



FACULTAD DE FARMACIA

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD BIOFARMACÉUTICA DE LOS PRODUCTOS DE
REFERENCIA Y EQUIVALENTE TERAPÉUTICO QUE CONTIENEN
ALPRAZOLAM EN FORMAS FARMACÉUTICAS SÓLIDAS ORALES DE
LIBERACIÓN CONVENCIONAL

Internado para optar al Título de Químico Farmacéutico

CAROLINA DE LOS ANGELES ARAYA QUIROZ

Director de Internado: QF. Alexis Aceituno Álvarez, PhD

Co-Director de Internado: QF. Patricia Carmona Sepúlveda.

2014

“A mi abuelos Mery y Rolando y a mi Madre, los cuales siempre me entregaron su amor y apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida”

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar un especial agradecimiento a la persona que me dio la fuerza necesaria para terminar satisfactoriamente esta linda etapa de mi vida, a quien luchó por que fuera una profesional y saliera adelante a pesar de todos los obstáculos que se interpusieron en mi camino. Ella es mi abuela Mery, mi querida “yaya”, gracias por tu amor, cariño, cuidarme y apoyarme hasta el último de tus días. Son infinitas las emociones que siento al agradecerte y son miles las palabras que tengo para demostrarte lo feliz que me hiciste. Sé que luchaste hasta el final por estar junto a mí en el día de mi titulación, era tu sueño, nuestro sueño, pero desde donde estés quiero decirte, gracias mi linda yaya por hacer nuestro sueño realidad. Eres y seguirás siendo por siempre mi pilar y ejemplo.

Gracias a mi madre y hermanita por su paciencia, cariño, amor y comprensión que me entregan día a día. Gracias mamita por entregarme siempre una sonrisa, de verdad te admiro y este título también es tuyo, ya que siempre estuviste a mi lado apoyándome en todas mis decisiones y te esforzaste siempre por darme lo mejor, para que fuera una gran persona y una gran profesional. Gracias hermanita por alegrarme los días, por ser tan buena niña y estoy feliz de tenerte a mi lado. Las amo demasiado y son mi razón para seguir surgiendo en esta vida.

Además, me gustaría darle las gracias a otra persona muy importante en mi vida, mi abuelo Rolando, mi querido “tata”, quien también me apoyo en todo momento y a pesar que ya no está conmigo hace mas de 4 años, se que siempre ha estado a mi lado cuidándome y guiándome.

Yaya, mama y tata, no hay forma de recompensar todo lo que han hecho por mí, la persona que soy es gracias a ustedes y no los cambiaría por nada en este mundo.

Gracias a toda mi familia, tíos y primos, por su apoyo y cariño incondicional. Me gustaría destacar a mi tía Natalia, por su amor, cariño y preocupación durante toda mi vida. A mi tía Mena y mi tío Juan, los cuales me dieron la seguridad para terminar mi

carrera profesional y gracias tía por confeccionarme ese lindo delantal para mis prácticas e internado. Gracias a mi tío Adán, tía Wilma y tía Lucy, por hacer de su hogar el mío y por todo el amor que entregaron en este tiempo. A todos ellos, los quiero demasiado y sin duda fueron un gran apoyo para terminar mi carrera de la mejor forma posible.

Gracias a mi profesor y director de internado don Alexis Aceituno, por guiarme y ayudarme siempre durante todo el transcurso del internado y por confiar en mí para formar parte de este gran proyecto. Además, quiero darle las gracias por darme la oportunidad de formar parte como alumna tesista de un gran equipo de trabajo, el Subdepartamento de Biofarmacia y Bioequivalencia. A todos ellos, gracias por la gran experiencia adquirida, por ayudarme tanto intelectualmente como emocionalmente, por apoyarme en los buenos y difíciles momentos que pase durante el internado y por conocer muy lindas personas. Sin duda esta fue una experiencia que nunca olvidare y nunca los olvidare.

Quiero agradecer al Subdepartamento Laboratorio Nacional de Control, por su buena disponibilidad, por atender siempre todas mis consultas y por todo el conocimiento que me entregaron. Ustedes fueron un gran apoyo en este periodo de internado y estoy muy agradecida de su compañía y del cariño que me entregaron en todo momento.

Quiero agradecer a mis amigos de universidad, por acompañarme y apoyarme incondicionalmente en estos 6 años. Son tantos los buenos momentos que pasamos juntos, son tantos los almuerzos juntos y son tantos los recuerdos que se me vienen a la mente, siempre alegrándome los días. Sin duda lo lindo de esta etapa fue conocerlos y estoy muy agradecida de todo lo que hicieron por mí. Los quiero demasiado.

Finalmente, me gustaría agradecer a mis mejores amigas y amigos, por su cariño, compañía y apoyo cuando más lo necesité. Gracias a ustedes por ayudarme a salir adelante en este difícil año y gracias por los lindos momentos que me entregaron en esta etapa de mi vida.

ÍNDICE

RESUMEN	vii - viii
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1 - 11
2. OBJETIVOS	12 - 13
2.1. OBJETIVO GENERAL	12
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12 - 13
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14 - 46
3.1. MATERIALES.....	14 - 18
3.2. METODOLOGÍA	18 - 46
4. RESULTADOS.....	47 - 67
5. DISCUSIÓN	68 - 74
6. CONCLUSIONES.....	75 - 76
7. BIBLIOGRAFÍA	77 - 81
8. ANEXOS	82 - 99

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Sistema de Clasificación Biofarmacéutico	3
Tabla 2. Características de desempeño según el tipo de procedimiento analítico	7
Tabla 3. Características y propiedades del principio activo alprazolam.....	10
Tabla 4. Determinación pKa: construcción modelo experimental.....	22
Tabla 5. Determinación Solubilidad Intrínseca: construcción modelo experimental	23
Tabla 6. Condiciones cromatográficas valoración materia prima activa alprazolam.....	26
Tabla 7. Condiciones cromatográficas estudio de liberación-disolución <i>in vitro</i>	31
Tabla 8. Descripción de los productos farmacéuticos en estudio	42
Tabla 9. Condiciones experimentales de estudio de liberación-disolución <i>in vitro</i>	42
Tabla 10. Resultados control de calidad del electrodo y control de calidad del titulante del equipo de solubilidad Gemini Profiler	47
Tabla 11. Resultados análisis de pKa de alprazolam.....	48
Tabla 12. Resultados del ensayo de Solubilidad Intrínseca de la materia prima activa alprazolam	48
Tabla 13. Solubilidad mínima materia prima activa alprazolam	52
Tabla 14. Variación del factor de respuesta	53
Tabla 15. Resultados valoración materia prima activa alprazolam de Laboratorio B.....	53
Tabla 16. Resultados selectividad en los tres medios de disolución.....	54
Tabla 17. Resultados linealidad pH 1,2	55
Tabla 18. Resultados linealidad pH 4,5	56
Tabla 19. Resultados linealidad pH 6,8	56
Tabla 20. Estadística de regresión parámetro linealidad para los tres medios de disolución.....	57
Tabla 21. Resultados repetibilidad y precisión intermedia para los tres medios de disolución.....	58
Tabla 22. Estadística precisión intermedia pH 1,2: Test Comparación de Medias.....	59
Tabla 23. Estadística precisión intermedia pH 4,5: Test Comparación de Medias.....	59

Tabla 24. Estadística precisión intermedia pH 6,8: Test Comparación de Medias.....	60
Tabla 25. Resultados exactitud pH 1,2.....	61
Tabla 26. Resultados exactitud pH 4,5.....	61
Tabla 27. Resultados exactitud pH 6,8.....	62
Tabla 28. Estadística exactitud en los tres medios de disolución	62
Tabla 29. Resultados estabilidad para los tres medios de disolución	63
Tabla 30. Resumen resultados cinéticas de liberación-disolución pH 1,2	64
Tabla 31. Resumen resultados cinéticas de liberación-disolución pH 4,5	65
Tabla 32. Resumen resultados cinéticas de liberación-disolución pH 6,8.....	66
Tabla 33. Resumen de resultados estudio cinético de liberación-disolución comparativo en los tres medios de disolución.	67
Figura 1. Estructura química de alprazolam	8
Figura 2. Apertura de anillo de alprazolam	9
Figura 3. Solubilidad Intrínseca integrada y gráfico Bjerrum de materia prima activa alprazolam	49
Figura 4. Gráfico de perfil de solubilidad materia prima activa alprazolam otorgada por software pS	50
Figura 5. Gráfico de perfiles de solubilidad materia prima activa alprazolam	51
Figura 6. Gráfico de perfiles de solubilidad materia prima activa alprazolam con rango de solubilidad estrecho	51
Figura 7. Cinética de liberación-disolución comparativo en solución HCl 0,1 N pH 1,2 ...	64
Figura 8. Cinética de liberación-disolución comparativo en solución amortiguadora de acetato pH 4,5.....	65
Figura 9. Cinética de liberación-disolución comparativo en solución amortiguadora de fosfato pH 6,8	66

RESUMEN

En este internado se trabajó bajo el Programa de Fiscalización a la Calidad Biofarmacéutica que el Subdepartamento de Biofarmacia y Bioequivalencia de la Agencia Nacional de Medicamentos inició en el año 2013, con el fin de verificar con pruebas de laboratorio que aquellos productos que demostraron su equivalencia terapéutica mediante estudios *in vitro* mantienen dicha calidad en el tiempo. El objetivo de este estudio es evaluar la calidad biofarmacéutica de dos productos que contienen alprazolam en comprimidos de 0,5 mg, uno de los cuales corresponde al producto de referencia en Chile del Laboratorio A y el otro al producto equivalente terapéutico del Laboratorio B. Para ello, se determinó el perfil de solubilidad en función del pH de la materia prima activa alprazolam empleada por Laboratorio B y se realizó un estudio cinético de liberación-disolución comparativo entre el producto de referencia y el producto equivalente terapéutico en medios de pH 1,2, 4,5 y 6,8, empleando una metodología analítica previamente validada para el análisis de las muestras. Dentro de los resultados obtenidos destaca la alta solubilidad que presentó la materia prima activa alprazolam y una muy rápida liberación-disolución en los tres medios establecidos tanto del producto de referencia como del producto equivalente terapéutico. De esta manera, se comprobó y corroboró el cumplimiento de los requisitos de solubilidad y disolución que permitieron la aprobación de bioexención en base al Sistema de Clasificación Biofarmacéutico del producto equivalente terapéutico de Laboratorio B.

ABSTRACT

A research work under the program of biopharmaceutical quality control was during this internship led by the Sub-department of Biopharmacy and Bioequivalence of the National Agency of Medicines started in 2013. The goal was to verify by the use of laboratory testing products that demonstrated their therapeutic equivalence through *in vitro* studies maintain such quality over time. The objective of this study is to evaluate the biopharmaceutical quality of two products containing alprazolam in tablets of 0,5 mg, one of which corresponds to the reference product in Chile from A Laboratory and other therapeutic equivalent product from B Laboratory. The analysis were the determinations of the solubility profile in function of pH of alprazolam active raw material used by B Laboratory and to perform a comparative release-dissolution kinetic study between the reference product and equivalent therapeutic product in mediums of pH 1,2, 4,5 and 6,8, using an analytic methodology previously validated for the sample analysis. Results showed that high solubility presented by the alprazolam active raw material and a very fast release-dissolution in the three media established so much of the reference product as the therapeutic equivalent product. In this way, there was fulfillment with the compliance for the requirements of solubility and dissolution that allowed the approval of biowaivers based on the Biopharmaceutics Classification System of the reference product from B Laboratory.

1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de internado pretende, como su nombre lo indica, evaluar la calidad biofarmacéutica de los productos comparador y equivalente terapéutico que contienen alprazolam en formas farmacéuticas sólidas orales de liberación convencional, mediante la determinación de perfiles de solubilidad de la materia prima activa y la realización de un estudio cinético de liberación-disolución comparativo, con el fin de efectuar un seguimiento a la equivalencia terapéutica (bioequivalencia) demostrada anteriormente por los titulares de los respectivos registros sanitarios.

Los medicamentos juegan un rol fundamental en la salud de las personas, por lo que su calidad y seguridad debe estar demostrada. Es por ello, que el Ministerio de Salud y el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), en un trabajo conjunto, efectuaron modificaciones al reglamento del Sistema Nacional de Control de Productos Farmacéuticos, con el objetivo de avanzar en el tema relacionado a la equivalencia terapéutica de productos farmacéuticos¹. Además, para complementar lo anterior, la Unidad de Biofarmacia del Departamento de Control Nacional del ISP (actualmente Subdepartamento de Biofarmacia y Bioequivalencia), elaboró la “Norma que define los criterios para establecer equivalencia terapéutica en productos farmacéuticos en Chile”, la cual fue editada por el Ministerio de Salud y publicada en el diario oficial junto con la “Norma que determina los principios activos contenidos en productos farmacéuticos que deben demostrar su equivalencia terapéutica y la lista de productos farmacéuticos que sirven de referencia de los mismos”, dando inicio a la implementación de la actual exigencia de demostración de equivalencia terapéutica²⁻³.

Esta Norma señala que dos productos farmacéuticos son equivalentes terapéuticos si son equivalentes farmacéuticos (mismo principio activo, misma cantidad, idéntica forma farmacéutica y administrados por la misma vía) rotulados y manufacturados bajo normas actualizadas de buenas prácticas de manufactura (GMP), y si han demostrado, a través de

estudios apropiados, que sus efectos, respecto a eficacia y seguridad, son los mismos, luego de ser administrados al hombre en la misma dosis molar². Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha ampliado esta consideración a productos que son alternativas farmacéuticas⁴. De esta manera, demostrar la equivalencia terapéutica de un producto farmacéutico similar con un producto de referencia oficial o comparador, permite asegurar la intercambiabilidad entre ambos, con el fin de que el Estado pueda garantizar el acceso y disponibilidad a medicamentos eficaces y seguros a la población⁵.

Los productos farmacéuticos similares o genéricos corresponden a medicamentos que son equivalentes farmacéuticos respecto al producto de referencia o comparador, que pueden ser o no equivalentes terapéuticos y si se decide que sean intercambiables deben demostrar su equivalencia terapéutica y cumplir con los mismos estándares de calidad, eficacia y seguridad que el producto de referencia. En cambio, el producto farmacéutico de referencia o comparador es un producto determinado por la autoridad sanitaria respecto del cual se compara otro que requiere evaluación de su equivalencia terapéutica y generalmente corresponde a un medicamento innovador (primer producto farmacéutico con autorización de comercialización, en base a la documentación de calidad, eficacia y seguridad)²⁻³⁻⁶.

La equivalencia terapéutica entre productos farmacéuticos se puede establecer a través de Estudios Farmacodinámicos, Estudios Clínicos, Estudios de Biodisponibilidad Comparativo (Estudios de Bioequivalencia *in vivo*) y Estudios de Liberación-Disolución *in vitro*, siendo los Estudios de Bioequivalencia *in vivo* y los Estudios *in vitro*, los más utilizados en la actualidad⁷.

El Estudio de Bioequivalencia *in vivo* consiste en comparar la cantidad y velocidad con que el fármaco de un producto de referencia y el de un producto en estudio (genérico o similar) llegan a la circulación sanguínea. De esta manera, como se asume que iguales perfiles plasmáticos producirán equivalentes efectos terapéuticos, si se demuestra que el fármaco en estudio presenta el mismo perfil de concentración sanguínea que el fármaco de referencia, la evidencia de eficacia clínica y seguridad del producto farmacéutico de

referencia se aplica al producto farmacéutico en estudio⁸. Aunque este estudio ha sido el estándar aceptado internacionalmente para demostrar la seguridad y eficacia de los medicamentos, en ciertos casos se puede solicitar bioexención de estudios de bioequivalencia, es decir, eximición de la obligación de presentar estudios de biodisponibilidad comparativo para el establecimiento de la equivalencia terapéutica, la cual puede demostrarse mediante estudios *in vitro* (estudio Cinético de Liberación-Disolución comparativo) entre el producto en estudio y el producto de referencia². Uno de los casos en que es posible aplicar esta consideración, corresponde a formas farmacéuticas sólidas orales de liberación inmediata (FFSO-LI) en base al Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB)⁹.

