



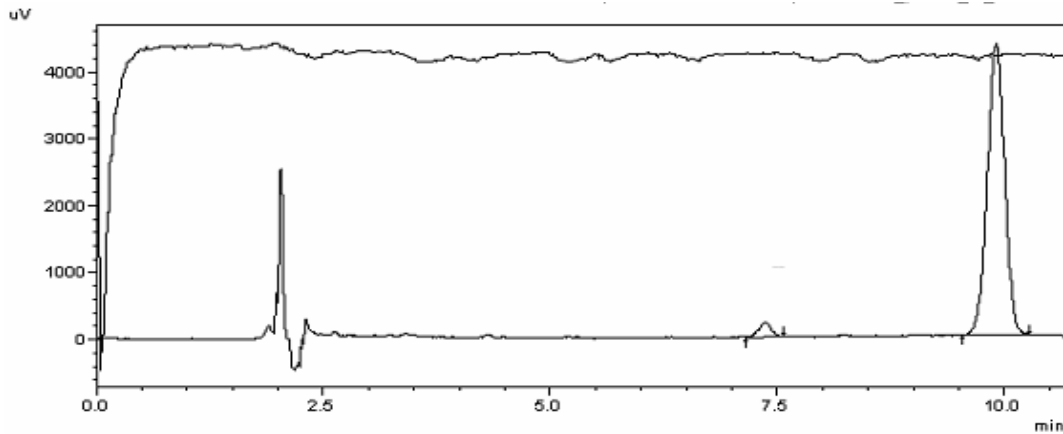
**Figura N° 10:** Cromatograma para medio de disolución pH 4,5 más una gota de detergente empleado en el lavado del material de vidrio utilizado.



**Figura N° 11:** Cromatograma para estándar de diclofenaco sódico al 100% de la concentración de trabajo, en medio de disolución pH 4,5.

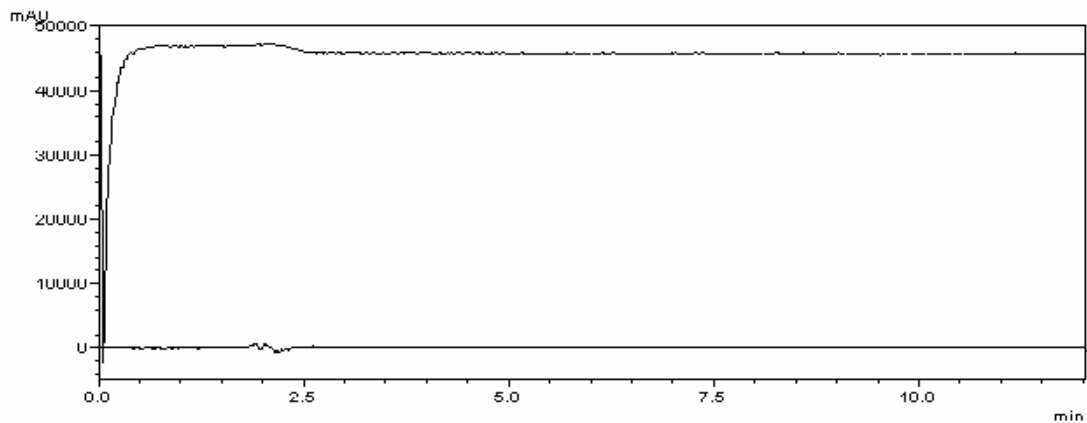


**Figura N° 12:** Cromatograma 3D obtenido para la cuantificación de Cataflam® 50 en medio de disolución pH 4,5.

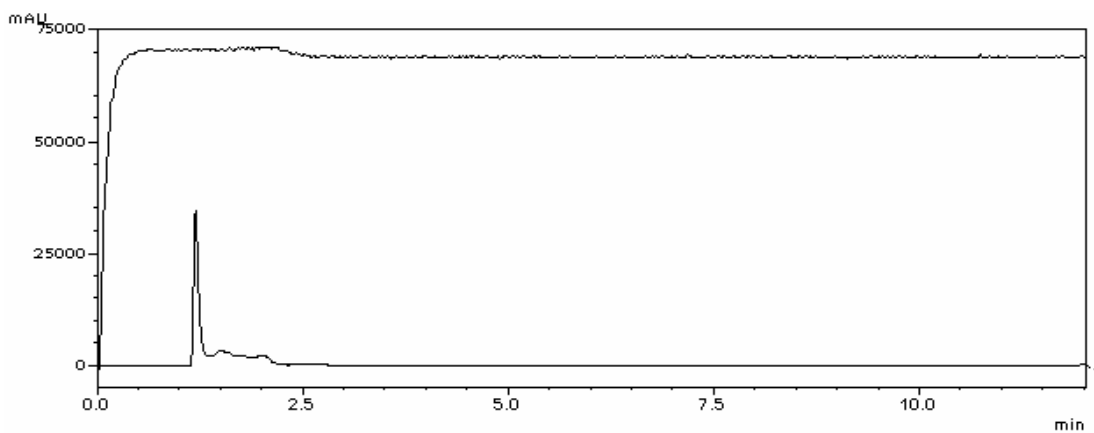


**Figura N° 13:** Cromatograma resultante de la exposición a luz solar de Cataflam® 50 en medio de disolución pH 4,5 durante cinco días. La resolución del peak principal (analito) es de 7,691.

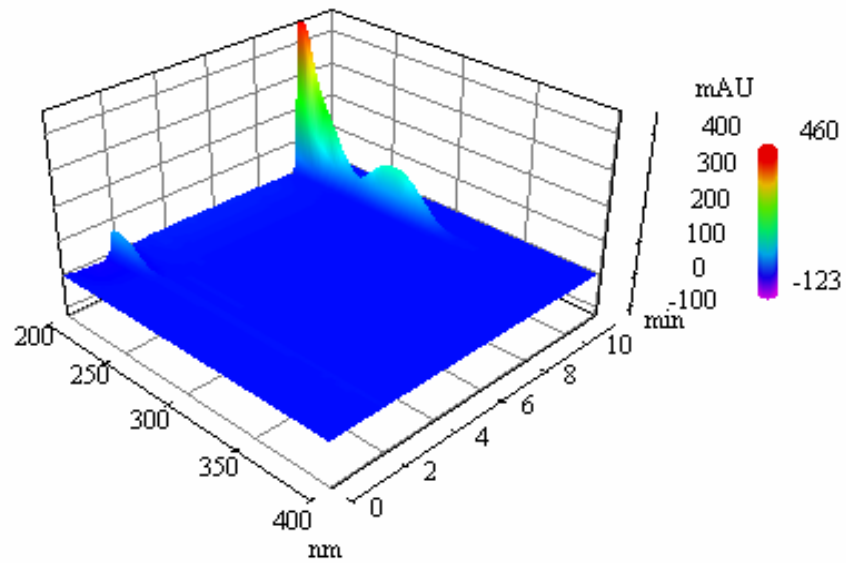
#### Especificidad en medio de disolución pH 6,8:



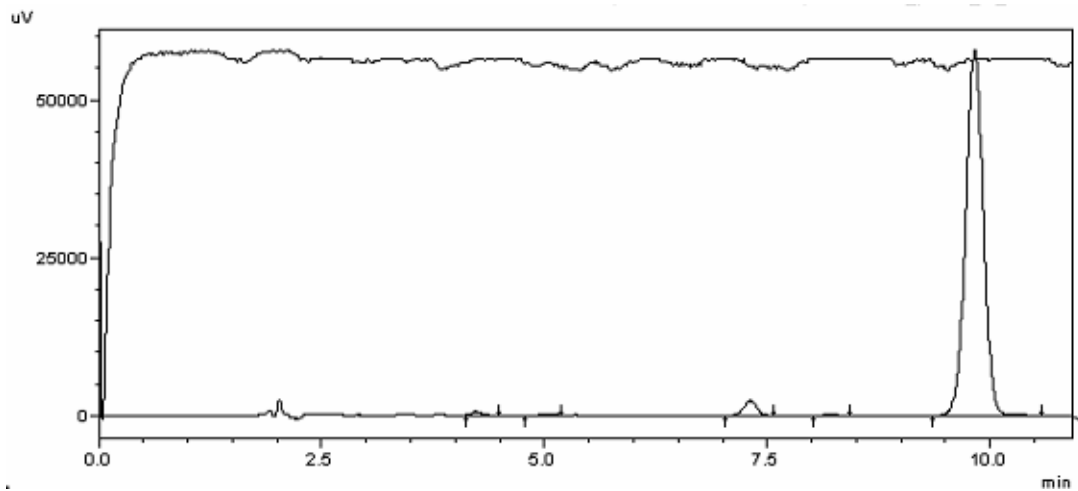
**Figura N° 14:** Cromatograma para la inyección de medio de disolución pH 6,8.



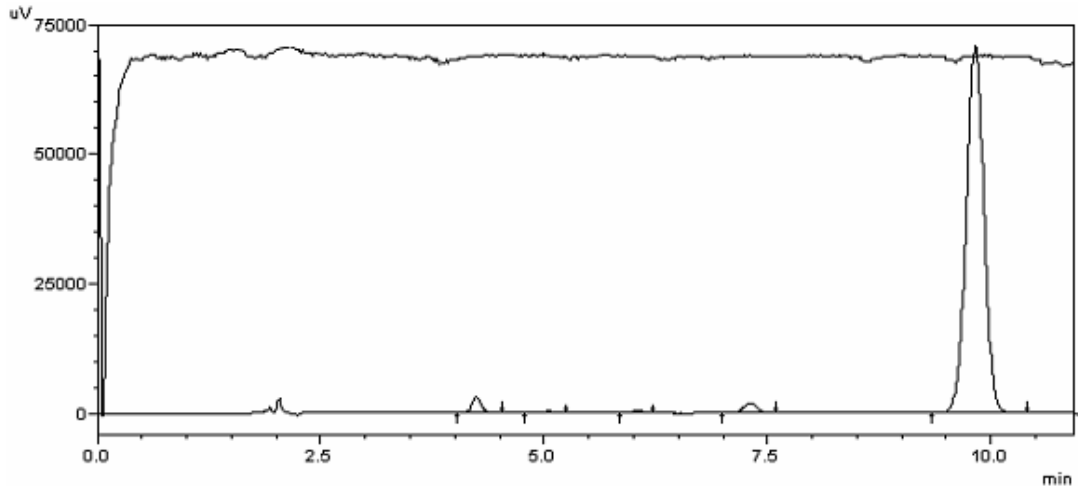
**Figura N° 15:** Cromatograma para medio de disolución pH 6,8 más una gota de detergente empleado en el lavado del material de vidrio utilizado.



**Figura N° 16:** Cromatograma 3D obtenido para la cuantificación de Cataflam® 50 en medio de disolución pH 6,8.



**Figura N° 17:** Cromatograma resultante de la exposición a luz solar de Cataflam® 50 en medio de disolución pH 4,5 durante cinco días. La resolución del peak principal (analito) es de 4,904.



**Figura N° 18:** Cromatograma resultante de la exposición a luz solar de Voltarén® 50 en medio de disolución pH 6,8 durante cinco días. La resolución del peak principal (analito) es de 7,655.

Los cromatogramas de los blancos de cada medio de disolución (figuras N° 4, 9 y 14), de la fase móvil (Figura N° 3), de medios de disolución más detergente (Figuras N° 5, 10 y 15) no presentan señal (peak), por lo tanto, estos componentes no proporcionan interferencias al sistema;

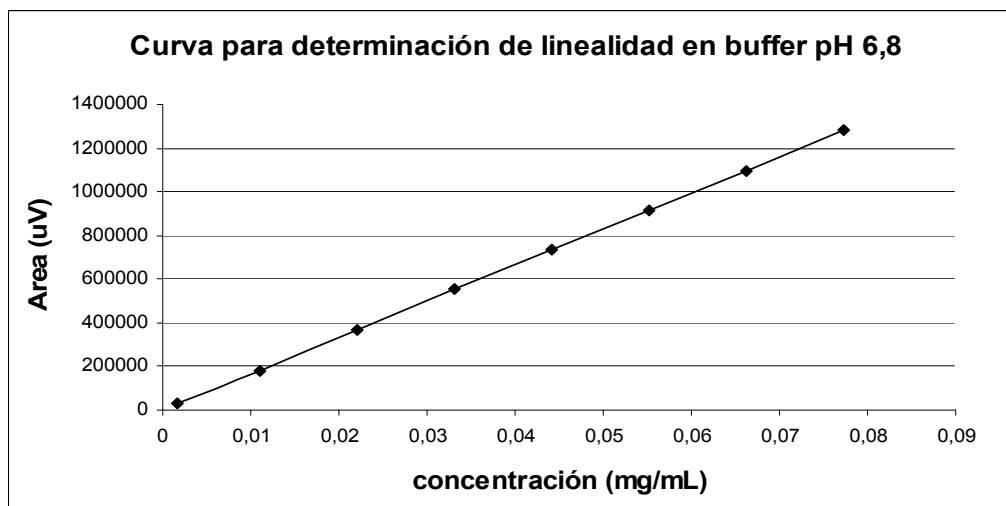
Los resultados del análisis de estándar de diclofenaco sódico, Voltarén® a pH 6,8 y Cataflam® a pH 6,8 y pH 4,5, cada uno presentan un solo peak, correspondiente al analito (Figuras N° 12 y 16). Para estas muestras se utilizó un cromatograma en 3D, en cuyo sistema de coordenadas espacial, el eje z corresponde al rango del barrido espectral que realiza el detector con arreglo de diodos, desde 200 nm a 400 nm. Este cromatograma nos permite analizar la especificidad del método al observar la similitud del espectro de absorción de las muestras en estudio en comparación al espectro del estándar.

Las muestras sometidas a estrés físico (calor, luz) y químico (pH 1,2) muestran nuevos peaks (Figuras N° 8, 13, 17 y 18), correspondientes

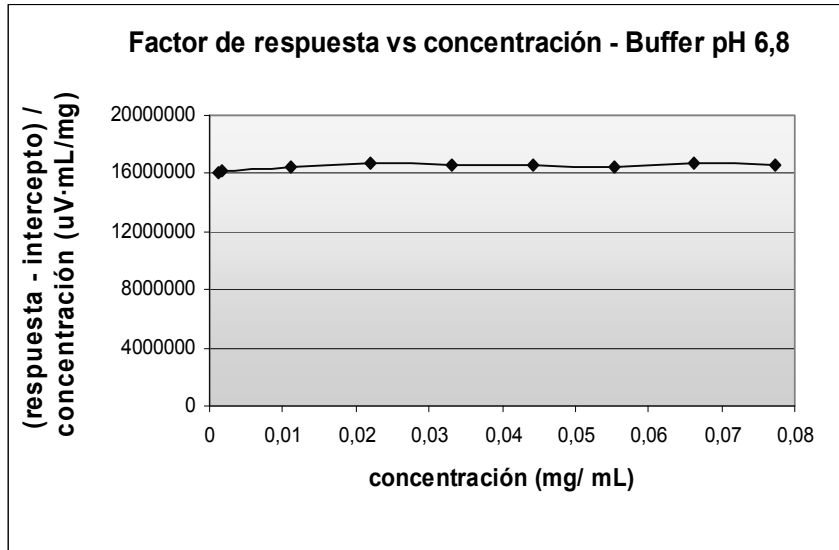
probablemente a productos de degradación. Las resoluciones calculadas entre el peak del analito y el más cercano a éste, siempre fueron mucho mayores a 1,5, por lo tanto el método es selectivo.

### 1.2.5. Linealidad

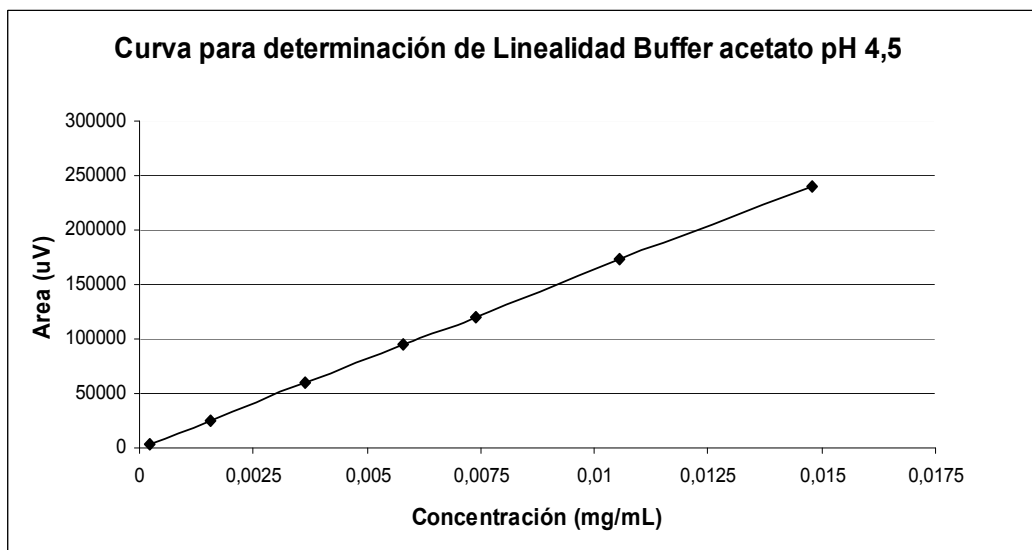
Las curvas correspondientes a la determinación de linealidad del método para cada medio de disolución y su análisis estadístico se muestran a continuación:



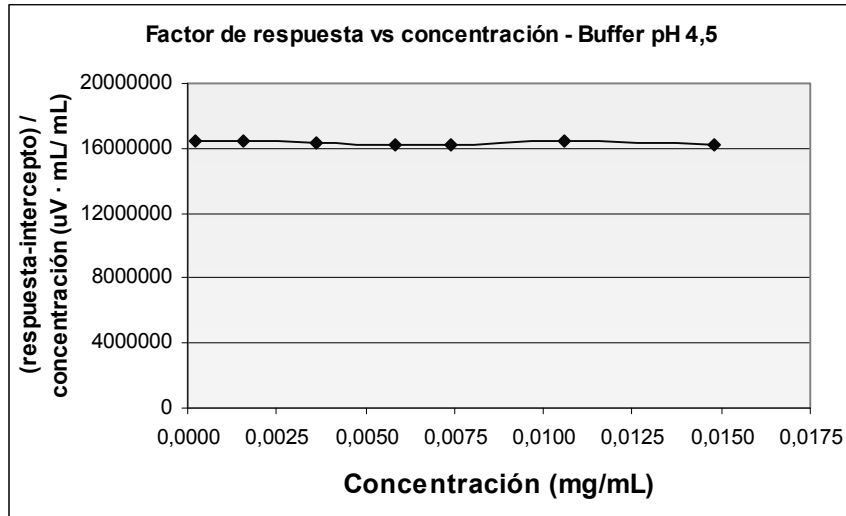
**Figura N° 19:** Curva para determinar la linealidad del método analítico de diclofenaco en buffer pH 6,8.