El SCB es un marco científico utilizado para clasificar a los principios activos en base a su solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal, que al ser combinado con la cinética de liberación-disolución del producto farmacéutico, toma en consideración tres factores principales que gobiernan la velocidad y el grado de absorción del fármaco a partir de la FFSO-LI: disolución, solubilidad y permeabilidad intestinal. El verdadero sentido de esta clasificación es que la disolución de la forma farmacéutica depende considerablemente de la solubilidad del principio activo y que la absorción en el tracto gastrointestinal depende de las propiedades de permeabilidad del principio activo¹⁰⁻¹¹. Según el SCB, los principios activos se clasifican de la siguiente manera:

Tabla 1. Sistema de Clasificación Biofarmacéutico

Clase	Solubilidad	Permeabilidad
1	Alta	Alta
2	Baja	Alta
3	Alta	Baja
4	Baja	Baja

Por lo tanto, si la FFSO-LI presenta una rápida o muy rápida liberación-disolución y el principio activo pertenece a la Clase 1 del SCB, se puede solicitar bioexención de Estudios de Bioequivalencia *in vivo* para el establecimiento de equivalencia terapéutica entre el producto farmacéutico en estudio y el producto farmacéutico de referencia. En el año 2006, la OMS extendió la bioexención a los productos formulados con principios activos de la Clase 2 y 3, los cuales deben cumplir con ciertos criterios durante la evaluación⁷.

Sin embargo, la bioexención de una FFSO-LI en base al SCB no solo considera lo mencionado anteriormente, sino que también se debe tener en cuenta otras consideraciones adicionales, como los excipientes utilizados en el producto en estudio, los cuales no deben afectar la velocidad y magnitud de la absorción y la cantidad de excipientes en la FFSO-LI deberá corresponder a la función prevista; fármacos con un amplio margen terapéutico; estabilidad gastrointestinal del principio activo, en el cual una degradación mayor al 5% del fármaco podría sugerir una posible inestabilidad; y formulaciones no diseñadas para ser absorbidas en la cavidad oral⁷⁻¹².

Para que un principio activo se considere altamente soluble, es necesario que la mayor concentración posológica del producto de liberación inmediata objeto de una solicitud de bioexención, sea soluble en 250 mL o menos, en un medio acuoso, a 37°C y con valores de pH comprendidos entre 1 - 6,8⁴⁻⁷.

Un tema relevante al momento de determinar la solubilidad de los principios activos es el polimorfismo, que es la existencia de una sustancia química en dos o más formas cristalinas, ya sea como polimorfos, solvatos y formas amorfas. Estas formas cristalinas presentan diferentes propiedades físicas y químicas y, como consecuencia, diferencias en sus propiedades biofarmacéuticas. Por lo tanto, además de determinar la solubilidad de un principio activo utilizado en la elaboración de un medicamento candidato a bioexención, se deben realizar controles adecuados que permitan caracterizar completamente la materia prima empleada en su fabricación, mediante la determinación

del tamaño de partícula, el hábito cristalino (morfología de la partícula) y los posibles polimorfos⁷⁻¹³.

Por otra parte y, ante la ausencia de evidencia que sugiera inestabilidad en el sistema gastrointestinal, se considera que un principio activo es altamente permeable cuando se establece que la fracción absorbida de la dosis administrada en seres humanos es del 90% o más, basándose en una determinación de balance de masa o en la comparación con una dosis de referencia intravenosa⁷⁻⁹.

En cuanto a la disolución de una FFSO-LI, se considera que es de muy rápida liberación-disolución cuando no menos del 85% de la dosis del principio activo se disuelve a los 15 minutos o menos, empleando el Aparato I USP (canastillo) a 100 rpm o el Aparato II USP (paleta) a 75 rpm, en un volumen de 900 mL o menos y en cada uno de los siguientes medios: solución ácido clorhídrico (HCl) 0,1 N pH 1,2; solución amortiguadora de acetato pH 4,5; y solución amortiguadora de fosfato pH 6,8. Y se considera que es de rápida liberación-disolución, cuando no menos del 85% de la dosis del principio activo se disuelve dentro de 30 minutos⁴⁻⁷.

Para comparar el producto en estudio con el producto de referencia, se debe confrontar los perfiles cinéticos de liberación-disolución mediante un método independiente, denominado factor de similitud (f_2), según la siguiente fórmula⁴⁻⁷⁻⁹:

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

Donde, f_2 es el factor de similitud, log es el logaritmo en base 10, n es el número de tiempos de muestreo, R_t es el porcentaje disuelto promedio en el tiempo t del producto de referencia y T_t es el porcentaje disuelto promedio en el tiempo t del producto en estudio. f_2 es una manera sencilla de comparar los perfiles de disolución y corresponde a una medida de la semejanza en el porcentaje (%) de disolución entre dos curvas. De esta

manera, dos perfiles se consideran similares cuando el valor f_2 es igual o mayor a 50, debido a que refleja la equivalencia de las dos curvas y, por lo tanto, la bioequivalencia entre los productos. Para permitir el uso de datos promedio, el coeficiente de variación porcentual (%CV) no deberá ser más del 20% para los puntos antes del 85% de la cantidad declarada disuelta y no más del 10% para los puntos posteriores al 85% de la cantidad declarada disuelta. Es importante destacar, que si el producto de referencia y el producto en estudio se disuelven en un 85% o más de la cantidad declarada a los 15 minutos o menos, utilizando los tres medios de disolución descritos, no es necesaria la comparación con una prueba f_2 ⁴⁻⁷⁻⁹.

Para llevar a cabo el procedimiento descrito anteriormente, se requiere de una previa validación de la metodología analítica, con el fin de establecer experimentalmente que el método seleccionado cumple con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas, mediante la evaluación de características de desempeño, tales como exactitud, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango y robustez¹⁴. La validación de procedimientos analíticos puede involucrar algunas o todas las características de desempeño recién mencionadas y según la International Conference on Harmonisation (ICH) se categorizan por el tipo de método analítico (ver tabla 2)¹⁵.

En la actualidad, existen más de 300 productos farmacéuticos bioequivalentes, dentro de los cuales varios de ellos se establecieron mediante bioexención¹⁶. Para ellos, surgió la iniciativa por parte de la autoridad sanitaria (ANAMED) de crear un “Programa de Fiscalización de la Calidad Biofarmacéutica de Productos Certificados como Bioequivalentes”, a cargo del Subdepartamento de Biofarmacia y Bioequivalencia, cuyo propósito es disponer de un plan de fiscalización que permita verificar el desempeño de los productos farmacéuticos que demostraron equivalencia terapéutica mediante estudio *in vitro* y, cuando sea procedente, tomar medidas regulatorias.

Uno de los productos farmacéuticos que demostró su equivalencia terapéutica mediante un estudio *in vitro* corresponde a una formulación en comprimidos que contiene

alprazolam 0,5 mg de Laboratorio B, cuya bioexención fue aprobada por la autoridad sanitaria en base al SCB. El producto de referencia en este caso es una formulación en comprimidos que contiene alprazolam 0,5 mg de Laboratorios A y el principio activo de ambos productos farmacéuticos (alprazolam) forma parte de la lista de los 39 principios activos que pueden optar a bioexención³.

Tabla 2. Características de desempeño según el tipo de procedimiento analítico

Característica de desempeño	Identificación	Ensayo
		- Disolución (solamente medición) - Contenido/ Potencia
Exactitud	-	+
Precisión (Repetibilidad)	-	+
Precisión (Precisión Intermedia)	-	+*
Selectividad**	+	+
Límite de Detección	-	-
Límite de Cuantificación	-	-
Linealidad	-	+
Rango	-	+

+ Significa que esta característica analítica es normalmente evaluada

- Significa que esta característica no es normalmente evaluada

* En los casos en los que se realiza la reproducibilidad no es necesario realizar la precisión intermedia.

** La falta de selectividad de un procedimiento analítico puede ser compensada por otros procedimientos.

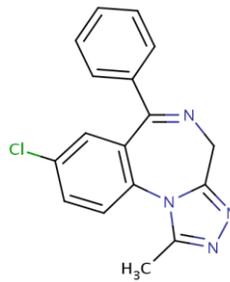


Figura 1. Estructura química de alprazolam¹⁷

Alprazolam es un depresor del Sistema Nervioso Central, que pertenece al grupo farmacológico denominado benzodiazepinas y dentro del mismo se clasifica como una triazolobenzodiazepina de acción intermedia utilizada en el tratamiento de estados de ansiedad, ataques de pánico, depresión y agorafobia¹⁸⁻¹⁹. Posee propiedades ansiolíticas, sedantes, hipnóticas, anticonvulsivantes y miorrelejantes y su acción está mediada a través del neurotransmisor inhibitorio del Sistema Nervioso Central, ácido gamma-aminobutírico (GABA). Alprazolam se une específicamente al lugar regulador del receptor de GABA (receptor GABA_A), distinto del lugar de unión del neurotransmisor, produciendo una modulación alostérica del receptor y, como resultado, un aumento de la afinidad de GABA por su receptor y frecuencia de apertura del canal de cloro, sin modificar la conductancia del mismo ni el tiempo de apertura del canal*,²⁰⁻²¹. Además, presenta propiedades antidepressivas independientes, ya que su estructura (triazolobenzodiazepina) se parece a la de los antidepressivos tricíclicos por el anillo triazol agregado²².

En cuanto a su farmacocinética, más del 90% de alprazolam es absorbido después de su administración por vía oral, alcanzando un nivel plasmático máximo en el curso de 1 a 2 horas. Cerca del 80% de la dosis de alprazolam se une a proteínas plasmáticas. Se metaboliza en el hígado, en el cual los metabolitos predominantes corresponden a alfa-

* El receptor GABA_A se encuentra asociado a un canal de cloruro y al unirse el neurotransmisor inhibitorio GABA se produce una apertura de dicho canal y la entrada de cloruro a la célula. Luego se genera una hiperpolarización de la neurona y, como consecuencia, la célula es menos susceptible a los estímulos activadores, produciendo inhibición neuronal²¹.

hidroxi-alprazolam y una benzofenona (metabolito inactivo). La vida media de alprazolam es de 12 a 15 horas y es eliminado al igual que sus metabolitos principalmente por la orina²³⁻²⁴.

Por otra parte, alprazolam es una sustancia liposoluble, de carácter básico y en condiciones de estrés forzado se observa una fotodegradación²⁵⁻²⁶. Cabe mencionar, que alprazolam sufre una hidrólisis en medio ácido, mediante una reacción reversible de apertura del anillo benzodiazepínico, formando un compuesto derivado de benzofenona (ver figura 2). De esta manera, a pH menor a 2 se encuentra alrededor de un 90% del total de alprazolam en su forma hidrolizada, la cual se revierte totalmente con un pH mayor a 5,5²⁷⁻²⁸.

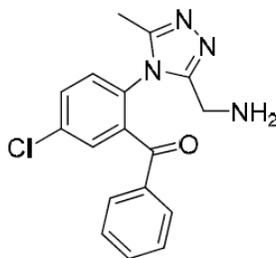


Figura 2. Apertura de anillo de alprazolam²⁸

A continuación, se presenta una tabla que indica el nombre químico, fórmula molecular y propiedades físicas y químicas del principio activo alprazolam según la literatura científica.

Tabla 3. Características y propiedades del principio activo alprazolam

Nombre Químico	8-Cloro-1-metil-6-fenil-4 <i>H</i> -s-triazolo[4,3- α][1,4]benzodiazepina ¹⁴
Fórmula Molecular	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄ ¹⁴
Carácter básico o ácido	Base Débil ²⁹
Peso Molecular	308,76 g/mol ¹⁴
pKa experimental	3,50 ³⁰
pKa teórico	2,4 ²⁹
logP	4,230 ³¹
clogP	2,205 ³¹
Solubilidad	0,1 mg/mL cercano a pH 5,0 y a 25°C ³⁰ . 0,01 mg/mL; solubilidad intrínseca según Tsrlink ³¹ . 40 mg/L, a pH 7; 12 mg/mL, a pH 1,2; según Drugbank ¹⁷ .

Metoprolol es un fármaco clasificado como de alta permeabilidad, ya que el 95% de la dosis administrada por vía oral se absorbe desde el tracto gastrointestinal y, según la Administración Federal de los Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA), se puede emplear como patrón de referencia para determinar la permeabilidad de otros principios activos. De esta manera, fármacos con valores de logP y clogP mayores que los de metoprolol son considerados como de alta permeabilidad⁹⁻³².

Los valores informados en la tabla 3 de logP y clogP para el principio activo alprazolam son superiores a los valores informados de metoprolol (logP 1,720; clogP 1,486³¹). Por lo tanto se puede estimar que el principio activo alprazolam presenta una alta permeabilidad pasiva y puede clasificarse, provisionalmente, como un fármaco de alta permeabilidad.

En el año 2010 Laboratorio B realizó un estudio biofarmacéutico *in vitro*, con el propósito de optar a bioexención de un estudio de bioequivalencia para el producto farmacéutico que contiene alprazolam en comprimidos de 0,5 mg (producto en estudio)

en base al SCB. De esta manera, Laboratorio B efectuó un estudio de solubilidad de la materia prima activa empleada en la elaboración del producto recién mencionado y un estudio cinético de liberación-disolución comparativo entre el producto de referencia (a base de alprazolam en comprimidos de 0,5 mg) de Laboratorio A y el producto en estudio.

Los resultados informados por Laboratorio B permitieron clasificar a la materia prima activa analizada como de alta solubilidad y, según lo mencionado anteriormente respecto a la permeabilidad de alprazolam comparada con la de metoprolol, fue posible clasificar el principio activo alprazolam como de alta permeabilidad. En cuanto a los resultados informados por Laboratorio B respecto a las cinéticas de liberación-disolución en los tres medios establecidos, tanto el producto de referencia como el producto en estudio presentaron una muy rápida liberación-disolución, ya que ambos productos farmacéuticos lograron disolverse en un porcentaje igual o superior al 85% en un tiempo de 15 minutos. De esta manera, se pudo determinar que el producto en estudio de Laboratorio B puede optar a la bioexención y se pudo otorgar la condición de producto equivalente terapéutico respecto al producto de referencia de Laboratorio A.

En base a todo lo mencionado anteriormente, es que este internado forma parte del programa de fiscalización, con el propósito de realizar un seguimiento a la calidad biofarmacéutica de los productos recién nombrados, efectuando un estudio comparativo de cinéticas de liberación-disolución a diferentes valores de pH (pH 1,2 – 4,5 – 6,8) entre el producto de referencia de Laboratorio A y el producto certificado como bioequivalente de Laboratorio B y de esta manera comprobar si presentan una muy rápida liberación-disolución *in vitro* en todo el rango de pH gastrointestinal; y verificando que la materia prima activa (alprazolam) que se utiliza para la elaboración de ambos productos es de alta solubilidad de acuerdo al SCB, ya que es posible encontrar diferencias en cuanto a la solubilidad de una misma materia prima que es elaborada por distintos fabricantes.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la calidad biofarmacéutica del producto de referencia de Laboratorio A y del producto equivalente terapéutico de Laboratorio B, mediante la determinación de perfiles de solubilidad de la materia prima activa alprazolam y determinación de perfiles de disolución comparativos entre ambos productos farmacéuticos, en todo el rango de pH gastrointestinal, de acuerdo a la normativa de bioequivalencia nacional.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adquirir competencias y experiencia en técnicas de laboratorio analítico, específicamente en el manejo de equipos como cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), disolutor y equipo de titulación potenciométrica para perfiles de solubilidad.
- Verificar la alta solubilidad de la materia prima activa alprazolam utilizada por Laboratorio A y Laboratorio B, mediante la determinación de perfiles de solubilidad en función del pH a 37°C, utilizando el equipo semiautomático Gemini Profiler.
- Validar la metodología analítica para el estudio cinético de liberación-disolución comparativo de formas farmacéuticas que contengan el principio activo alprazolam, mediante cromatografía líquida de alta resolución, para demostrar experimentalmente que el método es apto para las aplicaciones analíticas propuestas al entregar resultados confiables y reproducibles.