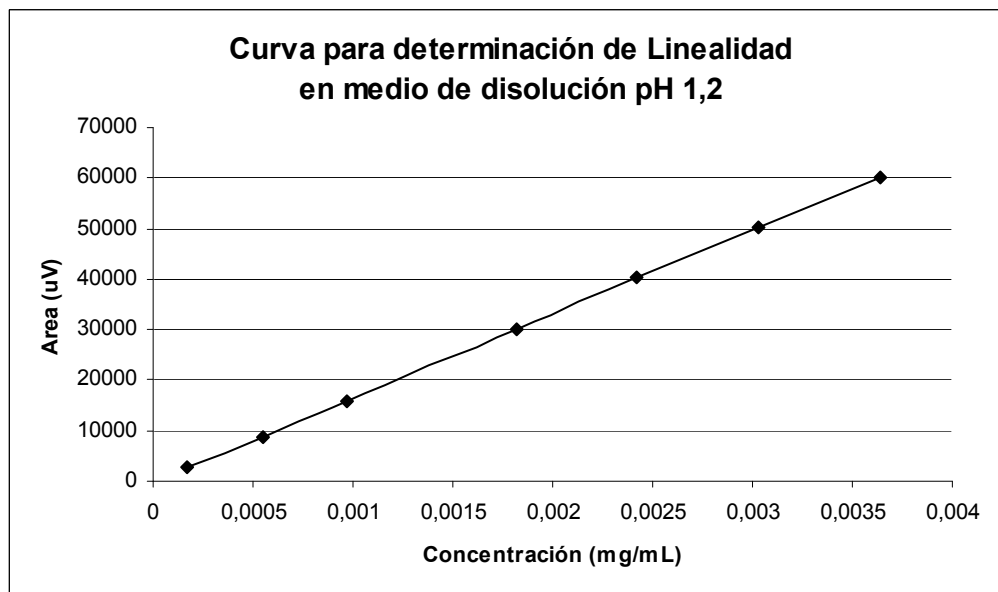
**Figura N° 20:** Análisis de la influencia del intercepto en el eje de las ordenadas y el factor de respuesta en la linealidad de diclofenaco en buffer pH 6,8.



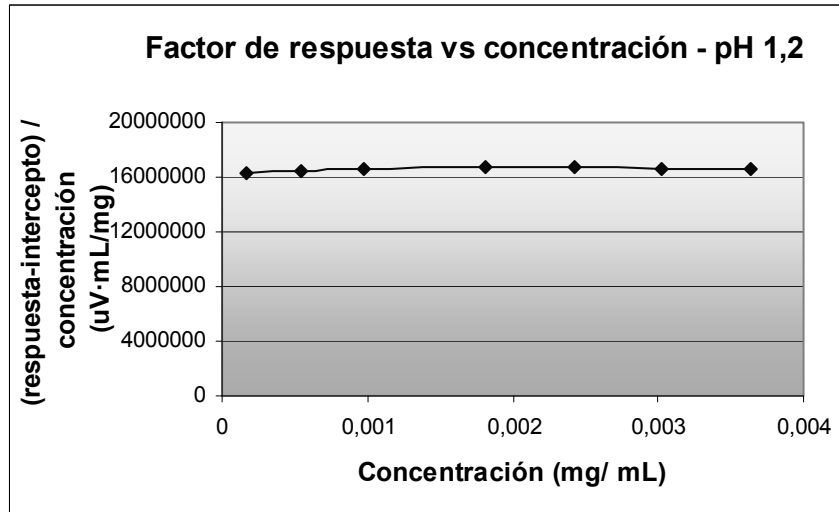
**Figura N° 21:** Curva para determinar la linealidad del método analítico de diclofenaco en buffer pH 4,5.



**Figura N° 22:** Análisis de la influencia del intercepto en el eje de las ordenadas y el factor de respuesta en la linealidad de diclofenaco en buffer pH 4,5.



**Figura N° 23:** Curva para determinar la linealidad del método analítico de diclofenaco en solución pH 1,2.



**Figura N° 24:** Análisis de la influencia del intercepto en el eje de las ordenadas y el factor de respuesta en la linealidad de diclofenaco en solución pH 1,2.

**Tabla XXIII:** Parámetros estadísticos para el cálculo de linealidad de una solución de estándar de diclofenaco sódico en siete niveles de concentración en tres medios de disolución.

Parámetros Estadísticos	pH 6,8	pH 4,5	pH 1,2	Criterio
<b>Pendiente</b>	16563465	16293443	16642382	-
<b>Intercepto</b>	602,3599	-5,4842	-151,513	-
<b>Coefficiente de determinación, <math>r^2</math></b>	0,9999	0,9999	0,9999	$\geq 0,98$
<b>CV del FR</b>	0,3073	0,4798	0,6108	$\leq 2$
<b>Estándar control (CV)</b>	0,5688	0,928	0,433	$\leq 2$

Todos los valores cumplen con los criterios de aceptación, por lo tanto se demuestra que el método es lineal dentro del rango de concentraciones de trabajo en los tres medios de disolución. También se obtienen funciones constantes (recta

paralela al eje de las abscisas) al evaluar el factor de respuesta ajustado con el intercepto del eje de las ordenadas en función de la concentración.

### 1.2.6. Precisión

En cada medio de disolución se evaluó la precisión en tres niveles de concentración, con pesadas independientes, se realizaron seis lecturas de cada uno y los niveles de concentración son cercanos al 40%, 100% y 120% del rango de linealidad de cada medio de disolución.

Las siguientes tres tablas corresponden a los resultados de repetibilidad y precisión intermedia para la validación a pH 6,8.

**Tabla XXIV:** Repetibilidad en buffer pH 6,8 en tres niveles de concentración.

Concentración (mg/mL)	0,0312		0,0569		0,0748	
	Área(uV)	FR	Área(uV)	FR	Área(uV)	FR
Lectura 1	516454	16531818	941829	16558175	1235459	16508004
Lectura 2	516882	16545518	936303	16461023	1235306	16505959
Lectura 3	516789	16542541	932693	16397556	1234114	16490032
Lectura 4	516277	16526152	929324	16338326	1234332	16492945
Lectura 5	516129	16521414	927989	16314856	1234517	16495417
Lectura 6	515801	16510915	937489	16481874	1229210	16424506
Promedio	516388	16529726	934271	16425302	1233823	16486144
CV %		<b>0,0791</b>		<b>0,562</b>		<b>0,188</b>

**Tabla XXV:** Precisión intermedia a pH 6,8. Segundo día.

Concentración (mg/mL)	0,03152		0,0556		0,0721	
	Área(uV)	FR	Área(uV)	FR	Área (uV)	FR
Lectura 1	518390	16446383	902775	16236960	1182332	16393955
Lectura 2	517620	16421954	903195	16244514	1178903	16346409
Lectura 3	517463	16416973	903306	16246511	1151136	15961398
Lectura 4	517646	16422779	903086	16242554	1143298	15852718
Lectura 5	517833	16428711	901748	16218489	1133432	15715918
Lectura 6	517433	16416021	898212	16154892	1129756	15664947
Promedio	517730	16425470	901909	16221392	1147305	15908278
CV %		<b>0,0695</b>		<b>0,240</b>		<b>0,0695</b>

**Tabla XXVI:** Precisión intermedia en buffer pH 6,8. Tercer día, tres niveles de concentración.

Concentración (mg/mL)	0,0303		0,0554		0,0732	
	Area(uV)	FR	Area(uV)	FR	Area(uV)	FR
Lectura 1	497930	16422493	910677	16450090	1213992	16575532
Lectura 2	498770	16450197	911416	16463439	1211379	16539855
Lectura 3	499114	16461543	911683	16468262	1209602	16515593
Lectura 4	499013	16458212	912291	16479245	1208982	16507127
Lectura 5	499164	16463192	912317	16479715	1208522	16500847
Lectura 6	499297	16467579	911898	16472146	1207062	16480912
Promedio	498881	16453869	911713	16468816	1209923	16519978
CV %		<b>0,102</b>		<b>0,0675</b>		<b>0,102</b>

**Tabla XXVII:** Repetibilidad en buffer pH 4,5 en tres niveles de concentración.

Concentración mg/mL	0,00257		0,00648		0,0119	
	Area (uV)	FR	Area (uV)	FR	Area (uV)	FR
Lectura 1	35895	13966926	90248	13927160	161568	13603435
Lectura 2	35846	13947860	89620	13830247	161937	13634504
Lectura 3	35775	13920233	89128	13754321	161460	13594342
Lectura 4	34828	13551751	89570	13822531	161418	13590806
Lectura 5	35613	13857198	89058	13743519	161757	13619348
Lectura 6	35787	13924903	89478	13808333	161136	13567062
Promedio	35624	13861479	89517	13814352	161546	13601583
CV %		<b>1,23</b>		<b>0,477</b>		<b>0,173</b>

**Tabla XXVIII:** Precisión intermedia en buffer pH 4,5. Segundo día.

Concentración mg/mL	0,00256		0,00633		0,00116	
	Area (uV)	FR	Area (uV)	FR	Area (uV)	FR
Lectura 1	34517	13483203	86754	13705213	163848	14076289
Lectura 2	34772	13582812	86444	13656240	164256	14111340
Lectura 3	34692	13551562	85994	13585150	163863	14077577
Lectura 4	34526	13486718	86340	13639810	163662	14060309
Lectura 5	34564	13501562	86194	13616746	163158	14017010
Lectura 6	34533	13489453	86092	13600632	163350	14033505
Promedio	34600	13515885	86303	13633965	163689,5	14062672
CV %		<b>0,306</b>		<b>0,318</b>		<b>0,316</b>

**Tabla XXIX:** Precisión intermedia en buffer pH 4,5. Tercer día, tres niveles de concentración.

Concentración mg/mL	0,00254		0,00586		0,0104	
	Area (uV)	FR	Area (uV)	FR	Area (uV)	FR
Lectura 1	35296	13923471	80020	13655290	141126	13517816
Lectura 2	35095	13844181	79812	13619795	139737	13384770
Lectura 3	35077	13837081	79564	13577474	140955	13501437
Lectura 4	34927	13777909	79038	13487713	138891	13303736
Lectura 5	34889	13762919	78928	13468942	138207	13238218
Lectura 6	35007	13809467	79832	13623208	138639	13279598
Promedio	34999	13806312	79532,33	13555427	139592,5	13370929
CV %		<b>0,258</b>		<b>0,568</b>		<b>0,880</b>

**Tabla XXX:** Repetibilidad en solución pH 1,2 en tres niveles de concentración.

Concentración mg/mL	0,001142		0,00227		0,00343	
	Área (uV)	FR	Area (uV)	FR	Area(uV)	FR
Lectura 1	19091	16717163	37844	16686067	58472	16802299
Lectura 2	18860	16514886	38009	16758818	57659	16568678
Lectura 3	19022	16656743	37991	16750882	57901	16638218
Lectura 4	18968	16609457	37911	16715608	58169	16715230
Lectura 5	18948	16591944	38057	16779982	58076	16688506
Lectura 6	18985	16624343	37916	16717813	58214	16728161
Promedio	18978	16617838	37954	16734442	58020	16672462
CV %		<b>0,406</b>		<b>0,188</b>		<b>0,439</b>

**Tabla XXXI:** Precisión intermedia en solución pH 1,2. Segundo día.

Concentración mg/mL	0,00110		0,00220		0,00331	
	Area(uV)	FR	Area(uV)	FR	Area (uV)	FR
Lectura 1	18296	166025408	36726	166633394	55199	166966122
Lectura 2	18291	165980036	36912	167477314	55316	167320024
Lectura 3	18403	166996370	36820	167059891	55268	167174834
Lectura 4	18410	167059891	37044	168076225	55328	167356322
Lectura 5	18246	165571688	36860	167241379	55228	167053842
Lectura 6	18318	166225045	36922	167522686	55378	167507562
Promedio	18327	166309740	36872	167297641	55268	167174229
CV %		<b>0,358</b>		<b>0,291</b>		<b>0,121</b>

**Tabla N° XXXII:** Precisión intermedia en solución pH 1,2. Tercer día, tres niveles de concentración.

Concentración mg/mL	0,00159		0,00264		0,00369	
	Área (uV)	FR	Área(uV)	FR	Area(uV)	FR
Lectura 1	26814	16864151	43958	16619282	61571	16690431
Lectura 2	26342	16567296	44022	16643478	61799	16752236
Lectura 3	26565	16707547	44037	16649149	61737	16735430
Lectura 4	26331	16560377	44012	16639698	61610	16701003
Lectura 5	26475	16650943	43986	16629868	61682	16720520
Lectura 6	26566	16708176	43954	16617769	61862	16769314
Promedio	26516	16676415	43995	16633207	61710	16728156
CV %		<b>0,674</b>		<b>0,0782</b>		<b>0,180</b>

Para la repetibilidad, en los tres pH y tres niveles de concentración el coeficiente de variación del FR fue menor a 2%. Del mismo modo, la precisión intermedia, dentro de cada nivel de concentración, en los tres niveles de concentración en un mismo día y en relación a todos los FR obtenidos durante los tres días, el coeficiente de variación del FR fue menor a 2% en los tres medios de disolución.

### 1.2.7. Exactitud

La exactitud se estableció con el método de adición patrón y se realizaron cinco determinaciones de cada estándar y tres determinaciones para cada blanco madre y cada nivel de concentración.

**Tabla XXXIII:** Porcentaje de recuperación para cada nivel de concentración en tres medios de disolución y el CV% de las respuestas de las soluciones utilizadas.

Nivel de concentración	% de recuperación			Criterio
	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8	
~ 40%	98,3	101,2	101,1	95-105%
~ 100%	101,6	98,5	101,1	95-105%
~ 120%	102,5	101,2	101,3	95-105%
Promedio	100,8	100,3	101,2	95-105%
CV Blanco madre	0,37	0,567	0,744	≤ 2
CV Blanco trabajo	0,276	0,456	0,31	≤ 2
CV Estándar	0,311	0,309	0,0639	≤ 2

Los resultados obtenidos cumplen los criterios de aceptación, por lo tanto el método es exacto.

## 2. PERFILES DE DISOLUCIÓN

La caracterización de los perfiles de disolución se obtuvo por medio del análisis de 18 unidades posológicas de Voltarén<sup>®</sup> 50 en medio de disolución de buffer fosfato pH 6,8 y 12 unidades posológicas de Cataflam<sup>®</sup> 50 en tres medios de disolución (buffer HCl pH 1,2; buffer acetato pH 4,5; buffer fosfato pH 6,8). Los resultados obtenidos en porcentaje de fármaco disuelto y su coeficiente de variación (CV) se describen en las siguientes tablas:

**Tabla XXXIV:** Valores promedio de la cantidad disuelta (%) de diclofenaco sódico desde Voltarén® 50 en la cinética de disolución en la etapa buffer pH 6,8 y el coeficiente de variación (CV) de cada punto de muestreo.

<b>Voltarén® 50 en buffer fosfato pH 6,8</b>		
<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>% Fármaco disuelto</b>	<b>CV (%)</b>
5	0,007	275
10	0,416	113,742
15	9,325	54,95
22	40,591	27,082
30	79,104	14,683
45	98,828	0,998
60	98,622	1,194

**Tabla XXXV:** Valores promedio de la cantidad disuelta (%) de diclofenaco potásico desde Cataflam® 50 para la cinética de disolución, en los tres medios de disolución y el coeficiente de variación (CV) de cada punto de muestreo.

<b>Cataflam® 50</b>						
	pH 1,2		pH 4,5		pH 6,8	
<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>% Fármaco disuelto</b>	<b>CV</b>	<b>% Fármaco disuelto</b>	<b>CV</b>	<b>% Fármaco disuelto</b>	<b>CV</b>
5	1,384	130,10	1,499	115,698	0,000	0,000
10	5,083	30,47	15,030	20,766	17,631	47,073
15	5,872	10,36	19,124	8,857	72,067	21,326
22	5,523	20,43	17,068	13,499	90,326	6,153
30	5,985	21,73	18,403	9,079	93,032	3,762
45	6,235	20,22	17,245	10,112	93,595	2,867
60	5,680	6,447	16,515	8,016	93,839	2,562

Un perfil de disolución permite determinar el comportamiento cinético del principio activo en relación a la liberación-disolución desde la forma farmacéutica en las condiciones experimentales establecidas, por lo tanto, se debe definir a que

orden cinético se ajusta cada proceso de liberación. Además, a través de un perfil de disolución se puede determinar la constante de velocidad del proceso ( $K_D$ ), el tiempo necesario para que se disuelva un determinado porcentaje del fármaco ( $t_{n\%}$ ), detectar tiempos de latencia y cambios cinéticos durante un proceso de disolución <sup>42</sup>.

Es importante recordar que el coeficiente de variación entre las muestras analizadas (12), para los puntos temporales iniciales no debiera ser mayor a 20% y de 10% para los tiempos restantes <sup>42</sup>. Sin embargo, como se observa en las tablas N° 33 y 34 los valores de CV% iniciales siempre fueron mayores a este límite, por esta razón, cuando corresponda determinar factor de similitud no se tomarán en cuenta estos puntos temporales.

Los resultados obtenidos se ajustaron a modelos cinéticos de orden cero y de primer orden considerando hasta el punto de muestreo posterior al 85% del fármaco disuelto (no se consideró necesario estudiar otros modelos). En las tablas N° 36 y 37 se puede distinguir qué orden cinético se ajusta mejor a un modelo lineal mediante la comparación de los respectivos coeficientes de correlación ( $r$ ).

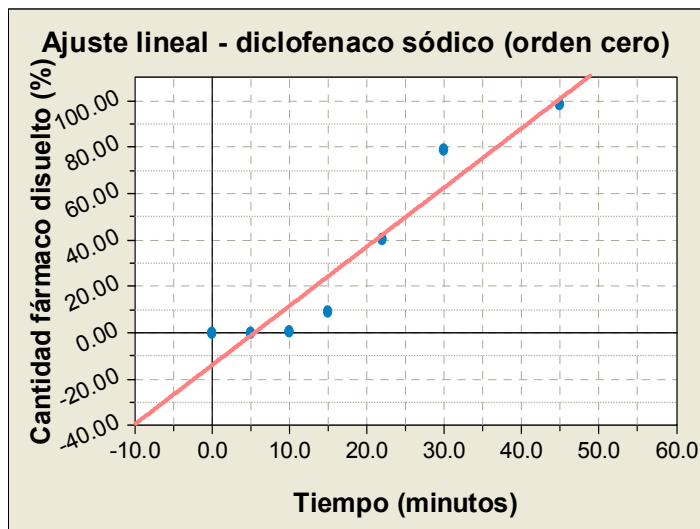
**Tabla XXXVI:** Parámetros analizados para la selección del modelo cinético de disolución de Voltarén<sup>®</sup> 50.