- Comprobar la característica de liberación-disolución muy rápida tanto del producto de referencia de Laboratorio A como del producto certificado como bioequivalente de Laboratorio B, mediante un estudio cinético de liberación-disolución comparativo entre ambos productos farmacéuticos empleando tres medios de disolución, con tal de abarcar el pH gastrointestinal (1,2 - 6,8).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. SOLUBILIDAD

3.1.1.1. Materiales para ensayo de solubilidad

- ✓ Viales de vidrio 16 mm y 24 mm de diámetro
- ✓ Adaptador para vial de 16 mm
- ✓ Agitadores magnéticos
- ✓ Vasos precipitados para descarte de soluciones

3.1.1.2. Reactivos, Estándares y Muestras

- ✓ Materia prima activa alprazolam Laboratorio B. Lote 80000912009
- ✓ Cloruro de Potasio Merck
- ✓ Ftalato Ácido de Potasio Merck
- ✓ Solución estandarizada Ácido Clorhídrico 0,5 M Winkler
- ✓ Solución estandarizada Hidróxido de Potasio 0,5 M Winkler
- ✓ Solución Buffer pH 7,00 Merck
- ✓ Agua Purificada

3.1.1.3. Equipos e Instrumentos

- ✓ Equipo de Solubilidad pION Gemini Profiler®
- ✓ Software pD. Versión 3.2.0.5 (Análisis de muestra)
- ✓ Software pS. Versión 3.2.0.2 (Análisis de datos)
- ✓ Baño termorregulado con recirculación externa, Jeio Tech, Lab Companion. Modelo CW-05G
- ✓ Balanza Analítica Sartorius. Modelo CP225D
- ✓ Ultrasonido Branson. Modelo 8510
- ✓ Purificador de Agua Millipore. Modelo Synergy UV

3.1.2. VALIDACIÓN DE METODOLOGÍA ANALÍTICA

3.1.2.1. Materiales

- ✓ Matraces volumétricos
- ✓ Matraces volumétricos ámbar
- ✓ Matraz Kitasato o de filtración
- ✓ Embudos de vidrio
- ✓ Pipetas volumétricas
- ✓ Pipetas graduadas
- ✓ Probetas
- ✓ Vasos precipitados
- ✓ Agitadores magnéticos
- ✓ Viales de 1,5 mL
- ✓ Filtro GVWP Millipore 0,22 μm
- ✓ Filtro HA Millipore 0,45 μm
- ✓ Jeringas de vidrio
- ✓ Columna Kromasil C8, 250 mm x 4,6 mm, 5 μm
- ✓ Columna Xterra® RP18, 150 mm x 3,9 mm, 5 μm

3.1.2.2. Reactivos, Estándares y Muestras

- ✓ Materia prima activa alprazolam Laboratorio B. Lote 80000912009
- ✓ Estándar de Referencia USP alprazolam. Lote O0G356
- ✓ Comprimidos 0,5 mg producto de referencia Laboratorio A. Lote C120324
- ✓ Comprimidos 0,5 mg producto bioequivalente Laboratorio B. Lote 1C50
- ✓ Acetato de Sodio Merck
- ✓ Ácido Acético Glacial 100% Merck
- ✓ Ácido Bórico Riedel-De Haen
- ✓ Ácido Clorhídrico Fumante 37% J.T.Baker
- ✓ Ácido Fosfórico 85% Merck

- ✓ Cloruro de Potasio Merck
- ✓ Fosfato Monobásico de Amonio Merck
- ✓ Fosfato Monobásico de Potasio Merck
- ✓ Hidróxido de Sodio Merck
- ✓ Acetonitrilo grado HPLC J.T.Baker
- ✓ Metanol grado HPLC J.T.Baker
- ✓ Agua Purificada

3.1.2.3. Equipos e Instrumentos

- ✓ HPLC Shimadzu Prominence con arreglo de diodos. Modelo 20A
- ✓ Software LCsolution
- ✓ Balanza Analítica Sartorius. Modelo CP225D
- ✓ Balanza Analítica Sartorius. Modelo ED224S
- ✓ Peachímetro Fisher Scientific. Modelo Accumet 15
- ✓ Agitador de matraces con control de temperatura Heidolph. Modelo Promax 2020
- ✓ Ultrasonido Branson. Modelo 8510
- ✓ Purificador de Agua Millipore. Modelo Synergy UV
- ✓ Sistema de Filtración al vacío Millipore
- ✓ Bomba de vacío Welch. Modelo 2037

3.1.3. ESTUDIO CINÉTICO DE LIBERACIÓN-DISOLUCIÓN COMPARATIVO

3.1.3.1. Materiales

- ✓ Micropipeta de 5 mL Eppendorf
- ✓ Matraces volumétricos
- ✓ Matraces volumétricos ámbar
- ✓ Matraz Kitasato o de filtración
- ✓ Embudos de vidrio
- ✓ Pipetas volumétricas

- ✓ Pipetas graduadas
- ✓ Probetas
- ✓ Tubos de ensayo
- ✓ Vasos precipitados
- ✓ Balón de fondo plano de 10 litros
- ✓ Agitadores magnéticos
- ✓ Viales de 1,5 mL
- ✓ Filtro GVWP Millipore 0,22 μm
- ✓ Filtro HA Millipore 0,45 μm
- ✓ Jeringas de vidrio
- ✓ Jeringas de plástico esterilizadas
- ✓ Columna Xterra® RP18, 150 mm x 3,9 mm, 5 μm

3.1.3.2. Reactivos, Estándares y Muestras

- ✓ Materia prima activa alprazolam Laboratorio B. Lote 80000912009
- ✓ Comprimidos 0,5 mg producto de referencia Laboratorio A. Lote C120324
- ✓ Comprimidos 0,5 mg producto bioequivalente Laboratorio B. Lote 1C50
- ✓ Acetato de Sodio Merck
- ✓ Ácido Acético Glacial 100% Merck
- ✓ Ácido Bórico Riedel-De Haen
- ✓ Ácido Clorhídrico Fumante 37% J.T.Baker
- ✓ Ácido Fosfórico 37% Merck
- ✓ Cloruro de Potasio Merck
- ✓ Fosfato Monobásico de Amonio Merck
- ✓ Fosfato Monobásico de Potasio Merck
- ✓ Hidróxido de Sodio Merck
- ✓ Acetonitrilo grado HPLC J.T.Baker
- ✓ Metanol grado HPLC J.T.Baker

- ✓ Agua Purificada

3.1.3.3. Equipos e Instrumentos

- ✓ HPLC Shimadzu Prominence con arreglo de diodos. Modelo 20A
- ✓ Software LCsolution
- ✓ Aparato de disolución USP N°2, Paleta, Erweka. Modelo DT-700
- ✓ Balanza Analítica Sartorius. Modelo CP225D
- ✓ Balanza Analítica Sartorius. Modelo ED224S
- ✓ Peachímetro Fisher Scientific. Modelo Accumet 15
- ✓ Agitador de matraces con control de temperatura Heidolph. Modelo Promax 2020
- ✓ Ultrasonido Branson. Modelo 8510
- ✓ Purificador de Agua Millipore. Modelo Synergy UV
- ✓ Sistema de Filtración al vacío Millipore
- ✓ Bomba de vacío Welch. Modelo 2037
- ✓ Termómetro digital con vástago acero inoxidable VWR
- ✓ Cronómetro digital Thomas Cientific

3.2. METODOLOGÍA

El desarrollo de la metodología utilizada para fiscalizar la calidad biofarmacéutica de los productos comparador y equivalente terapéutico que contienen alprazolam, se basó en las recomendaciones entregadas por el Instituto de Salud Pública de Chile a través de la Guía Técnica G-BIOF 02 denominada “Bioexención de los estudios de Biodisponibilidad/Bioequivalencia para establecer Equivalencia Terapéuticas de Formas Farmacéuticas Sólidas Orales” y en guías desarrolladas por organizaciones normativas-reguladores y recomendaciones para realización de los estudios de Equivalencia Terapéutica, como la OMS, FDA y Agencia Europea de Medicamentos (EMA).

3.2.1. SOLUBILIDAD

Se determinó el perfil de solubilidad en función del pH de la materia prima activa alprazolam, en un medio acuoso a 37°C y en un rango de pH comprendido entre 1,2 – 6,8. Además, esta determinación se llevo a cabo por triplicado y se establecieron condiciones de pH suficientes para definir con precisión el perfil de solubilidad⁷.

Se estableció su clasificación de solubilidad, determinando si es de alta o baja solubilidad. De esta manera, si la mayor dosis es soluble en un volumen de 250 mL o menos de medio acuoso, en un rango de pH comprendido entre 1,2 – 6,8 a 37°C, el principio activo se clasifica como de alta solubilidad⁴⁻⁷.

Las muestras a analizar en un principio eran dos: materia prima activa alprazolam utilizada en la fabricación del producto equivalente terapéutico comprimidos 0,5 mg de Laboratorio B y materia prima activa alprazolam utilizada en la fabricación del producto de referencia comprimidos 0,5 mg Laboratorio A. Sin embargo, no fue posible realizar el estudio de solubilidad a esta última, ya que no estaba disponible para su análisis.

3.2.1.1. Método

Mediante el método potenciométrico, se estableció el pKa experimental y solubilidad intrínseca de la materia prima activa alprazolam, empleando el equipo medidor de solubilidad y pKa, pION Gemini Profiler, a una temperatura de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, siendo la solubilidad intrínseca, la solubilidad en equilibrio de principios activos ionizables, medido a un pH en el cual el fármaco está completamente desionizado o en su forma neutra³³. Este equipo, cuyo procedimiento de ensayo corresponde a una titulación potenciométrica semiautomática, permite realizar tres tipos de análisis, pKa, solubilidad y logP, utilizando un pequeño tamaño de muestra, consumo de reactivos reducido, y efectuando tres titulaciones por muestra, en un rango aproximado de pH de 1,8 - 12,2. Además, los análisis son evaluados estadísticamente mediante un patrón de ajuste denominado “Goodness of fit” (GOF), el cual permite resumir la diferencia existente entre valores experimentales y los de un modelo teórico³⁴.

3.2.1.2. Búsqueda Bibliográfica

Para llevar a cabo este estudio, fue necesario realizar una búsqueda bibliográfica de las propiedades físicas y químicas del principio activo en estudio (alprazolam) cuya información se indica en la tabla 3.

3.2.1.3. Preparación e Instalación de Soluciones

Se prepararon e instalaron en el equipo las siguientes soluciones: soluciones estandarizadas de ácido clorhídrico 0,5 M e hidróxido de potasio (KOH) 0,5 M como titulantes; solución de cloruro de potasio (KCl) 0,15 M como disolvente; y solución buffer pH 7, para calibrar el electrodo al inicio de una determinación³⁴.

3.2.1.4. Verificación del Equipo

Utilizando el Software pD, se procedió a verificar el equipo, mediante un control de calidad del electrodo (EQC) y un control de calidad del titulante (TQC). Ambos ensayos utilizan el patrón de ajuste GOF como método estadístico. De esta manera, se cumple la verificación del equipo, solo si el GOF es menor o igual a 2,0, tanto en EQC como en TQC, quedando el equipo operativo para realizar los análisis correspondientes (pKa, solubilidad, o logP)³⁴.

A. EQC

Corresponde a un ensayo que permite determinar la fuerza del HCl y la respuesta del electrodo al pH. Para llevar a cabo este procedimiento, se seleccionó desde el Software pD la opción "Start New Assay", luego "ELECTRODE QC (E)" y se siguieron las instrucciones que el mismo programa señalaba. Se utilizó un vial de vidrio de 16 mm con su respectivo adaptador y barra de agitación, el cual se introdujo en la unidad de agitación mecánica y una vez colocado el electrodo dentro del vial de vidrio, se dio inicio al ensayo. Al finalizar, se obtuvo el factor de la solución de HCl 0,5 M, la concentración de carbonato, los parámetros del electrodo (α , k_s , j_H , j_{OH}) y el ajuste GOF³⁴.

B. TQC

Corresponde a un ensayo que permite evaluar el estado de la solución de hidróxido de potasio, utilizando como agente titulante ftalato ácido de potasio, cuyo peso es conocido (aproximadamente 45 mg). Para ello, se seleccionó desde el Software pD la opción “Star New Assay”, luego “Titrant QC (T)” y se siguieron las instrucciones que el mismo programa señalaba. El ftalato ácido de potasio se depositó en un vial de vidrio de 16 mm, se agregó la barra de agitación y se colocó la muestra en el dispositivo de agitación magnética. A continuación, se introdujo el electrodo en el vial con la muestra y se dio inicio a la titulación. Una vez terminado el ensayo, se obtuvo el factor de la solución de hidróxido de potasio y el ajuste GOF correspondiente³⁴.

3.2.1.5. Determinación pKa experimental

Inicialmente se pesó 1,10 mg de materia prima en un vial de 16 mm, cantidad adecuada para no generar precipitación durante el ensayo y obtener un pKa real. Posteriormente, se depositó dentro del vial con la muestra el agitador magnético de barra y se accedió al software pD, en donde se ingresó la velocidad a utilizar (13 unidades relativas) y se efectuó una purga y calibración manual. A continuación, se seleccionó el tipo de ensayo (pKa) y medio (medio acuoso) y de manera automática el equipo solicitó el ingreso de información sobre la molécula en estudio y condiciones del ensayo para construir del modelo experimental (ver tabla 4)³⁴.

En seguida, se abrió la llave de argón, el cual atrapa las moléculas de Dióxido de Carbono (CO₂) del aire para evitar que éstas interfieran en el análisis y se colocó el vial con la muestra en el dispositivo de agitación magnética, comenzando así el ensayo de determinación de pKa, mediante 3 titulaciones potenciométricas. Concluido el ensayo, se accedió al software pS y se revisó cada titulación de forma independiente. De esta manera, se inspeccionó el modelo experimental creado, se adicionó carbonato para eliminar el CO₂ restante de los reactivos y se refinaron los factores implicados en el análisis (reconciliación, bases y constantes de ionización) para obtener el ajuste GOF

correspondiente. A continuación, se integraron los tres archivos resultantes de las tres titulaciones, obteniéndose un documento que indica el pKa experimental de Alprazolam con su respectivo ajuste GOF y la gráfica de Bjerrum proveniente de la integración³⁴.

Tabla 4. Determinación pKa: construcción modelo experimental

Especie	Base débil
Fórmula del compuesto (base débil)	B
Equilibrios	$B + H^+ = BH$ (Constante de acidez)
Peso molecular	308,76 g/mol
pKa estimado	3,50
Peso de la muestra	0,0011 g
Rango de titulación efectiva	pH 1,8 – 9,0, titulado en dirección ácido a base
Incremento de pH del electrodo	0,20
Temperatura del ensayo	$37 \pm 0,5^\circ\text{C}$

Criterios de Aceptación

El ajuste GOF no debe ser mayor a 10^{34} .

3.2.1.6. Determinación Solubilidad Intrínseca

Para determinar la solubilidad intrínseca del principio activo en estudio, fue necesario llevar la muestra de un estado precipitado a solubilizado. De esta manera, la cantidad pesada fue superior a la utilizada en el ensayo anterior (3,61 mg en un vial de 16 mm) y la dirección de titulación fue de base a ácido, incluyendo en el rango de titulación el pH al cual se determinó el pKa. Esta dirección se determinó mediante un análisis del comportamiento de la molécula alprazolam, en donde al ser una molécula básica, en medio básico se presenta en su forma neutra, mientras que en medio ácido se presenta en su forma ionizada³⁴.

Una vez pesada la materia prima, se accedió al software pD, se ingresó la velocidad (13 unidades relativas) y se realizó una purga y calibración manual. A continuación, se ingresó el tipo de ensayo (solubilidad) y medio (medio acuoso) y del mismo modo que en el procedimiento anterior, el equipo de manera automática solicitó el ingreso de información sobre la molécula en estudio y condiciones del ensayo para construir el modelo experimental (ver tabla 5)³⁴.

Tabla 5. Determinación Solubilidad Intrínseca: construcción modelo experimental

Especie	Base débil
Fórmula del compuesto (base débil)	B
Equilibrios	B + H ⁺ = BH (Constante de acidez) B = B# (Solubilidad Intrínseca)
Peso molecular	308,76 g/mol
pKa experimental	pKa obtenido en el ensayo anterior
logP estimado (opcional)	-
Solubilidad intrínseca estimada	125 µg/mL
Peso de la muestra	0,00361 g
Rango de titulación efectiva	pH 1,8 – 9,0, titulado en dirección base a ácido
Incremento de pH del electrodo	0,25
Temperatura del ensayo	37 ± 0,5°C

Luego, se abrió la llave de argón, se colocó el vial con la muestra en el dispositivo de agitación magnética y se dio inicio al ensayo de solubilidad, consistente en 3 titulaciones potenciométricas. Al finalizar, se accedió al software pS, en donde se revisó el modelo creado, se adicionó carbonato y se refinaron los factores implicados en el análisis, obteniendo la solubilidad intrínseca de cada una de las titulaciones con su ajuste GOF correspondiente. En seguida, se integraron los tres archivos resultantes de las tres

titulaciones, obteniéndose un documento que indica la solubilidad intrínseca del principio activo alprazolam con su respectivo ajuste GOF y la gráfica de Bjerrum proveniente de la integración³⁴.

Criterio de Aceptación

El ajuste GOF no debe ser mayor a 10^{34} .

3.2.1.7. Perfil de Solubilidad y Determinación Solubilidad Mínima

El Software pS proporciona un gráfico de solubilidad (mg/mL) en función del pH y un archivo Excel por cada titulación efectuada, el cual contiene información respecto de la solubilidad medida a un determinado pH. De esta manera, empleando la información de las tres titulaciones, se elaboraron dos gráficas de perfiles de solubilidad ($\mu\text{g/mL}$) en función del pH. La primera gráfica elaborada consistió en señalar la solubilidad en todo el rango de pH analizado (9,0 – 1,8), mientras que la otra gráfica consistió en un perfil de solubilidad en función del pH empleando un rango solubilidad estrecho, cercano a la solubilidad intrínseca reportada, con el fin de apreciar el pH en el cual se determinó la solubilidad intrínseca de la materia prima. Además, se estableció el promedio de las tres solubilidades mínimas de la materia prima activa alprazolam en el rango de pH de interés fisiológico, vale decir, entre 1,2 – 6,8.

3.2.1.8. Cálculo Número de Dosis

Se determinó la clasificación de solubilidad del principio activo, utilizando un parámetro denominado Número de Dosis (D_o), que relaciona la dosis y cantidad de fármaco que se disuelve en 250 mL de medio acuoso, en un rango de pH comprendido entre 1,2 – 6,8 a 37°C. De esta manera, empleando la siguiente ecuación, se obtuvo el $D_o^{4-10-35}$.

$$D_o = \frac{M_o/V_o}{S_o}$$

Donde, D_o es el número de dosis, M_o es la dosis máxima (mg), V_o es el volumen de administración (mL) y S_o corresponde a la solubilidad mínima (mg/mL) en un rango de pH comprendido entre 1,2 – 6,8.

La dosis máxima empleada para determinar el D_o fue de 1 mg, que corresponde a la mayor dosis de principio activo Alprazolam en FFSO-LI registrada en el país; y el volumen de administración utilizado fue de 250 mL³⁶.

Una vez obtenido el Número de Dosis, se clasificó la materia prima activa alprazolam de Laboratorio B como de alta o baja solubilidad (D_o igual o menor a 1, alta solubilidad; D_o mayor a 1, baja solubilidad)³⁷.

3.2.1.9. Evaluación de Resultados

La materia prima activa alprazolam, utilizada en la elaboración del producto certificado como bioequivalente comprimidos 0,5 mg de Laboratorio B, debe presentar una alta solubilidad de acuerdo al SCB. Si no se cumple con lo mencionado anteriormente, se procederá a tomar medidas regulatorias adecuadas según el caso.

3.2.2. VALIDACIÓN DE METODOLOGÍA ANALÍTICA

Se efectuó en primera instancia la valoración de la materia prima activa alprazolam de Laboratorio B, para posteriormente utilizarla como estándar secundario en la validación de la metodología analítica del estudio cinético de liberación-disolución comparativo de alprazolam en comprimidos de 0,5 mg. El equipo HPLC Shimadzu Prominence modelo 20A, utilizado en ambos ensayos, se encontraba previamente verificado, cuyo documento de registro de verificación corresponde al anexo N° 1.

3.2.2.1. VALORACIÓN MATERIA PRIMA ALPRAZOLAM

3.2.2.1.1. Método

Valoración de la materia prima activa alprazolam de Laboratorio B, contra un estándar de referencia USP alprazolam, mediante cromatografía líquida de alta resolución,

utilizando un método analítico previamente validado por personal profesional del Subdepartamento Laboratorio Nacional de Control. El certificado de análisis correspondiente al estándar USP alprazolam se presenta en el anexo N° 2.

3.2.2.1.2. Condiciones Cromatográficas

A continuación, se presenta una tabla con las condiciones cromatográficas de la metodología analítica para valorar la materia prima activa alprazolam.

Tabla 6. Condiciones cromatográficas valoración materia prima activa alprazolam

Columna	Kromasil C8, longitud 250 mm, diámetro interno 4,6 mm, tamaño de partícula 5 µm
Detector / longitud de onda	Ultravioleta (UV) / 254 nm
Velocidad de flujo	1,5 mL/min
Volumen de inyección	20 µL
Tiempo de corrida cromatograma	10 minutos
Temperatura del horno	30°C
Diluyente	Acetonitrilo
Fase móvil	Acetonitrilo (70%) : Agua purificada (30%)

3.2.2.1.3. Preparación Fase Móvil y Diluyente

A. Fase Móvil

Preparada automáticamente por el equipo (HPLC), mezclando 70 partes de acetonitrilo desde el canal A y 30 partes de agua purificada desde el canal C.

B. Diluyente

Acetonitrilo calidad HPLC.

3.2.2.1.4. Preparación Estándar, Muestra y Blanco

A. Preparación Estándar Trabajo y Control

Se pesó una cantidad aproximada de 12,5 mg de estándar de referencia USP alprazolam en duplicado. Una pesada corresponde al estándar trabajo, mientras que la otra pesada corresponde el estándar control. Posteriormente, se transfirió cada estándar a su respectivo matraz volumétrico de 50 mL, se agregó 30 mL de diluyente, se sonicó por 7 min y se enfrió a temperatura ambiente. Se completó el volumen con acetonitrilo y se homogenizó. A continuación, se tomó una alícuota de 2 mL de la solución previamente elaborada y se llevo a un matraz volumétrico de 25 mL. Se agregó aproximadamente 15 mL de acetonitrilo y una alícuota de 2 mL de agua purificada, se completó el volumen con diluyente y se homogenizó. Finalmente, se filtró la solución con jeringa y filtro con tamaño de poro de 0,22 μm , obteniendo una concentración de trabajo aproximada de 0,02 mg/mL.

B. Preparación Muestra

La muestra correspondiente a la materia prima activa alprazolam de Laboratorio B, fue preparada según el procedimiento descrito anteriormente, "Preparación de Estándar Trabajo y Control", con la una única diferencia, que se peso en triplicado, obteniendo tres soluciones de muestra A, B y C.

C. Preparación Blanco

En un matraz de 25 mL se agregó una alícuota de 2 mL de agua purificada, se completo el volumen con diluyente, se homogenizo y se filtró con jeringa y filtro con tamaño de poro de 0,22 μm .

3.2.2.1.5. Análisis de Muestra

Las tres soluciones de muestra (A, B y C), solución estándar trabajo, solución estándar control y el blanco correspondiente, se inyectaron en el HPLC. El esquema general de inyecciones utilizado en este estudio, se detalla en el anexo N° 3.

3.2.2.1.6. Evaluación de Resultados

Una vez obtenidos los resultados de este análisis, se efectuaron ciertos Test, según si se trata de un blanco, un estándar, o una muestra (ver anexo N° 3).

A. Blanco

- **Evaluación Carry Over**

Se observó si la señal del blanco interfiere en el análisis, evaluando el área de cada lectura.

Criterios de aceptación

Se cumple el test, sólo si en cada lectura el área es igual a 0.

B. Estándar Trabajo y Control

- **Test de Aptitud del Sistema**

Se verificó el cumplimiento de los siguientes requerimientos cromatográficos: factor de simetría (A_s)², el cual se determina en cada lectura; número de platos teóricos (N), el cual se determina en cada lectura; y coeficiente de variación porcentual, el cual se determina en inyecciones repetidas¹⁴.

Criterios de aceptación

El factor de simetría no debe ser mayor a 2. El %CV no debe ser mayor al 2,0%. El número de platos teóricos debe ser mayor o igual a 500¹⁴.

- **Variación del Factor de Respuesta**

En cada lectura del estándar trabajo y estándar control se calculó el factor de respuesta (FR), según la siguiente fórmula:

$$FR = \frac{a_s}{c_s}$$

Donde, a_s es el área obtenida del estándar trabajo o estándar control, c_s es la concentración del estándar trabajo o estándar control (mg/mL) y FR es el factor de respuesta del estándar trabajo o estándar control.

Luego, con estos valores se determinó la variación del factor de respuesta (V_{FR}), calculando la diferencia entre el promedio de los FR del estándar trabajo y el promedio de los FR del estándar control, según la siguiente fórmula:

$$V_{FR} = \frac{|(FR_{TS} - FR_{CS})| \times 100}{FR_{TS}}$$

Donde, FR_{TS} es el factor de respuesta promedio de la solución estándar trabajo, FR_{CS} es el factor de respuesta promedio de la solución estándar control y V_{FR} es la variación del factor de respuesta (%).

Criterio de aceptación

La variación del factor de respuesta no debe exceder el 2%.

C. Muestra

• Determinación Concentración de Muestra

Se calcularon los miligramos (mg) de principio activo alprazolam que contiene cada muestra (muestra A, B, y C), según la siguiente fórmula:

$$\text{mg P. A.} = \frac{A_m \times C_{st} \times FD \times PM_b}{A_{st} \times PM_s}$$

Donde, mg P.A. son los miligramos de principio activo, A_m es el área de la muestra, A_{st} es el área del estándar trabajo, C_{st} es la concentración del estándar trabajo (mg/mL), FD es el factor de dilución (mL), PM_b es el peso molecular de la base (g/mol) y PM_s es el peso molecular de la sal (g/mol).

A partir de los mg encontrados, se determinó el porcentaje de principio activo alprazolam presente en cada muestra, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ P. A.} = \frac{\text{mg P. A.} \times 100}{\text{Pm}}$$

Donde, % P.A. es el porcentaje de principio activo, mg P.A son los miligramos de principio activo y Pm es el peso de la muestra (mg).

Enseguida, se determinó el valor promedio del porcentaje de alprazolam de las tres muestras (A, B, y C), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación porcentual y el intervalo de confianza (IC) al 95% con n-1 grados de libertad.

Criterios de Aceptación

Materia prima activa alprazolam de Laboratorio B, debe contener un porcentaje de pureza entre 98,0 – 102,0% de $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClN}_4$. El coeficiente de variación porcentual no debe exceder el 2%¹⁴.

3.2.2.2. VALIDACIÓN DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA ESTUDIO CINÉTICO DE LIBERACIÓN-DISOLUCIÓN COMPARATIVO

La validación de un método analítico es el proceso que establece mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. Las características de desempeño evaluadas en la validación fueron selectividad, linealidad, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), exactitud (recuperación), rango y estabilidad⁷⁻¹⁴.

3.2.2.2.1. Método

Validación de metodología analítica para el estudio cinético de liberación-disolución comparativo de formas farmacéuticas sólidas de liberación convencional que contengan el principio activo alprazolam en dosis de 0,5 mg, utilizando un método de

análisis por HPLC, basado en una modificación realizada al método propuesto por Kazemifard *et al.* 2008³⁸.

Las modificaciones realizadas al método propuesto fueron cambio de columna, reemplazando la columna Perfectsil Target ODS-3 (longitud 125 mm, diámetro interno 4mm, tamaño de partícula 5 μ m) por una de similares condiciones; disminución de la velocidad de flujo y aumento de la temperatura del horno, debido a un significativo aumento de presión; aumento en el volumen de inyección; y modificación de la fase móvil, la cual según la publicación, consiste en mezclar 50 partes de una solución de fosfato monobásico de amonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) 0,05 M con 50 partes de metanol, ajustando la solución resultante a un pH cercano a 5,8 con una solución concentrada de amonio (ver punto 3.2.2.2.3. para observar los cambios efectuados en la fase móvil)³⁸.

3.2.2.2.2. Condiciones Cromatográficas

Las condiciones cromatográficas de la metodología analítica del estudio de liberación-disolución *in vitro*, se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Condiciones cromatográficas estudio de liberación-disolución *in vitro*

Columna	Xterra® RP18, longitud 150 mm, diámetro interno 3,9 mm, tamaño de partícula 5 μ m
Detector / longitud de onda	Ultravioleta (UV) / 254 nm
Velocidad de flujo	1,2 mL/min
Volumen de inyección	200 μ L
Tiempo de corrida cromatograma	10 minutos
Temperatura del horno	30°C
Fase móvil (pH 1,2)	Solución $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,05 M (55%) : Metanol (45%)
Fase móvil (pH 4,5 - 6,8)	Solución $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,05 M (50%) : Metanol (50%)

3.2.2.2.3. Preparación Fase Móvil

A. Solución Fosfato Monobásico de Amonio 0,05 M

Se pesó una cantidad aproximada a 5,75 mg de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ y se transfirió a un matraz volumétrico de 1 L. Se adicionó un volumen de 600 mL de agua purificada, se sonicó por 10 minutos y se enfrió a temperatura ambiente. Se completó el volumen con agua purificada, se homogenizó y se filtró al vacío utilizando un filtro con un tamaño de poro de 0,45 μm .

B. pH 1,2

Preparada automáticamente por el equipo (HPLC), mezclando 55 partes de solución $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,05 M desde el canal D y 45 partes de metanol desde el canal B.

C. pH 4,5 y pH 6,8

Preparada automáticamente por el equipo (HPLC), mezclando 50 partes de solución $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,05 M desde el canal D y 50 partes de metanol desde el canal B.