	Parámetros	Buffer pH 6,8
<b>Cinética orden cero</b>	r	0,971
	Pendiente	2,826
	Intercepto	-21,763
	$K_D$ (min)	2,826
<b>Cinética primer orden</b>	r	-0,938
	Pendiente	-0,048
	Intercepto	2,546
	$K_D$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0,112

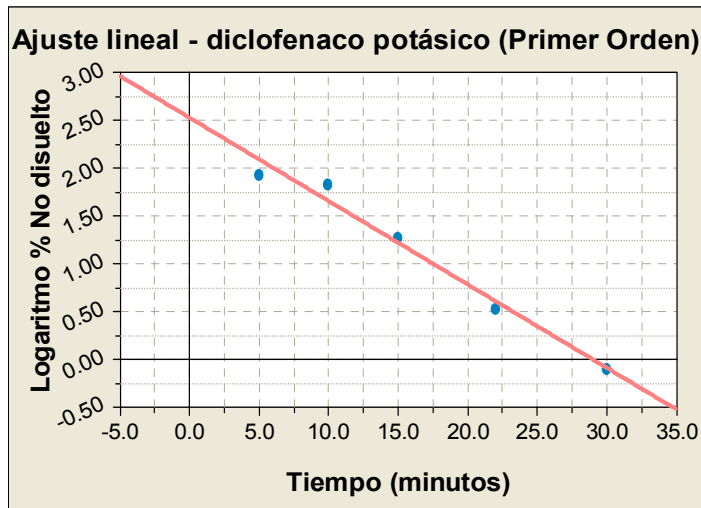
**Tabla XXXVII:** Parámetros analizados para la selección del modelo cinético de disolución de Cataflam<sup>®</sup> 50 en tres medios de disolución.

	Parámetros	Medios de disolución		
		pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8
<b>Cinética orden cero</b>	r	0,642	0,955	0,965
	Pendiente	0,486	1,762	5,723
	Intercepto	-0,868	-5,74	-29,388
	K <sub>D</sub> (min)	0,486	1,762	5,273
<b>Cinética primer orden</b>	r	-0,922	-0,961	-0,978
	Pendiente	-0,0417	-0,009	-0,063
	Intercepto	1,770	2,029	1,857
	K <sub>D</sub> (min <sup>-1</sup> )	0,096	0,02	0,146

El ajuste lineal seleccionado se expresa en los siguientes gráficos (figuras N° 25 y 26). Sólo se consideró necesario evaluar más acabadamente este punto para las pruebas realizadas en los medios de disolución que utilizaremos como referencia para determinar velocidad de disolución de las formas farmacéuticas, es decir en medio de disolución buffer pH 6,8.



**Figura N° 25:** Regresión lineal de la cinética de disolución de diclofenaco sódico desde el producto Voltarén<sup>®</sup> 50 en medio de disolución pH 6,8.



**Figura N° 26:** Regresión lineal de la cinética de disolución de diclofenaco potásico desde el producto Cataflam® 50 en medio de disolución pH 6,8.

La liberación-disolución de Voltarén® 50 se ajusta mejor a un modelo cinético de orden cero (Tabla XXXVI), que comúnmente se observa en formas farmacéuticas de liberación modificada, en general, este comportamiento corresponde a fármacos que se liberan y/o disuelven lentamente y en que la velocidad de disolución tiene menor dependencia de la dosis remanente en comparación a una forma farmacéutica de liberación convencional<sup>43</sup>. Si bien es cierto el desarrollo de formulaciones de liberación controlada busca alcanzar una cinética de orden cero<sup>43</sup>, no es este el objetivo de los productos de liberación retardada, como Voltarén® 50; no obstante, pruebas farmacocinéticas in vivo de ambas formas farmacéuticas muestran comportamientos similares<sup>44</sup>.

En el caso de Cataflam® 50 (teniendo en cuenta que la solubilidad de diclofenaco potásico en las pruebas a pH 1,2 y pH 4,5 es el factor limitante de la disolución del principio activo desde la forma farmacéutica) en las tres situaciones de pH la cinética de primer orden es la que mejor se ajusta a un modelo lineal (Tabla XXXVII). Este comportamiento se observa en procesos de disolución en

que la superficie del comprimido varía en función del tiempo <sup>42</sup> y la velocidad de disolución tiene dependencia de la dosis remanente, característico de los productos de liberación convencional <sup>45</sup>.

Tanto en Voltarén<sup>®</sup> 50 como en Cataflam<sup>®</sup> 50 se observa que los puntos correspondientes a los tiempos iniciales resultan no ser lineales, producto del retardo de la liberación debido al recubrimiento entérico y de la cubierta azucarada, lo que consideraremos como tiempos de latencia ( $t_o$ ) y que corresponden a 7,7 y 6,5 minutos, respectivamente. El tiempo de latencia, en el primer caso, se estableció como el intercepto con el eje de las abscisas desde el modelo lineal de orden cero y en el segundo caso, para el modelo lineal de primer orden se estableció mediante la siguiente ecuación, donde (n) corresponde al intercepto del eje de las ordenadas, (m) la pendiente de la recta exponencial y ( $Q_\infty$ ) el valor asintótico de disolución <sup>42, 46</sup>:

$$t_o = \frac{\log n - \log Q_\infty}{m}$$

Luego de caracterizar la cinética de disolución de ambos productos, corresponde discutir en función de los perfiles obtenidos, la factibilidad para optar a bioexención de productos farmacéuticos similares que contengan diclofenaco sódico y diclofenaco potásico, en base a la normativa de bioequivalencia vigente.

La formulación de Voltarén<sup>®</sup> 50 tiene como propósito la gastrorresistencia por medio de su recubrimiento entérico. Al exponer los comprimidos en medio de disolución HCl 0,1 N a 75 rpm durante dos horas, de la misma forma en medio de disolución buffer acetato pH 4,5 los comprimidos se mantienen aparentemente intactos (Figura N° 27) y la liberación del principio activo fue cercana a cero según

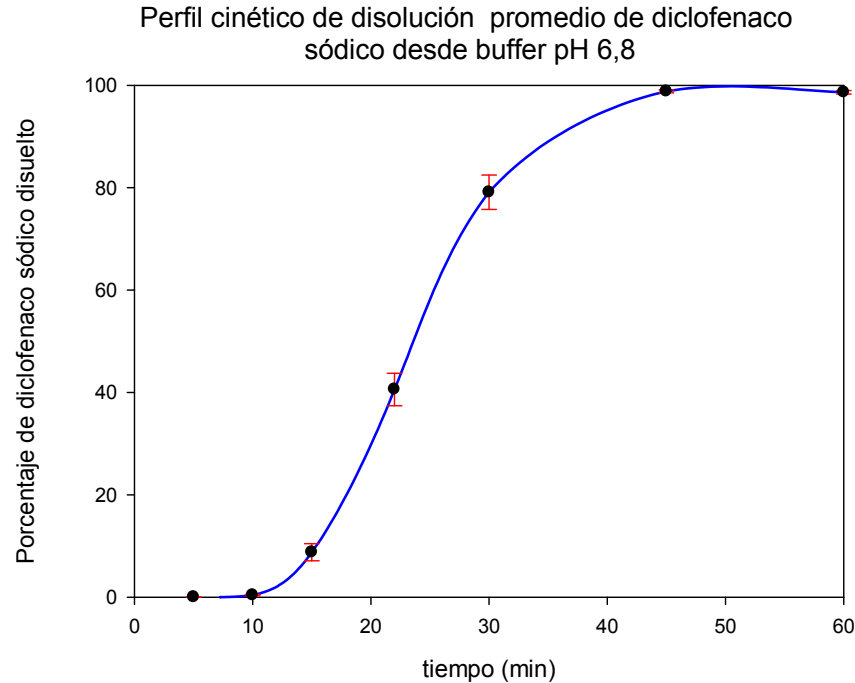
el método de cuantificación. El límite de cuantificación del método corresponde al 0,1% de la cantidad rotulada en 900 mL de medio y la prueba de desafío para formulaciones con recubrimiento entérico según la USP 31 señala como aceptable una liberación máxima de 10% del activo.



**Figura N° 27:** Comprimidos de diclofenaco sódico con recubrimiento entérico sometidos a una prueba de disolución con aparato 2 de la USP a 75 rpm, durante dos horas en medio buffer acetato pH 4,5.

La cinética de disolución de Voltarén<sup>®</sup> 50 a pH 6,8 muestra que éste no se ajusta al concepto de rápida liberación-disolución. Los resultados indican que al minuto 30 se disuelve un 79% diclofenaco sódico desde Voltarén<sup>®</sup> 50 y el requerimiento definido por la OMS y adoptado por la autoridad sanitaria chilena, exige un 85% del PA disuelto antes de 30 minutos, (Figura N° 28). Por lo tanto, bajo los criterios estipulados por la autoridad sanitaria, los productos similares que

contienen diclofenaco sódico no podrían optar a bioexención a los estudios de bioequivalencia in vivo.



**Figura N° 28:** Perfil de liberación disolución promedio de diclofenaco sódico desde Voltarén<sup>®</sup> 50 (dieciocho comprimidos con recubrimiento entérico), en medio de disolución buffer fosfato pH 6,8. El error corresponde a la desviación estándar.