3.2.2.2.4. Preparación Soluciones

A. Preparación Medios de Disolución

A continuación se detalla la preparación de los medios de disolución utilizados tanto en la validación de la metodología analítica como en el estudio cinético de liberación-disolución comparativo.

- **Solución HCl 0,1 N pH 1,2**

Se adicionó un volumen de 250 mL de solución de KCl 0,2 M y 425 mL de solución de HCl 0,2 M en un matraz volumétrico de 1 L. Se completó el volumen con agua purificada y se homogenizó. Finalmente se midió y se ajustó el pH, utilizando una solución de ajuste de pH¹⁴.

- **Solución Amortiguadora de Acetato pH 4,5**

Se adicionó una cantidad aproximada de 2,99 g de acetato de sodio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) y 14 mL de solución de ácido acético 2 N, en un matraz volumétrico de 1 L. Se agregó un volumen de 600 mL de agua purificada, se sónico por 10 minutos y se enfrió a temperatura ambiente. Se completó el volumen con agua purificada y se homogenizó. Finalmente se midió y se ajustó el pH, utilizando una solución de ajuste de pH¹⁴.

- **Solución Amortiguadora de Fosfato pH 6,8**

Se adicionó un volumen de 250 mL de solución de fosfato monobásico de potasio 0,2 M y 112 mL de solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0,2 M, en un matraz volumétrico de 1 L. Se completó el volumen con agua purificada y se homogenizó. Finalmente se midió y se ajustó el pH, utilizando una solución de ajuste de pH¹⁴.

B. Preparación Soluciones Amortiguadoras de Neutralización

Como se explicó anteriormente, alprazolam sufre una reacción de apertura del anillo benzodiazepínico en una solución ácida, la cual es reversible si esta solución es neutralizada²⁷. Es por ello que fue necesario neutralizar la solución HCl 0,1 N (pH 1,2) y la solución amortiguadora de Acetato (pH 4,5), con una solución amortiguadora de Fosfato (pH 8,0) y una solución amortiguadora alcalina de borato (pH 8,7), respectivamente.

- **Solución Amortiguadora de Fosfato pH 8,0**

Se adicionó un volumen de 250 mL de solución de fosfato monobásico de potasio 0,2 M y 230,5 mL de solución de hidróxido de sodio 0,2 M, en un matraz volumétrico de 1 L. Se completó el volumen con agua purificada y se homogenizó. Finalmente se midió y se ajustó el pH, utilizando una solución de ajuste de pH¹⁴.

- **Solución Amortiguadora Alcalina de Borato pH 8,7**

Se adicionó un volumen de 250 mL de solución de ácido bórico y cloruro de potasio 0,2 M y 68 mL de solución de hidróxido de sodio 0,2 M, en un matraz volumétrico de 1 L.

Se completó el volumen con agua purificada y se homogenizó. Finalmente se midió y se ajustó el pH, utilizando una solución de ajuste de pH¹⁴.

C. Soluciones de Ajuste de pH

Se ajustó el pH de los medios de disolución y soluciones amortiguadoras de neutralización con las siguientes soluciones:

- **Solución Hidróxido de sodio 2 M (Aumento de pH)¹⁴**

Se adicionó una cantidad cercana a 40 g de NaOH en un matraz de 500 ml. Se agregó un volumen de 250 mL de agua purificada, se sonicó por 10 minutos y se enfrió a temperatura ambiente. Se completó el volumen con agua purificada y se homogenizó.

- **Solución Ácido fosfórico al 85% (Disminución de pH)¹⁴**

3.2.2.2.5. Preparación Muestra y Blanco

A. Preparación de Muestra

El procedimiento de preparación de muestra, según el parámetro de validación, se detalla en el anexo N° 4.

A continuación, se menciona la concentración de trabajo de alprazolam para cada medio de disolución:

- Solución HCl 0,1 N PH 1,2 : 0,0003 mg/mL
- Solución amortiguadora de acetato pH 4,5 : 0,0003 mg/mL
- Solución amortiguadora de fosfato pH 6,8 : 0,001 mg/mL

B. Preparación Blanco pH 1,2

Se adicionó una alícuota de 3 mL de solución HCl 0,1 N pH 1,2, en un matraz de 10 mL. Se completó el volumen con solución amortiguadora de fosfato pH 8,0, se homogenizo y se filtró con jeringa y filtro con tamaño de poro de 0,22 µm.

C. Preparación Blanco pH 4,5

Se adicionó una alícuota de 3 mL de solución amortiguadora de acetato pH 4,5, en un matraz de 10 mL. Se completó el volumen con solución amortiguadora alcalina de borato pH 8,7, se homogenizó y se filtró con jeringa y filtro con tamaño de poro de 0,22 μm .

D. Preparación Blanco pH 6,8

La solución amortiguadora de fosfato pH 6,8 se filtró con jeringa y filtro con tamaño de poro de 0,22 μm .

3.2.2.2.6. Características de Desempeño**A. Selectividad**

Este parámetro se refiere a la capacidad que presenta un método analítico de medir y/o identificar simultánea o separadamente los analitos de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra¹⁵.

La selectividad se efectuó de manera independiente para cada medio de disolución (pH 1,2 – 4,5 – 6,8), realizando lecturas del blanco (ver punto 3.2.2.2.7.), blanco con una gota de detergente, estándar secundario de alprazolam a la concentración de trabajo, muestra producto de referencia (comprimidos 0,5 mg de alprazolam) y muestra producto bioequivalente (comprimidos 0,5 mg de alprazolam). Se inyectó una vez cada solución y se determinó el tiempo de retención (t_R) y área de cada muestra, contrastándola con la señal del estándar.

Criterios de aceptación

Demostrar que el peak cromatográfico del analito no puede atribuirse a más que un solo componente y de esta manera confirmar que el método es capaz de cuantificar a la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes⁷⁻³⁹.

B. Linealidad

Es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, dentro de un rango establecido¹⁵. Este parámetro se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos en el análisis del analito a diferentes cantidades o concentraciones. Además, la selección del rango y número de puntos experimentales está estrictamente relacionada con la aplicación del método⁴⁰.

La linealidad se efectuó de manera independiente para cada medio de disolución (pH 1,2 – 4,5 – 6,8), en donde se elaboró una curva de calibración con seis puntos, incluyendo el 100%. De esta manera, se prepararon y midieron seis soluciones de estándar secundario alprazolam, que contenían aproximadamente el 40%, 60%, 80%, 100%, 120% y 140% de la concentración de trabajo, cada una elaborada a partir de pesadas independientes, las cuales fueron inyectadas por sextuplicado en el HPLC.

Los resultados se evaluaron mediante un gráfico de señales en función de la concentración del analito y mediante métodos estadísticos adecuados, como el cálculo de una línea de regresión por el método de los mínimos cuadrados¹⁴.

Criterios de aceptación

Se debe efectuar una inspección visual del gráfico de concentración del analito versus la señal entregada por el equipo. El %CV de cada nivel debe ser menor o igual al 2%. El %CV del factor de respuesta de todos los puntos de la curva de calibración debe ser menor o igual al 5%; si el %CV del factor de respuesta es superior al 5% indica falta de linealidad. El coeficiente de determinación (r^2) debe ser mayor o igual que 0,995. En el caso que r^2 sea menor que 0,995, se aplica el test estadístico t de Student, en el cual t experimental debe ser mayor a t de tabla para rechazar la hipótesis nula y concluir que existe correlación entre X e Y. El intervalo de confianza al 95% del intercepto del eje “y” debe incluir el cero.

C. Precisión

Es el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea bajo condiciones prescritas. Este parámetro se expresa habitualmente como la varianza (S^2), desviación estándar y coeficiente de variación porcentual; e incluye tres tipos de estudio: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. La repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un periodo corto de tiempo (misma muestra, mismo analista, mismo laboratorio, mismos equipos y reactivos y mismo día); la precisión intermedia expresa la variación dentro de un laboratorio (diferentes días, diferentes analistas, o diferentes equipos); y la reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios (estudio en colaboración)¹⁵.

La precisión se efectuó de manera independiente para cada medio de disolución (pH 1,2 – 4,5 – 6,8) y se determinó tanto la repetibilidad como la precisión intermedia.

- **Repetibilidad**

Se prepararon tres soluciones de estándar secundario de alprazolam con cantidades equivalentes al 60% (nivel 1), 100% (nivel 2) y 120% (nivel 3) de la concentración de trabajo de alprazolam, con pesadas independientes cada una. Los tres niveles de concentración se procesaron el mismo día de la preparación y cada uno fue inyectado por sextuplicado en el HPLC. A continuación, los resultados obtenidos se evaluaron mediante el coeficiente de variación porcentual.

Criterios de aceptación

El %CV de cada nivel debe ser menor o igual al 2%⁷.

- **Precisión Intermedia**

La precisión intermedia se realizó al día siguiente de haber efectuado el estudio de repetibilidad. Se prepararon tres soluciones estándar, cada una con pesada independiente, logrando las mismas concentraciones de la repetibilidad y bajo las mismas

condiciones operativas. Cada solución estándar fue inyectada por sextuplicado en el HPLC. Posteriormente, los resultados obtenidos se evaluaron mediante el coeficiente de variación porcentual y el Test Comparación de Medias. Este último consiste en realizar una comparación de dos varianzas, σ_1 y σ_2 , estimadas por S_1^2 y S_2^2 , mediante el test de Fisher (F) a dos colas; determinar la varianza común ($S_{común}^2$), mediante el cálculo de la varianza conjunta; y efectuar la comparación de medias, mediante el test t de Student para varianzas iguales y test de Cochran para varianzas distintas¹⁴⁻⁴¹.

Criterios de aceptación

El %CV de cada nivel debe ser menor o igual al 2%. En comparación de varianza, el valor F calculado debe compararse con el valor F crítico de tabla; si F calculado es menor o igual que F crítico las varianzas son iguales y si F calculado es mayor que F crítico las varianzas son distintas. Sólo si ambas varianzas son iguales, se calcula la varianza común. Las medias son comparables si al aplicar el test t de Student, el t experimental es menor o igual que t de tabla; y en el caso del test de Cochran, si t experimental es menor o igual que $|t^*|$.

D. Exactitud

Corresponde a la cercanía entre el valor obtenido en el análisis y el valor que es aceptado como verdadero¹⁵.

La exactitud se realizó de manera independiente para cada medio de disolución (pH 1,2 – 4,5 – 6,8), utilizando el método de adición patrón. Para ello, se preparó una solución estándar cercana al 100% de la concentración de trabajo y se inyectó por quintuplicado en el HPLC. Luego, se preparó un blanco madre con 1 comprimido de producto de referencia y 1 comprimido de producto bioequivalente y de esta solución se tomó una alícuota para preparar un blanco de trabajo con una concentración cercana al límite inferior de la curva de calibración. La solución blanco de trabajo se inyectó por triplicado en el HPLC. A continuación, se prepararon tres niveles de concentración, dentro

del rango de linealidad establecido (65%, 95% y 120% de la concentración de trabajo), adicionando alícuotas iguales de la solución blanco madre y agregando alícuotas distintas de una solución estándar alprazolam. Cada nivel se inyectó por triplicado en el HPLC¹⁵⁻⁴².

El resultado se informó como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra, según la siguiente fórmula¹⁵:

$$\% R = \frac{X_m}{\mu} \times 100$$

Donde, % R es el porcentaje de recuperación, X_m es el valor medio obtenido y μ es el valor verdadero. Además, se efectuó un test t de Student, para comparar el valor medio obtenido contra el valor teórico; se elaboró un gráfico de concentración de estándar agregado en función de la concentración de estándar encontrado; y se determinó la ecuación de la línea de regresión y sus estimadores, mediante el método de los mínimos cuadrados.

Criterios de aceptación

El porcentaje de recuperación de cada lectura realizada debe estar dentro del rango de 96 – 104%. Tanto el porcentaje de recuperación promedio de cada nivel, como el promedio de los 3 niveles, debe estar dentro del rango de 98 – 102%. Los valores son comparables si aplicando el test t de Student, el valor de t experimental es menor que el valor tabulado de t . El coeficiente de regresión (r) debe ser mayor o igual que 0,995, el coeficiente de determinación debe ser mayor o igual que 0,995 y la pendiente debe ser mayor o igual que 0,95.

E. Rango

Se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método

descrito. De esta manera, el rango se estableció una vez terminados los parámetros de linealidad, precisión y exactitud¹⁴.

F. Estabilidad

Aunque la estabilidad no forma parte de las características analíticas típicas utilizadas para la validación de métodos, es imprescindible demostrar y asegurar la estabilidad de la solución estándar y de las muestras hasta el momento de su análisis⁷⁻¹⁴⁻¹⁵. Sin embargo, en este estudio no se determinó la estabilidad de las muestras, sino que se realizó un estudio de estabilidad de la solución estándar secundario de alprazolam.

La estabilidad se realizó de manera independiente para cada medio de disolución (pH 1,2 – 4,5 – 6,8), en que se preparó una solución estándar cercana al 100% de la concentración de trabajo, efectuando cinco lecturas por día (realizando lecturas de lunes a miércoles). La solución fue almacenada en refrigeración (2 – 8°C) y previo a su análisis, se esperó a que alcanzara la temperatura ambiente para su uso.

Los resultados se evaluaron mediante el coeficiente de variación porcentual.

Criterios de aceptación

El %CV de las cinco lecturas de cada día no debe exceder el 2%. El %CV de las lecturas del día uno, en conjunto con las lecturas realizadas el día dos, debe ser menor o igual al 2%. El %CV de las lecturas del día uno, en conjunto con las lecturas del día tres, debe ser menor o igual al 2%.

3.2.3. ESTUDIO CINÉTICO DE LIBERACIÓN-DISOLUCIÓN COMPARATIVO

Se compararon los productos farmacéuticos de referencia (comprimidos 0,5 mg de alprazolam) de Laboratorio A y equivalente terapéutico (comprimidos 0,5 mg de alprazolam) de Laboratorio B, mediante la elaboración de perfiles cinéticos de liberación-disolución en los tres medios de disolución recomendados (solución HCl 0,1 N pH 1,2; solución amortiguadora de acetato pH 4,5; y solución amortiguadora de fosfato pH 6,8)⁷.

De esta manera, este estudio se realizó sobre un lote del producto de referencia y un lote del producto bioequivalente, utilizando 12 unidades de cada lote y empleando un tiempo de muestreo suficiente para caracterizar completamente el perfil de liberación-disolución del producto farmacéutico, en un medio correspondiente⁷⁻⁹.

El equipo de disolución utilizado en este ensayo fue verificado por profesional del Subdepartamento Laboratorio Nacional de Control, cuyo documento de registro de verificación física y química corresponde al anexo N° 5. Por otra parte, el equipo HPLC utilizado en el análisis de las muestras extraídas de los estudios de liberación-disolución, también se encontraba verificado, cuyo documento de registro de verificación corresponde al anexo N° 1. Por último, la metodología analítica empleada en este estudio, se encontraba previamente validada (ver punto 3.2.2.2.).

3.2.3.1. Método

Estudio cinético de liberación-disolución comparativo de formas farmacéuticas sólidas orales de liberación inmediata que contienen alprazolam 0,5 mg, mediante la generación de perfiles cinéticos de disolución, empleando el aparato de paleta (aparato II USP) a 75 r.p.m. en un medio correspondiente y utilizando la técnica cromatografía líquida de alta resolución para el análisis de las muestras⁷.

3.2.3.2. Descripción de Muestras

En la tabla 8 se presenta la descripción de los productos farmacéuticos utilizados en el estudio de cinético de liberación-disolución comparativo.

3.2.3.3. Condiciones de Disolución

Las condiciones experimentales utilizadas en el estudio de liberación-disolución *in vitro*, se señalan en la tabla 9.