En primera instancia, se tuvo la intención de incorporar a la exigencia de bioequivalencia, a través de estudios de bioexención, a los productos similares al comparador Voltarén<sup>®</sup> 50, aún no correspondiendo a FFSOLI. Se esperaba que los núcleos tuvieran un comportamiento similar a una forma farmacéutica sin recubrimiento del principio activo a pH 6,8, dado que existe una monografía de bioexención para los productos farmacéuticos convencionales que contienen este principio activo. Sin embargo, los resultados fueron concluyentes en el sentido que

el recubrimiento entérico provocó un efecto significativo en el periodo de latencia, incluso a pH 6,8, cercano a 8 minutos, imposibilitando aplicar este tipo de procedimiento abreviado a productos con recubrimiento entérico.

En definitiva, los productos con liberación retardada que contienen diclofenaco sódico no podrían optar a bioexención, dado que el producto comparador no se ajusta a los requerimientos de las bioexenciones en lo que respecta a perfiles de disolución, y por tanto no se contaría con un producto de referencia.

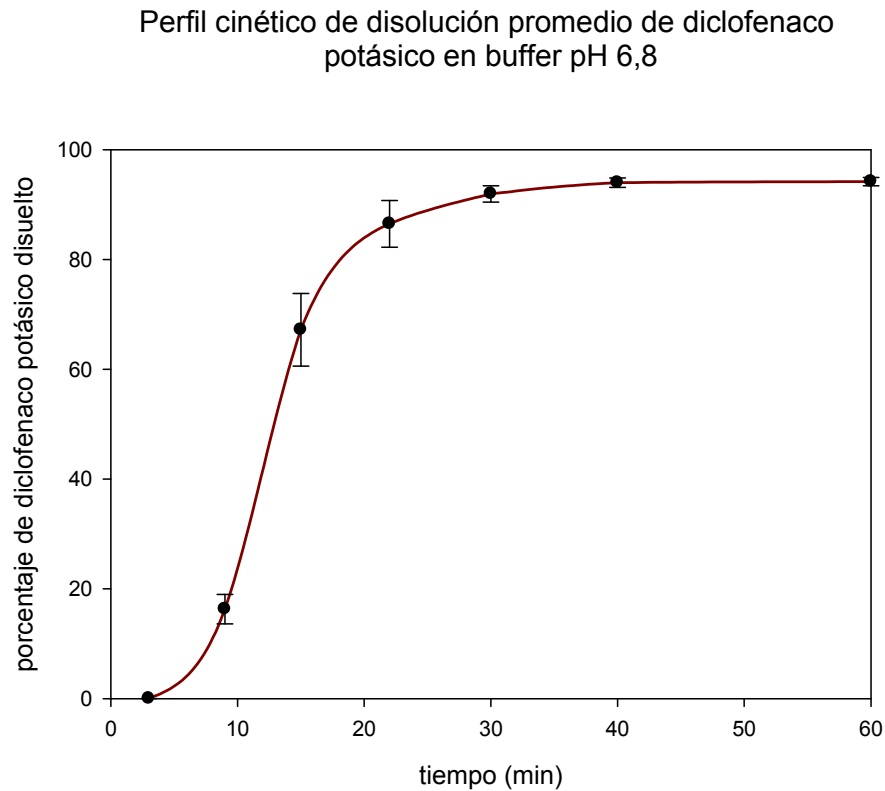
Los criterios utilizados para la determinación de la velocidad de disolución están enfocados para FFSOLI y no de liberación modificada. Además, no existe una normativa específica en el contexto de las bioexenciones para FFSO de liberación retardada.

La legislación actual no ha definido aun una normativa para la realización de estudios de bioequivalencia de los productos con recubrimiento entérico, dado que éstos se consideran como productos de liberación retardada y no convencional. Esto no excluye la posibilidad de que en el mediano plazo, este tipo de productos deba demostrar bioequivalencia por la ejecución de los estudios adecuados. No obstante lo anterior, la realidad de otros países, como los de la Unión Europea, permiten la bioexención de productos que contienen diclofenaco sódico, por estar incluido en formas farmacéuticas de liberación convencional. Del mismo modo, existe una monografía de bioexención que alude la posibilidad de bioeximir de los estudios de BE a productos que contengan cualquiera de las sales comercializadas del agente antiinflamatorio, en formas farmacéuticas

convencionales, con excipientes comúnmente empleados en este tipo de formulaciones.

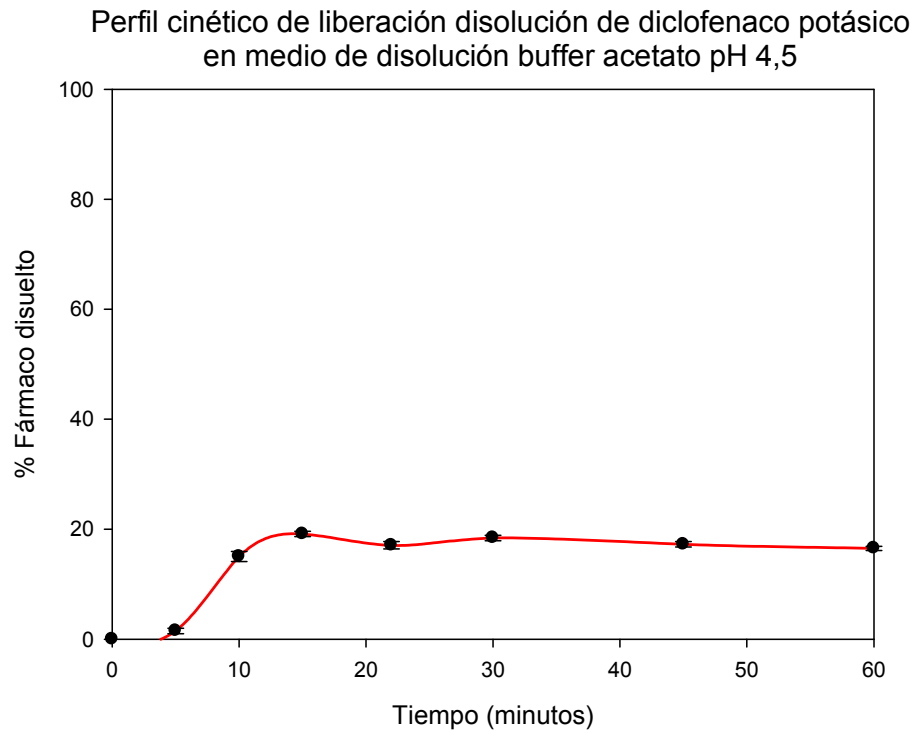
Como se explicó en la metodología, para la formulación de diclofenaco potásico, el análisis de la velocidad de disolución se realizó sólo en el medio de disolución de pH 6,8. En los medios de pH 1,2 y 4,5, se determinó únicamente la capacidad de la formulación de mostrar perfiles de disolución similares entre las doce unidades posológicas analizadas.

El comportamiento en la cinética de disolución de Cataflam<sup>®</sup> 50 a pH 6,8 muestra un patrón de rápida liberación disolución, a diferencia de los resultados obtenidos para la formulación de diclofenaco sódico. Como se observa en la Figura N° 29 la disolución del 85% de la cantidad rotulada de PA se obtiene antes del minuto 30, específicamente a los 18 minutos, por lo tanto se cumple con la condición requerida a este pH según la extensión de bioexenciones para fármacos ácidos débiles clase II del BCS, que contempla la legislación vigente.



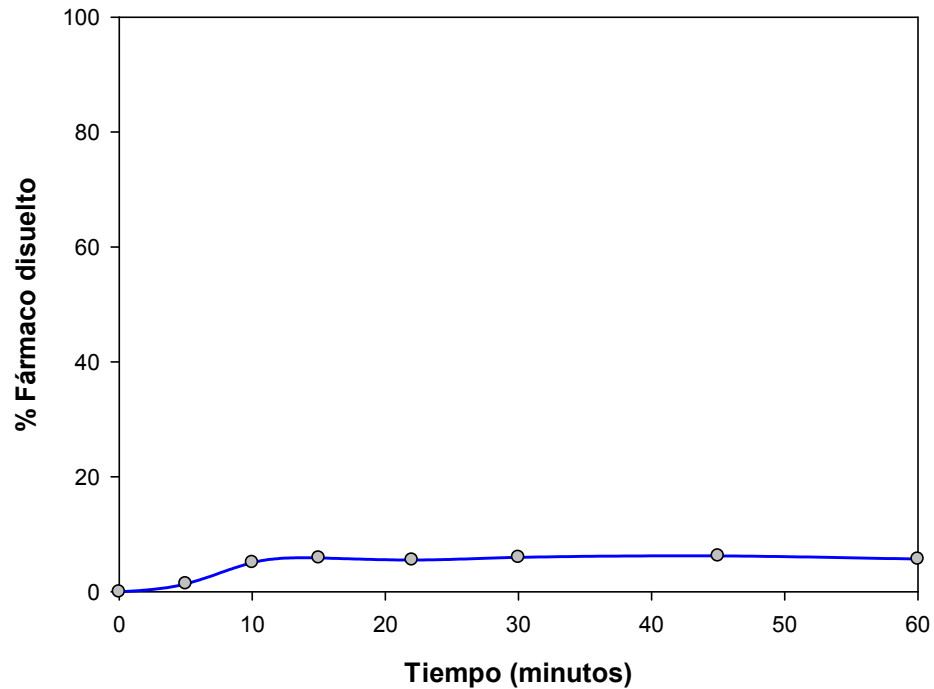
**Figura N° 29:** Perfil de liberación disolución promedio de diclofenaco potásico desde Cataflam<sup>®</sup> 50, en medio de disolución buffer fosfato pH 6,8. El error corresponde a la desviación estándar.