La preparación de los medios de disolución empleados en el estudio cinético de liberación-disolución comparativo, se menciona en el punto 3.2.2.2.4.

Tabla 8. Descripción de los productos farmacéuticos en estudio

	Producto de Referencia	Producto Bioequivalente
Principio activo	Alprazolam	Alprazolam
Presentación / Potencia	Comprimidos / 0,5 mg	Comprimidos / 0,5 mg
Laboratorio Procedencia	Laboratorio A	Laboratorio B
Número de lote	C120324	1C50

Tabla 9. Condiciones experimentales de estudio de liberación-disolución *in vitro*.

Aparato de disolución	Aparato II USP, Paletas
Velocidad de rotación	75 r.p.m.
Medios de disolución	Solución HCl 0,1 N pH 1,2 Solución amortiguadora de Acetato pH 4,5 Solución amortiguadora de Fosfato pH 6,8
Volumen	500 mL
Temperatura	37 ± 0,5°C
Tiempos de muestreos	5 – 10 – 15 – 20 minutos
Volumen de muestreo y reposición	5 mL
Método de cuantificación	HPLC
Longitud de onda	254 nm

3.2.3.4. Preparación Estándar y Blanco

A. Preparación Estándar Trabajo y Control

Se utilizó un estándar secundario de alprazolam, previamente valorado contra un estándar de referencia USP alprazolam (procedimiento descrito en el punto 3.2.2.1.).

Las soluciones estándar trabajo y estándar control se elaboraron de la misma manera que la solución estándar al 100% de la concentración de trabajo de alprazolam,

correspondiente al parámetro de linealidad (ver anexo N° 4). De esta manera, se prepararon dos soluciones estándar al 100% de la concentración de trabajo, con pesadas independientes cada una, en la cual una solución corresponde a la solución estándar trabajo, mientras que la otra corresponde a la solución estándar control.

B. Preparación Blanco

La Preparación del blanco de acuerdo al medio de disolución empleado, se menciona en el punto 3.2.2.2.5.

3.2.3.5. Desaireación Medio de Disolución

Los gases disueltos en el medio de disolución pueden causar la formación de burbujas, las cuales pueden alterar los resultados de la prueba. De esta manera, antes de iniciar el estudio cinético de liberación-disolución *in vitro*, se efectuó la eliminación de los gases (desaireación del medio de disolución). Para ello, se calentó el medio bajo agitación, hasta aproximadamente 41°C e inmediatamente se filtró al vacío utilizando un filtro con un tamaño de poro de 0,45 μm , mezclando vigorosamente. Una vez filtrado el medio de disolución, se continuó mezclando al vacío por un tiempo aproximado de 5 minutos¹⁴.

3.2.3.6. Procedimiento de Disolución

Se adicionó a cada uno de los seis vasos 500 mL del medio correspondiente (pH 1,2; pH 4,5; pH 6,8), el cual estaba preparado mediante una desaireación previa. Se ensambló el aparato y se dio inicio a la rotación de las paletas a una velocidad de 75 r.p.m. Se verificó con un termómetro la temperatura alcanzada en todos los vasos del equipo de disolución, correspondiente a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ y se procedió a colocar un comprimido en cada uno de ellos¹⁴.

En cada tiempo especificado (5 – 10 – 15 – 20 minutos), se retiró un volumen de muestra de 5 mL de una zona equidistante entre la superficie del medio de disolución y el borde superior de la paleta y a no a menos de 1 cm de la pared del vaso. Luego de extraer la muestra, se repuso el mismo volumen extraído con medio de disolución nuevo a 37°C.

Cabe mencionar, que el vaso se mantuvo cubierto durante todo el transcurso del ensayo¹⁴.

A continuación, se describe el procedimiento que se llevó a cabo luego de la extracción de las muestras, de acuerdo al medio de disolución empleado en el ensayo.

A. pH 1,2

Cada muestra obtenida se depositó en un tubo de ensayo. Luego, se adicionó un volumen de 3 mL de muestra en un matraz volumétrico de 10 mL, utilizando una micropipeta 5 mL y se completó el volumen con solución amortiguadora de fosfato pH 8,0 (ver punto 3.2.2.2.4.). Se homogenizó, se filtró con jeringa y filtro con tamaño de poro de 0,22 μm y se llevó a un vial ámbar para ser cuantificada en el HPLC.

B. pH 4,5

El procedimiento es el mismo que a pH 1,2, con la diferencia que para completar el volumen del matraz volumétrico de 10 mL, se utilizó una solución amortiguadora alcalina de borato pH 8,7 (ver punto 3.2.2.2.4.).

C. pH 6,8

Cada muestra obtenida, se filtró utilizando un filtro con tamaño de poro de 0,22 μm y se llevó a un vial para ser cuantificada en el HPLC.

3.2.3.7. Análisis de Muestra

Cada muestra se inyectó por triplicado en el HPLC, cuyas condiciones cromatográficas se presentan en la tabla 7. Además, para poder cuantificar las muestras obtenidas, se debió preparar una solución estándar trabajo y una solución estándar control de alprazolam al 100% de la concentración de trabajo, las cuales también se inyectaron junto con las muestras en el HPLC. No obstante, fue imprescindible inyectar al inicio y final de las inyecciones de estándar un blanco, con el fin de evaluar la presencia de señal que pueda interferir en el análisis.

3.2.3.8. Cálculos y Elaboración Perfil de Disolución

Se calculó la cantidad disuelta de alprazolam (mg), según la siguiente fórmula:

$$\text{mg P. A.} = \frac{\text{Lm} \times \text{Cst} \times \text{FD} \times \text{VMD} \times \text{PMb}}{\text{Lst} \times \text{PMs}} + \text{mg P. A. Et. A.}$$

Donde, mg P.A. son los mg de principio activo disuelto, mg P.A. Et.A. son los mg de principio activo disuelto en etapa anterior, Cst es la concentración del estándar trabajo (mg/mL), Lm es la lectura de la muestra, Lst es la lectura del estándar trabajo, FD es el factor de dilución de la muestra, VMD es el volumen de medio de disolución (mL), PMb es el peso molecular de la base (g/mol) y PMs es el peso molecular de la sal (g/mol).

A continuación, se determinó el porcentaje acumulado disuelto respecto de la cantidad declarada de alprazolam, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ P. A.} = \frac{\text{mg P. A} \times 100}{\text{DD}}$$

Donde, % P.A. es el porcentaje acumulado disuelto de la cantidad declarada de principio activo, mg P.A. son los mg disueltos de principio activo y DD es la dosis declarada (mg).

Una vez obtenido el porcentaje acumulado disuelto de cada lectura, se procedió a determinar el promedio de cada vaso, para luego establecer el porcentaje acumulado disuelto promedio de los 12 vasos empleados, en un tiempo determinado. Finalmente, estos valores fueron representados mediante un gráfico de porcentaje acumulado disuelto promedio respecto de la cantidad declarada en función del tiempo, en el correspondiente medio de disolución³⁵.

3.2.3.9. Evaluación de Resultados

Tanto el producto de referencia de Laboratorio A como el producto certificado como bioequivalente de Laboratorio B deben presentar una muy rápida liberación-disolución. De esta manera, el principio activo contenido en ambos productos farmacéuticos, se debe disolver en un porcentaje de 85% o más de la cantidad declarada de fármaco a los 15 minutos o menos, utilizando los tres medios de disolución⁷. Si uno de los productos farmacéuticos analizados en este estudio no cumple con lo mencionado anteriormente, se procederá a tomar medidas regulatorias adecuadas según el caso.

4. RESULTADOS

4.1. SOLUBILIDAD

4.1.1. Verificación del Equipo

En la tabla 10 se muestran los resultados de los parámetros analizados en la verificación del equipo de solubilidad Gemini Profiler, de acuerdo al ensayo realizado (control de calidad del electrodo y control de calidad del titulante).

Tabla 10. Resultados control de calidad del electrodo y control de calidad del titulante del equipo de solubilidad Gemini Profiler

Parámetro	Control de calidad del electrodo	Control de calidad del titulante
Factor HCl	1,0904	-
Factor KOH	-	1,0406
Concentración Carbonato (M)	0,000072	-
Parámetro electrodo α	0,169	-
Parámetro electrodo k_s	0,9957	-
Parámetro electrodo j_H	4,7	-
Parámetro electrodo j_{OH}	-1,3	-
GOF	1,1	1,3
Calificación GOF	Cumple	Cumple

4.1.2. pKa experimental

Los resultados del ensayo de determinación de pKa del principio activo en estudio (alprazolam) se presentan en la tabla 11. El documento obtenido por el software pS al integrar los tres archivos resultantes del análisis, el cual indica el valor de pKa con su

ajuste GOF correspondiente y el gráfico de Bjerrum proveniente de la integración, se muestra en el anexo N° 6.

Tabla 11. Resultados análisis de pKa de alprazolam

Titulación	Volumen (mL)	Tiempo (h)	pKa	GOF	pKa*	GOF **	Calificación GOF
1	2,9	0,8	3,79	1,3	3,79	1,6	Cumple
2	3,8	0,7	3,79	1,4			
3	4,8	0,8	3,81	1,6			

*pKa obtenido al integrar los tres archivos resultantes.

**GOF obtenido al integrar los tres archivos resultantes.

4.1.3. Solubilidad Intrínseca

Los resultados obtenidos del ensayo de Solubilidad Intrínseca de la materia prima activa alprazolam, utilizada en la elaboración del producto equivalente terapéutico comprimidos 0,5 mg de Laboratorio B, se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Resultados del ensayo de Solubilidad Intrínseca de la materia prima activa alprazolam

Titulación	Volumen (mL)	Tiempo (h)	Solubilidad Intrínseca (µg/mL)	GOF	Solubilidad intrínseca (µg/mL)*	GOF **	Calificación GOF
1	2,9	4,2	44,3	3,9	44,3	9,7	Cumple
2	3,9	3,9	35,6	4,7			
3	5,1	3,1	29,8	4,8			

*Solubilidad Intrínseca obtenida al integrar los tres archivos resultantes.

**GOF obtenido al integrar los tres archivos resultantes.

En la figura 3 se presenta el documento obtenido al integrar los tres archivos resultantes del análisis, en el cual se indica tanto el valor de la solubilidad intrínseca de la

materia prima activa con su ajuste GOF correspondiente, como la gráfica de Bjerrum proveniente de la integración.

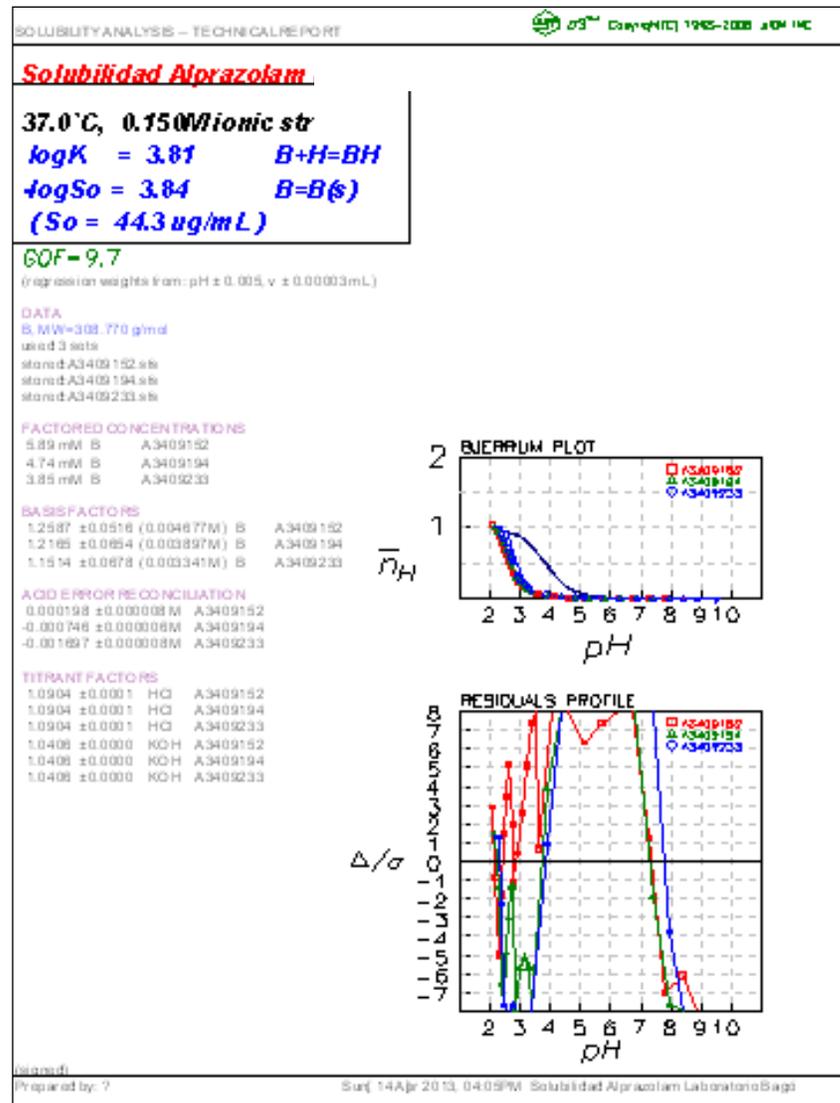


Figura 3. Solubilidad Intrínseca integrada y gráfico Bjerrum de materia prima activa alprazolam

4.1.4. Perfil de Solubilidad

A continuación, se ilustra una gráfica de perfil de solubilidad (mg/mL) en función del pH de la materia prima activa alprazolam, obtenida directamente desde el software pS (figura 4).

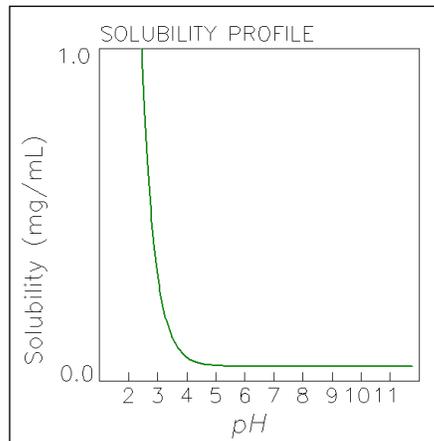


Figura 4. Gráfico de perfil de solubilidad materia prima activa alprazolam otorgada por software pS

En la figura 5 se ilustra una gráfica de perfiles de solubilidad ($\mu\text{g/mL}$) en función del pH, en todo el rango de pH analizado, obtenida mediante Excel.

La solubilidad intrínseca reportada es de bajo valor ($44,3 \mu\text{g/mL}$) y por ende no es posible apreciarla en los gráficos de las figuras 4 y 5. Es por ello, que en la figura 6 se muestra una gráfica de perfiles de solubilidad en función del pH con un rango de solubilidad estrecho, cercano a la solubilidad intrínseca resultante (rango de solubilidad de $25,0 \mu\text{g/mL} - 55,0 \mu\text{g/mL}$). A partir de la figura 6 se puede apreciar que la solubilidad intrínseca reportada se determinó a un pH cercano a 8.

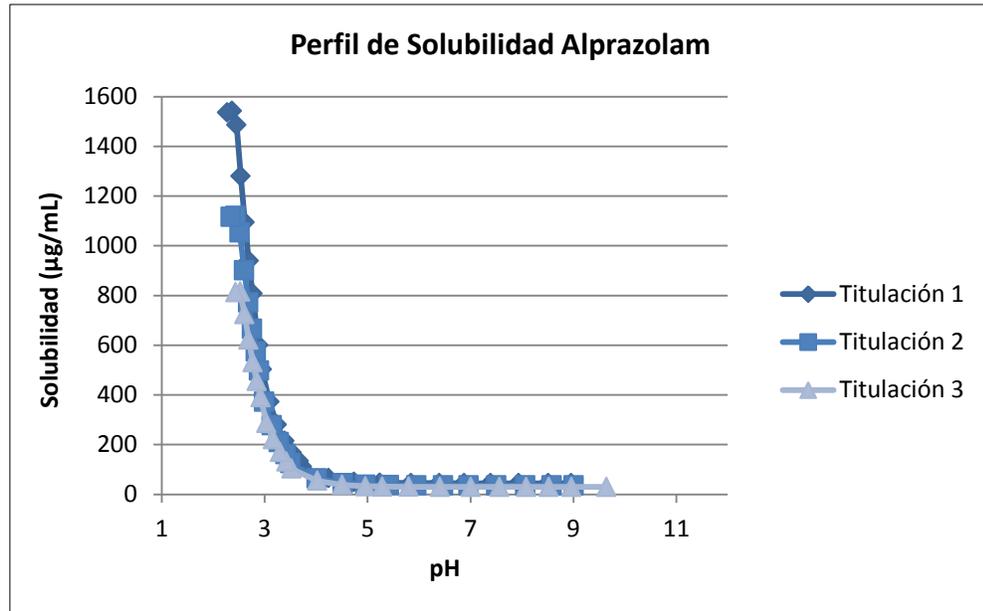


Figura 5. Gráfico de perfiles de solubilidad materia prima activa alprazolam

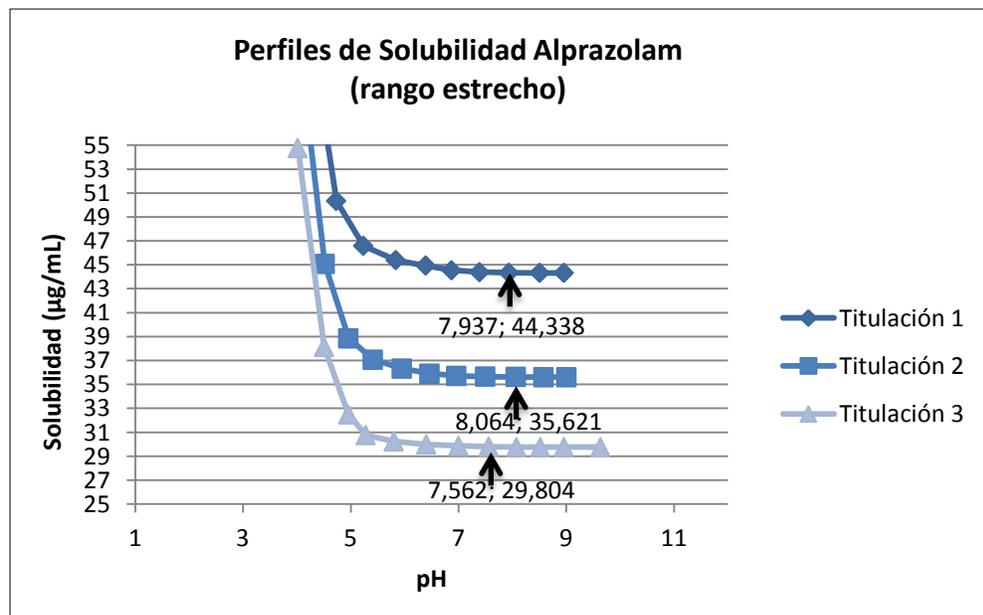


Figura 6. Gráfico de perfiles de solubilidad materia prima activa alprazolam con rango de solubilidad estrecho

4.1.5. Solubilidad mínima y Número de Dosis

A continuación, se presenta el promedio de las tres solubilidades mínimas (mg/mL) en el rango de pH de interés fisiológico, el Do resultante y la clasificación de solubilidad de la materia prima analizada.

El Do se calculó utilizando la solubilidad mínima promedio (mg/mL), dosis máxima de 1 mg y volumen de administración de 250 mL.

Tabla 13. Solubilidad mínima materia prima activa alprazolam

Titulación	pH (rango)	Solubilidad mínima (mg/mL)	Solubilidad mínima promedio (mg/mL)	Do	Resultado
1	1,892 - 6,873	0,0445	0,0367	0,109	Alta Solubilidad
2	1,853 - 6,962	0,0357			
3	1,867 - 7,004	0,0299			

4.2. VALIDACIÓN DE METODOLOGÍA ANALÍTICA

4.2.1. VALORACIÓN MATERIA PRIMA ALPRAZOLAM

4.2.1.1. Evaluación Carry Over

Todas las lecturas del blanco presentaron un área igual 0, por ende la evaluación Carry Over cumple con el criterio de aceptación especificado.

4.2.1.2. Test Aptitud del Sistema

En cada lectura de estándar trabajo y estándar control, el factor de simetría fue menor a 2 y el número de platos teóricos fue mayor a 500. El %CV de las inyecciones repetidas de estándar trabajo y estándar control fue menor al 2%. De esta manera, el Test Aptitud del Sistema cumple con los criterios de aceptación especificados.

4.2.1.3. Variación del Factor de Respuesta

A continuación, se indica el resultado de la variación del factor de respuesta de los estándares utilizados en la valoración de la materia prima activa alprazolam.

Tabla 14. Variación del factor de respuesta

Estándar	Lecturas	V _{FR} (%)	Calificación V _{FR}
Estándar Trabajo / Estándar Control	5 / 5	1,47	Cumple
Estándar Trabajo / Estándar Control	2 / 2	1,41	Cumple

4.2.1.4. Porcentaje de Principio Activo

Los resultados del ensayo de valoración de la materia prima activa alprazolam de Laboratorio B se presentan en la tabla 15. En ella se señala tanto los mg que fueron encontrados, como el porcentaje de principio activo alprazolam presente en la materia prima analizada.

Tabla 15. Resultados valoración materia prima activa alprazolam de Laboratorio B

Muestra	Cantidad de Alprazolam (mg)	Porcentaje de Alprazolam (%)
Muestra A	12,74	101,12
Muestra A	12,76	101,25
Muestra A	12,76	101,29
Muestra B	12,46	99,00
Muestra B	12,47	99,07
Muestra B	12,48	99,12
Muestra C	12,36	99,47
Muestra C	12,39	99,69
Muestra C	12,39	99,67
Promedio	12,54	99,96
S	0,17	0,97
%CV	1,34	0,97
IC	0,13	0,75
Calificación % Pureza	-	Cumple
Calificación %CV	Cumple	Cumple

4.2.2. VALIDACIÓN DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA ESTUDIO CINÉTICO DE LIBERACIÓN-DISOLUCIÓN COMPARATIVO

4.2.2.1. Selectividad

Los resultados obtenidos en el parámetro selectividad, para todos los medios de disolución, se resumen en la tabla 16.

En el anexo N° 7 se muestran los cromatogramas del estándar alprazolam al 100 % de la concentración de trabajo según el medio de disolución empleado.

Tabla 16. Resultados selectividad en los tres medios de disolución

Medio de disolución	pH 1,2		pH 4,5		pH 6,8	
Muestra	t _R (min)	Área	t _R (min)	Área	t _R (min)	Área
Estándar alprazolam	6,450	103737	4,470	104873	4,535	360723
Producto de referencia	6,489	102601	4,490	102988	4,482	349852
Producto bioequivalente	6,476	101062	4,501	106798	4,499	352349
Blanco	Sin presencia de señal al t _R de Alprazolam		Sin presencia de señal al t _R de Alprazolam		Sin presencia de señal al t _R de Alprazolam	
Blanco más detergente	Sin presencia de señal al t _R de Alprazolam		Sin presencia de señal al t _R de Alprazolam		Sin presencia de señal al t _R de Alprazolam	

4.2.2.2. Linealidad

En las tablas 17, 18 y 19 se señalan los resultados obtenidos en el parámetro de linealidad. Además, en la tabla 20 se muestran los resultados de la estadística empleada en este parámetro, para cada medio de disolución.

En el anexo N° 8 se ilustran las gráficas de área en función de la concentración (mg/mL) de alprazolam para cada medio de disolución empleado, donde las áreas fueron divididas por 10^5 .

El rango de concentración utilizado en el parámetro de linealidad fue de 0,000119 – 0,000418 mg/mL a pH 1,2 (39,67 – 139,33%); 0,000120 – 0,000417 mg/mL a pH 4,5 (40,00 – 139,00%); y 0,000399 – 0,001400 mg/mL a pH 6,8 (39,90 – 140,00%).

Tabla 17. Resultados linealidad pH 1,2

Solución	Concentración (mg/mL)	Área promedio	%CV	Calificación %CV	FR
1	0,000119	41633	0,18	Cumple	35058355553
2	0,000178	61843	0,06	Cumple	34835537068
3	0,000237	82098	0,35	Cumple	34654508780
4	0,000298	103612	0,27	Cumple	34724777683
5	0,000359	126032	0,24	Cumple	35081459777
6	0,000418	146720	0,04	Cumple	35097691237
				Promedio	34908721683
				S	195833511
				%CV	0,56
				Calificación %CV	Cumple

Tabla 18. Resultados linealidad pH 4,5

Solución	Concentración (mg/mL)	Área promedio	%CV	Calificación %CV	FR
1	0,000120	41855	0,76	Cumple	34805831449
2	0,000178	63158	0,40	Cumple	35396679680
3	0,000239	84242	0,35	Cumple	35291335965
4	0,000301	105668	0,18	Cumple	35061288197
5	0,000359	126602	0,21	Cumple	35298957933
6	0,000417	147795	0,24	Cumple	35456668679
				Promedio	35218460317
				S	243006893
				%CV	0,69
				Calificación %CV	Cumple

Tabla 19. Resultados linealidad pH 6,8

Solución	Concentración (mg/mL)	Área promedio	%CV	Calificación %CV	FR
1	0,000399	143369	0,22	Cumple	35901469474
2	0,000618	218141	0,32	Cumple	35311940310
3	0,000804	284429	0,45	Cumple	35390876915
4	0,001005	355742	0,15	Cumple	35411398390
5	0,001206	430264	0,27	Cumple	35691238906
6	0,001400	491377	0,19	Cumple	35087315916
				Promedio	35465706652
				S	288487971
				%CV	0,81
				Calificación %CV	Cumple

Tabla 20. Estadística de regresión parámetro linealidad para los tres medios de disolución

Medio de disolución	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8
Numero de determinaciones	6	6	6
Coefficiente de correlación (r)	0,99992	0,99994	0,99982
r ²	0,99984	0,99988	0,99965
Pendiente	3516,57242	3553,53009	3511,87862
Intercepción eje Y	-0,00638	-0,00718	0,02651
Intervalo confianza del Intercepto eje Y	±0,01800	± 0,01552	± 0,08865
Calificación r ²	Cumple	Cumple	Cumple
Intervalo de confianza del intercepto incluye el cero	Cumple	Cumple	Cumple

4.2.2.3. Precisión

En la tabla 21 se presentan los resultados obtenidos en el parámetro de precisión, tanto del estudio de repetibilidad como de precisión intermedia, en los tres medios de disolución empleados. En las tablas 22, 23 y 24 se muestra la estadística utilizada en la precisión intermedia, correspondiente al Test Comparación de medias, según el medio de disolución empleado.

El rango de concentración utilizado en el parámetro de precisión fue de 0,000180 – 0,000359 mg/mL a pH 1,2 (60,00 – 119,67%); 0,000178 – 0,000359 mg/mL a pH 4,5 (59,33 – 119,67%); y 0,000620 – 0,001206 mg/mL a pH 6,8 (62,00 – 120,60%).

Tabla 21. Resultados repetibilidad y precisión intermedia para los tres medios de disolución

Medio de disolución	Día	Nivel	Concentración (mg/mL)	Área promedio	Porcentaje promedio (%)	%CV	Calificación %CV
pH 1,2	1*	1	0,000178	61843	99,04	0,06	Cumple
		2	0,000298	103612	98,75	0,27	Cumple
		3	0,000359	126032	99,76	0,24	Cumple
	2**	1	0,000180	62522	98,98	0,22	Cumple
		2	0,000301	104337	98,55	0,14	Cumple
		3	0,000361	127264	100,32	0,13	Cumple
pH 4,5	1*	1	0,000178	63158	99,61	0,40	Cumple
		2	0,000302	105668	98,57	0,18	Cumple
		3	0,000359	126602	99,33	0,21	Cumple
	2**	1	0,000177	62062	98,71	0,22	Cumple
		2	0,000302	106397	99,15	0,18	Cumple
		3	0,000360	127726	99,88	0,50	Cumple
pH 6,8	1*	1	0,000618	218141	100,55	0,32	Cumple
		2	0,001005	355445	100,75	0,24	Cumple
		3	0,001206	430264	101,63	0,27	Cumple
	2**	1	0,000620	219917	101,04	0,36	Cumple
		2	0,001011	359582	101,32	0,28	Cumple
		3	0,001211	431074	101,40	0,22	Cumple

*Resultados repetibilidad

**Resultados precisión intermedia

Tabla 22. Estadística precisión intermedia pH 1,2: Test Comparación de Medias

pH 1,2	Nivel 1		Nivel 2		Nivel 3	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
Media (%)	99,04	99,98	98,75	98,55	99,76	100,32
Varianza (%²)	0,0037	0,0462	0,0702	0,0196	0,0572	0,0183
Número determinaciones	6	6	6	6	6	6
F calculado / F crítico (tabla)	12,3633 / 4,2839		3,5810 / 4,2839		3,1270 / 4,2839	
Resultado Test de Fisher	Varianzas Distintas		Varianzas Iguales		Varianzas Iguales	
S² común	-		0,0449		0,0377	
t experimental / t de tabla	-		0,4806/2,2281		1,3381 / 2,2281	
Calificación test t de Student	-		Cumple		Cumple	
t experimental / t[^] 	0,1527 / 2,5706		-		-	
Calificación test de Cochran	Cumple		-		-	

Tabla 23. Estadística precisión intermedia pH 4,5: Test Comparación de Medias

pH 4,5	Nivel 1		Nivel 2		Nivel 3	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
Media (%)	99,61	98,71	98,57	99,15	99,33	99,88
Varianza (%²)	0,1610	0,0452	0,0302	0,0311	0,0447	0,2467
Número determinaciones	5*	6	6	6	6	6
F calculado / F crítico (tabla)	3,5636 / 4,3874		1,0298 / 4,2839		5,5242 / 4,2839	
Resultado Test de Fisher	Varianzas Iguales		Varianzas Iguales		Varianzas Distintas	
S² común	0,0966		0,0306		-	
t experimental / t de tabla	2,0858 / 2,2622		1,4033 / 2,2281		-	
Calificación test t de Student	Cumple		Cumple		-	
t experimental / t[^] 	-		-		1,2543 / 2,5706	
Calificación test de Cochran	-		-		Cumple	

*Se eliminó el dato número 6 mediante la prueba de Dixon, debido a que corresponde a un resultado aberrante¹⁴.

Tabla 24. Estadística precisión intermedia pH 6,8: Test Comparación de Medias

pH 6,8	Nivel 1		Nivel 2		Nivel 3	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
Media (%)	100,55	101,04	100,75	101,32	101,63	101,40
Varianza (%²)	0,1052	0,1337	0,0598	0,0826	0,0775	0,0492
Número determinaciones	6	6	6	6	6	6
F calculado / F crítico (tabla)	1,2705 / 4,2839		1,3815 / 4,2839		1,5745/4,2839	
Resultado Test de Fisher	Varianzas Iguales		Varianzas Iguales		Varianzas Iguales	
S²_{común}	0,1195		0,0712		0,0634	
t experimental / t de tabla	1,1382 / 2,2281		1,3440 / 2,2281		0,5441 / 2,2281	
Calificación test t de Student	Cumple		Cumple		Cumple	
t experimental / t[^] 	-		-		-	
Calificación test de Cochran	-		-		-	

4.2.2.4. Exactitud

Los resultados obtenidos en el parámetro exactitud se muestran en las tablas 25, 26 y 27. La estadística empleada en el estudio para los tres medios de disolución se presenta en la tabla 28.