El valor asintótico de disolución en los pH ácidos estará condicionado por la solubilidad de en dichos solventes, por lo tanto,  $Q_{\infty}$  será cercano a 3% y 18% de la dosis rotulada a pH 1,2 y pH 4,5, respectivamente.



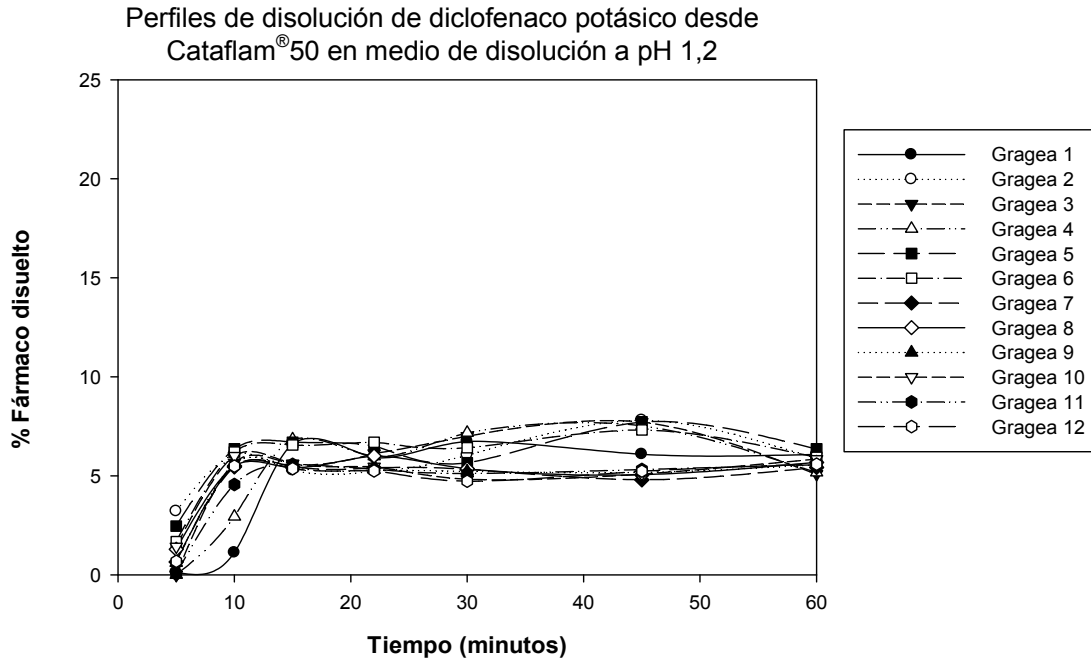
**Figura Nº 30:** Perfil de liberación disolución promedio de diclofenaco potásico desde Cataflam® 50 (doce grageas), en medio de disolución buffer acetato pH 4,5. El error corresponde a la desviación estándar.

Perfil de disolución de diclofenaco potásico desde Cataflam<sup>®</sup> 50  
en medio de disolución pH 1,2

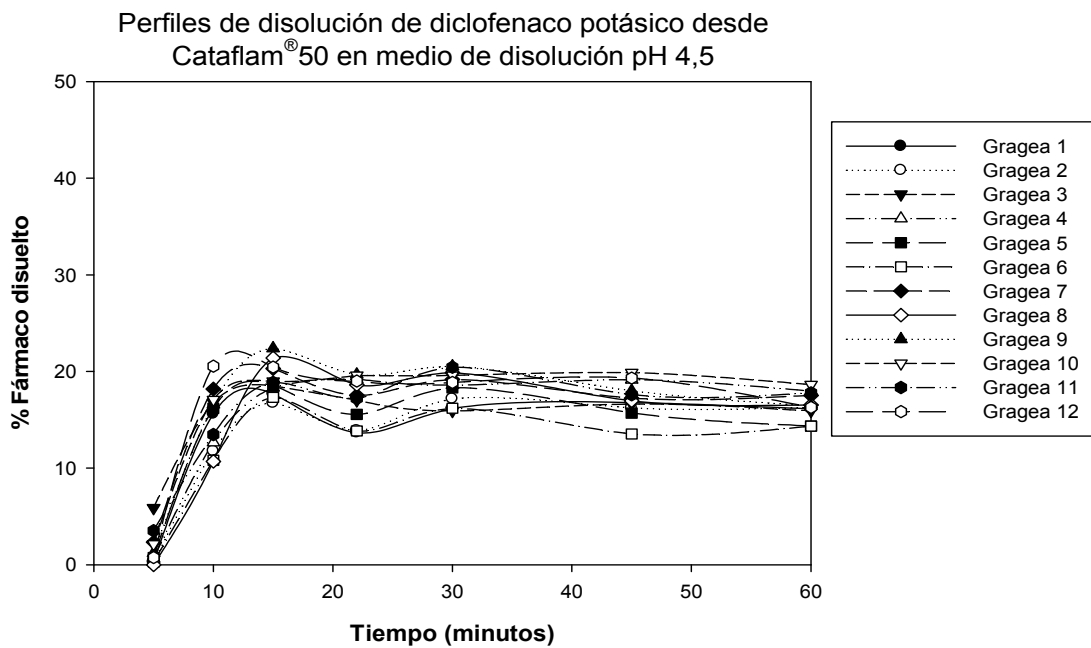


**Figura N° 31:** Perfil de liberación disolución promedio de diclofenaco potásico desde Cataflam<sup>®</sup> 50 (doce grageas), en medio de disolución HCl pH 1,2.

La similitud de los perfiles de disolución a los pH 1,2 y 4,5 se determinó a través del cálculo del factor de similitud ( $f_2$ ) entre dos tandas de seis unidades posológicas. Además podemos apreciar visualmente la similitud de los perfiles al observar las Figuras N° 32 y 33, donde se presentan en forma individual, en el mismo gráfico, las cinéticas de cada una de las doce grageas ensayadas.



**Figura N° 32:** Perfil cinético de disolución en forma individual para cada gragea de Cataflam<sup>®</sup> 50 ensayada (12) en medio de disolución HCl pH 1,2.



**Figura N° 33:** Perfil cinético de disolución en forma individual para cada gragea de Cataflam<sup>®</sup> 50 ensayada (12) en medio de disolución buffer acetato pH 4,5.

El factor de similitud obtenido al comparar las seis primeras grageas utilizadas en el ensayo con las seis restantes, analizadas en distintos días, a pH 1,2 y pH 4,5 se representan en las siguientes tablas:

**Tabla XXXVIII:** Factor de similitud punto a punto (tiempo) para el perfil de disolución a pH 1,2.

Factor de similitud						
Tiempo	10	15	22	30	40	60
$\sum (R - T)^2$	0,507	1,130	1,145	4,318	9,384	9,41
$f_2$	95,5	95,1	96,5	92,1	88,5	89,8

**Tabla XXXIX:** Factor de similitud punto a punto (tiempo) para el perfil de disolución a pH 4,5.

Factor de similitud						
Tiempo	10	15	22	30	40	60
$(R - T)^2$	4,52	11,02	20,49	27,71	31,05	32,91
$f_2$	81,45	79,66	77,66	77,52	78,55	79,70

El criterio de aceptación para  $f_2$  es que éste sea mayor a 50 y los resultados muestran que en ambos pH, este factor fue superior a 50.

Por lo tanto, las características de liberación del núcleo de las grageas que contienen diclofenaco potásico a pH 6,8 y la similitud de la liberación de cada una de las doce grageas utilizadas a pH 1,2 y a pH 4,5, permitiría concluir que Cataflam 50 podría ser empleado como referente o producto comparador de otros similares comercializados, que contengan esta sal del fármaco.

## CONCLUSION

- Se desarrolló y validó una metodología analítica y un procedimiento de disolución apto e idóneo para la determinación de perfiles de liberación-disolución de diclofenaco sódico y potásico.
- Se logró definir el orden cinético de los procedimientos de disolución de los productos farmacéuticos en análisis. Para Voltarén<sup>®</sup> 50 se observó un comportamiento cinético de disolución de orden cero, en cambio para Cataflam<sup>®</sup> 50, se observó una cinética de disolución de orden uno.
- Los resultados obtenidos para Voltarén<sup>®</sup> 50, indicaron que en base a su velocidad de liberación disolución, ésta no es una formulación que se ajuste a los requisitos como para considerarla producto de referencia para pruebas de comparación de perfiles de disolución, entre productos similares (bioexención).
- El recubrimiento entérico, causante de un significativo periodo de latencia para la liberación del principio activo, parece ser el factor que más influye en la velocidad característica de disolución de diclofenaco desde Voltarén<sup>®</sup> 50.
- La velocidad de liberación de diclofenaco desde Cataflam<sup>®</sup> 50, en medio de disolución buffer fosfato pH 6,8, junto a su comportamiento homogéneo entre las muestras analizadas en los medios de disolución HCL pH 1,2 y buffer acetato pH 4,5, permitió concluir que ésta es una formulación adecuada para considerarla producto de referencia en los ensayos de comparación de perfiles de disolución, entre productos similares (bioexención).

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Resolución Exenta N° 728. 2009. Establece Fecha de Vigencia para la Exigencia de Estudios de Bioequivalencia a Productos Farmacéuticos Monodroga que Contienen Ciclosporina, Diclofenaco (Sódico y Potásico), Cloxacilina y Zidovudina. Instituto de Salud Pública de Chile.
2. Resolución Externa N° 515., 2004. Política Nacional de Medicamentos en la Reforma de la Salud. Ministerio de Salud de Chile.
3. WHO Expert committee on Specifications for Pharmaceutical preparations, 40th Report, WHO technical Report Series N° 937, Annex 7: Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability, Geneva 2006.
4. G-BIOF 01. 2007. Guía Técnica: Estudios de biodisponibilidad comparativa con productos de referencia para establecer Equivalencia Terapéutica. Sección de Biofarmacia. Instituto de Salud Pública de Chile.
5. WHO technical report series, No.937, 2006. Proposal to waive in vivo bioequivalence requirement for WHO Model List for Essential Medicines immediate release, solid oral dosage forms.
6. Novartis. 2006. Prescribing information of Voltaren. Available from URL <http://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/Voltaren.pdf>.
7. Resolución Exenta N° 727. 2005. Norma que define los criterios destinados a establecer equivalencia terapéutica a productos farmacéuticos en Chile. Ministerio de Salud de Chile.

8. FDA, 2003. Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products– General Considerations. US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, USA.
9. WHO Expert Committee On Specifications for Pharmaceutical Preparations, Multisource (Generic) Pharmaceuticals Products. Thirty Four Report, Who Technical Report Series, N° 863, Annex 9: Guidelines On Registration Requirements to Establish Interchangeability, Geneva. 1996.
10. FDA, 2000. Guidance for industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms based on Biopharmaceutic Classification System. US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, USA.
11. Aulton M. E. 2004. Farmacia: La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. 2ª Edición. Editorial Elsevier. Madrid.
12. F. Faassen, H. Vromans. Biowaivers for oral immediate release products: Implications of linear pharmacokinetics. Department of Pharmaceutics, NV Organon, University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands. 2004.
13. G-BIOF 02. 2007. Guía Técnica: Bioexención de los estudios de Biodisponibilidad/Bioequivalencia para establecer Equivalencia Terapéutica de Formas Farmacéuticas Sólidas Orales. Instituto de Salud Pública de Chile.
14. Guidance for Industry. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. FDA/CDER. Washington D.C. 2000.
15. B. Chuasuwan, V. Binjesoh, J.E. Polli, H. Zhang, G.L. Amidon, H.E. Junginger, K.K. Midha, V.P. Shah, S. Stavchansky, J.B. Dressman, D.M. Barends. 2008.

- Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Diclofenac Sodium and Diclofenac Potassium. *J Pharm Sci.* 98 (4): 1206-1219. 2009.
16. Eleni Rinaki, Aristides Dokoumetzidis, Georgia Valsami, and Panos Macheras. Identification of Biowaivers Among Class II Drugs: Theoretical Justification and Practical Examples. *Pharm Res.* 21 (9): 1567-1572. 2004.
  17. Tantishaiyakul V. Prediction of aqueous solubility of organic salts of diclofenac using PLS and molecular modeling. *Int J Pharm.* 275 (2): 133-139. 2004.
  18. María E. Olivera, Daniel A. Allemandi y Rubén H. Manzo. Equivalencia Farmacéutica en Comprimidos Recubiertos de Diclofenaco sódico. *Acta Farm. Bonaerense* 22 (2): 143-6. 2003.
  19. Lawrence Yu X., Gordon Amidon L., James Polli E., Hong Zhao, Mehul Mehta U., Dale Conner P., Vinod Shah P., Lawrence Lesko J., Mei-Ling Chen, Vincent L. Lee, y Ajaz Hussain S. Biopharmaceutics Classification System: The Scientific Basis for Biowaiver Extensions. *Pharm Res.* 19 (7): 921-5. 2002.
  20. E. Galia, E. Nicolaidis, D. Horter, R. Lobenberg, C. Reppas, and J. B. Dressman. Evaluation of Various Dissolution Media for Predicting *in vivo* Performance of Class I and Class II drugs. *Pharm. Res.* 15 (5): 698–705. 1998.
  21. Yazdanian M, Briggs K, Jankovsky C, Hawi A. The “high solubility” definition of the current FDA guidance on biopharmaceutical classification system may be too strict for acidic drugs. *Pharm Res* 21 (2): 293–299. 2004.
  22. H. H. Blume and B. S. Schug. The Biopharmaceutics Classification System (BCS): Class III Drugs Better Candidates for BA/BE. Waiver? *Eur J Pharm Sci.* 9:117–121. 1999.

23. Giarcovich, S. y Bolaños, R. El “ser o no ser” de la Bioequivalencia: Rangos *one size fits all vs. case by case* y otras opciones. Rev. SAFYBI, 44 (108): 1-28. 2004.
24. The United States Pharmacopeial Convention. 2008. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario Nacional. USP 31/NF 26. Compendios de Normas Oficiales, pp 309; 1944.
25. Novartis. 2006. Prescribing information of Voltarén and Cataflam. Disponible en URL <http://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/Voltarencataflam.pdf>.
26. WHO collaborating centre for drug statistics methodology. 2009. Norwegian Institute of Public Health. Disponible desde la URL [http://www.whocc.no/atc\\_ddd\\_index/?code=M01AB05](http://www.whocc.no/atc_ddd_index/?code=M01AB05).
27. Feria M. 1998. Fármacos analgésicos-antitérmicos y antiinflamatorios no esteroideos. Antiartríticos. En: Flórez J., Editor. Farmacología Humana. Editorial Masson. 3ª Edición. Barcelona, pp 355 – 385.
28. Hinz B, Rau T, Auge D, Werner U, Ramer R, Rietbrock S y Brune K. Aceclofenac spares cyclooxygenase 1 as a result of limited but sustained biotransformation to diclofenac. *Clin Pharmacol Ther.*;74 (3): 222–35. 2003.
29. Novartis. 2006. Prescribing information of Cataflam. Disponible en URL <http://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/Cataflam.pdf>.
30. Kirchheiner J, Meineke I, Steinbach N, Meisel C, Roots I, Brockmöller J. Pharmacokinetics of diclofenac and inhibition of cyclooxygenases 1 and 2: no relationship to the CYP2C9 genetic polymorphism in humans. Institute of Clinical Pharmacology, University Medical Centre Charité, Humboldt University, Berlin, Germany. 2003

31. Toolkit Dissolution Procedure: Mechanical Calibration and Performance Verification Test. Version 1.0. Draft 5.1. 2007.
32. Qureshi SA. Calibration – The USP Dissolution Apparatus Suitability Test. Drug Info J. 30: 1055 – 1061. 1996.
33. Electrolab. Información de productos. Dissolution Media Preparator. [http://electrolab.tradeindia.com/Exporters\\_Suppliers/Exporter2351.461085/21-Litre-Mobile-Dissolution-Media-Preparator.html](http://electrolab.tradeindia.com/Exporters_Suppliers/Exporter2351.461085/21-Litre-Mobile-Dissolution-Media-Preparator.html). Sitio web visitado el 15 de Septiembre del 2010.
34. Álvaro A. Vásquez O. Calificación de Equipos HPLC y Validación de Metodologías Analíticas. Validación de metodología Analítica de Aspirina<sup>®</sup> 500mg Unidad de Práctica Prolongada para optar al título de Químico-Farmacéutico. Universidad de Chile. 2006.
35. M. Ilias Jimidar, Patrick Heylen, and Maurits de Smet. Method Validation. En: HPLC FOR PHARMACEUTICAL SCIENTISTS. Edited by Yuri Kazakevich Seton Hall University South Orange, New Jersey. 2007.
36. Garcia G. J. 2001. Validación de Métodos Analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria A.E.F.I. Barcelona, pp 46-105.
37. ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). International Conference on Harmonization of Technical Requirements. 2005.
38. Pérez, L. Degradación Fotoquímica de Contaminantes Emergentes Mediante Procesos Solares. Evaluación Analítica. Departamento de Hidrogeología y Química Analítica, Universidad de Almería, España. 2008.
39. Y. Vander Heyden, A. Nijhuis, J. Smeyers-Verbeke, B. G. M. Vandeginste and D. L. Massart. Guidance for Robustness/ruggedness Test in Method Validation.

- Vrije Universiteit Brussel, Chemo AC, Pharmaceutical Institute, Brussel, Belgium. 2001.
40. Carmona B. M. Procedimiento de Validación de Métodos Analíticos en HPLC y UV-Vis. Subdepartamento Laboratorio Nacional de Control, Instituto de Salud Pública de Chile. 2007.
41. Castillo B. y González R. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. Rev. Cubana Farm. 30 (1): 1-8. 1996.
42. Edison Cid C. Control de Calidad Biofarmacéutico de Medicamentos. Cinética de Disolución, Farmacocinética, Biodisponibilidad. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas Universidad de Chile. 1992.
43. Virginia Sáez, Estíbaliz Hernáez y Leyre López. Liberación Controlada de Fármacos. Aplicaciones Biomédicas. Facultad de Ciencias, Campus de Lejona (Vizcaya). Universidad del País Vasco, España. 2003.
44. Guidance for Industry. Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products — General Considerations U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2003.
45. Aulton ME. 2004. Farmacia la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas 2ª Edición. Editorial Elsevier. Madrid. 254 – 256 pp.
46. Martínez L. Pereda D. Zantac 150 y Ranitidina de Producción Nacional: Liberación *in Vitro*. Rev Cubana Farm 38 (2):1. 2004.