En el anexo N° 9 se ilustran las gráficas de concentración de estándar agregado (mg/mL) en función de la concentración de estándar encontrado (mg/mL).

El rango de concentración utilizado en el parámetro de exactitud fue de 0,000195 – 0,000359 mg/mL a pH 1,2 (65,00 – 119,67%); 0,000195 – 0,000361 mg/mL a pH 4,5 (65,00 – 120,33%); y 0,000650 – 0,001200 mg/mL a pH 6,8 (65,00 – 120,00%).

Tabla 25. Resultados exactitud pH 1,2

Nivel	Cantidad estándar encontrado (mg)	Porcentaje estándar encontrado (%)	Calificación	Porcentaje promedio (%)	Calificación
1	20,18	101,15	Cumple	100,18	Cumple
	19,88	99,63	Cumple		
	19,90	99,76	Cumple		
2	19,81	99,29	Cumple	99,32	Cumple
	19,77	99,08	Cumple		
	19,87	99,58	Cumple		
3	19,73	98,91	Cumple	99,03	Cumple
	19,76	99,02	Cumple		
	19,79	99,18	Cumple		
			Promedio	99,51	Cumple
			S	0,60	
			%CV	0,60	

Tabla 26. Resultados exactitud pH 4,5

Nivel	Cantidad estándar encontrado (mg)	Porcentaje estándar encontrado (%)	Calificación	Porcentaje promedio (%)	Calificación
1	20,48	101,97	Cumple	101,00	Cumple
	20,23	100,75	Cumple		
	20,14	100,29	Cumple		
2	20,11	100,16	Cumple	99,99	Cumple
	20,11	100,15	Cumple		
	20,01	99,65	Cumple		
3	20,08	100,01	Cumple	100,05	Cumple
	20,10	100,07	Cumple		
	20,09	100,06	Cumple		
			Promedio	100,34	Cumple
			S	0,57	
			%CV	0,57	

Tabla 27. Resultados exactitud pH 6,8

Nivel	Cantidad estándar encontrado (mg)	Porcentaje estándar encontrado (%)	Calificación	Porcentaje promedio (%)	Calificación
1	20,12	100,55	Cumple	100,16	Cumple
	20,09	100,37	Cumple		
	19,92	99,55	Cumple		
2	19,88	99,35	Cumple	99,49	Cumple
	19,92	99,53	Cumple		
	19,93	99,58	Cumple		
3	19,88	99,36	Cumple	99,46	Cumple
	19,90	99,46	Cumple		
	19,92	99,55	Cumple		
			Promedio	99,70	Cumple
			S	0,39	
			%CV	0,40	

Tabla 28. Estadística exactitud en los tres medios de disolución

	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8
Test t de Student			
t experimental	2,1472	1,5185	2,03806
t de tabla	2,3060	2,3060	2,30600
Calificación t de Student	Cumple	Cumple	Cumple
Estadística de regresión			
Número de determinaciones	3	3	3
R	1,00000	1,00000	1,00000
r²	1,00000	0,99999	1,00000
Pendiente	0,98622	0,99686	0,99200
Intercepción eje Y	0,00000	0,00000	0,00000
Calificación r	Cumple	Cumple	Cumple
Calificación r²	Cumple	Cumple	Cumple
Calificación Pendiente	Cumple	Cumple	Cumple

4.2.2.5. Rango

- pH 1,2 : 0,000195 – 0,000359 mg/mL (65,00 – 119,67%)
pH 4,5 : 0,000195 – 0,000359 mg/mL (65,00 – 119,67%)
- pH 6,8 : 0,000650 – 0,000120 mg/mL (65,00 – 120,00%)

4.2.2.6. Estabilidad

En la tabla 29 se muestran los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad del método analítico, en los tres medios de disolución empleados.

Tabla 29. Resultados estabilidad para los tres medios de disolución

Medio de disolución	Día	Área promedio	S	%CV	%CV día 1 - día 2	%CV día 1 - día 3
pH 1,2	1	103563	281	0,27	0,27	0,40
	2	103951	81	0,08		
	3	104230	191	0,18		
Calificación					Cumple	Cumple
pH 4,5	1	107410	214	0,20	0,34	0,35
	2	106952	341	0,32		
	3	106753	91	0,09		
Calificación					Cumple	Cumple
pH 6,8	1	355742	517	0,15	0,40	0,15
	2	353982	1535	0,43		
	3	356383	321	0,09		
Calificación					Cumple	Cumple

4.3. ESTUDIO CINÉTICO DE LIBERACIÓN-DISOLUCIÓN COMPARATIVO

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en el estudio cinético de liberación-disolución comparativo en los tres medios de disolución, efectuado a los productos farmacéuticos de referencia de Laboratorio A y equivalente terapéutico de Laboratorio B.

4.3.1. Solución HCl 0,1 N pH 1,2

En la tabla 30 se presentan los resultados obtenidos de las cinéticas de liberación-disolución en medio HCl 0,1 N pH 1,2, mientras que en la figura 7 se representan los perfiles de liberación-disolución del producto de referencia y bioequivalente en el mismo medio de disolución.

Tabla 30. Resumen resultados cinéticas de liberación-disolución pH 1,2

Producto	Tiempo	Cantidad disuelta (mg)			Porcentaje acumulado disuelto (%)		
		Promedio 12 vasos	S	%CV	Promedio 12 vasos	S	%CV
Producto de referencia	5	0,43	0,02	3,58	85,40	3,05	3,58
	10	0,48	0,01	2,47	95,45	2,36	2,47
	15	0,49	0,01	1,52	98,72	1,50	1,52
	20	0,50	0,00	1,00	100,41	1,00	1,00
Producto bioequivalente	5	0,48	0,02	3,39	95,03	3,22	3,39
	10	0,49	0,01	1,36	98,63	1,34	1,36
	15	0,50	0,01	1,20	99,99	1,20	1,20
	20	0,50	0,00	0,67	100,78	0,68	0,67

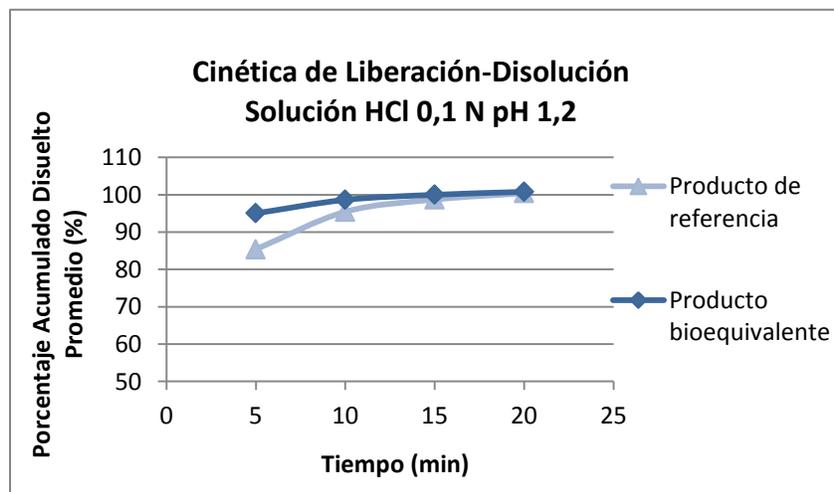


Figura 7. Cinética de liberación-disolución comparativo en solución HCl 0,1 N pH 1,2

4.3.2. Solución Amortiguadora de Acetato pH 4,5

Los resultados obtenidos de las cinéticas de liberación-disolución en medio amortiguador de acetato pH 4,5 se señalan en la tabla 31, los cuales se representan en la figura 8 mediante perfiles de liberación-disolución del producto referencia y bioequivalente.

Tabla 31. Resumen resultados cinéticas de liberación-disolución pH 4,5

Producto	Tiempo	Cantidad disuelta (mg)			Porcentaje acumulado disuelto (%)		
		Promedio 12 vasos	S	%CV	Promedio 12 vasos	S	%CV
Producto de referencia	5	0,36	0,02	5,76	71,84	4,14	5,76
	10	0,48	0,01	2,45	96,21	2,36	2,45
	15	0,49	0,01	1,78	97,80	1,74	1,78
	20	0,50	0,01	1,60	99,02	1,58	1,60
Producto bioequivalente	5	0,46	0,01	2,97	92,06	2,73	2,97
	10	0,48	0,01	1,47	95,09	1,40	1,47
	15	0,48	0,01	1,41	95,84	1,35	1,41
	20	0,49	0,01	1,77	97,19	1,72	1,77

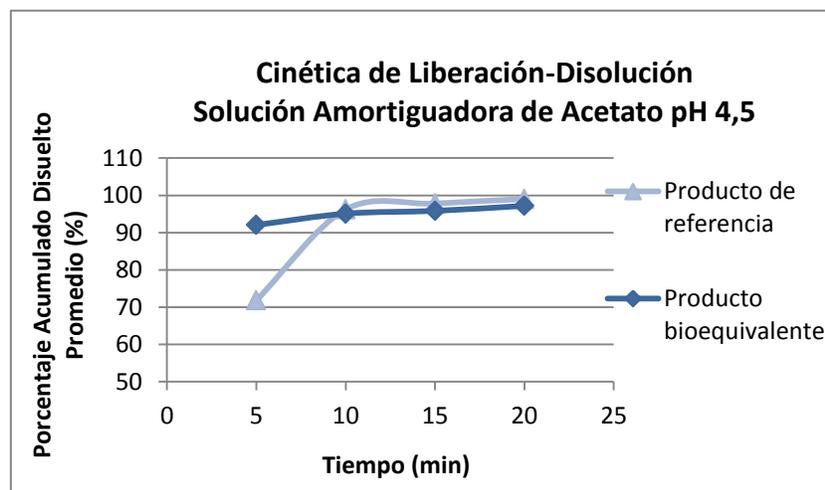


Figura 8. Cinética de liberación-disolución comparativo en solución amortiguadora de acetato pH 4,5

4.3.3. Solución Amortiguadora de Fosfato pH 6,8

En la tabla 32 se presentan los resultados obtenidos de las cinéticas de liberación-disolución en medio amortiguador de fosfato pH 6,8. Además, en la figura 9 se representan los perfiles de liberación-disolución del producto de referencia y bioequivalente en solución amortiguadora de fosfato pH 6,8.

Tabla 32. Resumen resultados cinéticas de liberación-disolución pH 6,8

Producto	Tiempo	Cantidad disuelta (mg)			Porcentaje acumulado disuelto (%)		
		Promedio 12 vasos	S	%CV	Promedio 12 vasos	S	%CV
Producto de referencia	5	0,33	0,03	10,55	65,16	6,88	10,55
	10	0,45	0,02	3,41	89,87	3,07	3,41
	15	0,47	0,01	1,56	93,46	1,46	1,56
	20	0,47	0,01	1,15	94,21	1,09	1,15
Producto bioequivalente	5	0,43	0,02	4,86	86,32	4,19	4,86
	10	0,47	0,01	1,68	93,00	1,56	1,68
	15	0,47	0,01	1,69	93,49	1,58	1,69
	20	0,47	0,01	1,71	93,54	1,60	1,71

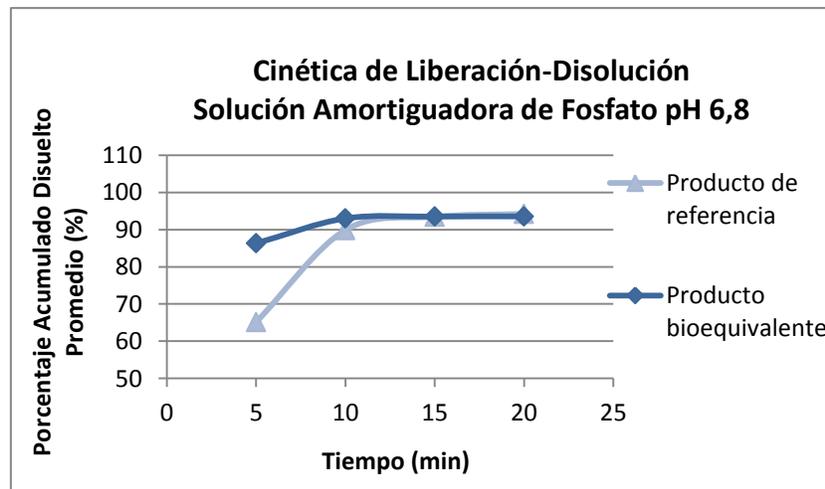


Figura 9. Cinética de liberación-disolución comparativo en solución amortiguadora de fosfato pH 6,8

4.3.4. Resumen de Resultados Estudio Cinético de Liberación-Disolución Comparativo

En la tabla 33 se muestra el porcentaje acumulado disuelto promedio del principio activo alprazolam, en el tiempo correspondiente a 15 minutos, de todos los medios de disolución, indicando además si se cumple con una muy rápida liberación-disolución que deben presentar los productos farmacéuticos analizados.

Tabla 33. Resumen de resultados estudio cinético de liberación-disolución comparativo en los tres medios de disolución.

Producto	Medio de disolución	Porcentaje acumulado disuelto promedio a los 15 minutos (%)	%CV	Muy rápida liberación-disolución
Producto de referencia	pH 1,2	98,72	1,52	Cumple
	pH 4,5	97,80	1,78	Cumple
	pH 6,8	93,46	1,56	Cumple
				Cumple
Producto bioequivalente	pH 1,2	99,99	1,20	Cumple
	pH 4,5	95,84	1,41	Cumple
	pH 6,8	93,49	1,69	Cumple

5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este internado forman parte de una evaluación a la calidad biofarmacéutica de los productos comparador y equivalente terapéutico, de Laboratorio A y Laboratorio B respectivamente, lo que permite fiscalizar el cumplimiento de ambos productos farmacéuticos respecto a este requisito de calidad y de esta manera tomar medidas normativas regulatorias, si corresponde.

5.1. SOLUBILIDAD

En el estudio de solubilidad, los resultados obtenidos corresponden a la materia prima activa alprazolam con la cual se elabora el producto bioequivalente comprimidos 0,5 mg de Laboratorio B. Cabe mencionar, que no es posible determinar la solubilidad y por ende la clasificación en base al SCB de la materia prima activa alprazolam con la cual se elabora el producto de referencia comprimidos 0,5 mg de Laboratorio A, debido a que el laboratorio recién mencionado no la envió para su análisis.

En primera instancia, fue necesario analizar los resultados de la verificación del equipo de Solubilidad Gemini Profiler, ya que tanto el control de calidad del electrodo como el control de calidad del titulante son fundamentales para poder efectuar los análisis posteriores (pKa y solubilidad). Como se puede observar en la tabla 10, el ajuste GOF de ambos ensayos es menor a 2, quedando el equipo verificado y operativo para efectuar la determinación de pKa y solubilidad de la materia prima activa alprazolam.

El pKa experimental del principio activo alprazolam obtenido al integrar los tres archivos resultantes de las titulaciones efectuadas, corresponde a 3,79 con un ajuste GOF de 1,6, cumpliendo con el criterio establecido. Cabe mencionar, que el ajuste GOF recién mencionado se acerca bastante a 1, lo que significa que el resultado experimental se asemeja al modelo teórico de pKa planteado en la tabla 4. En este modelo teórico se ingresó un pKa estimado, el cual según Laihanen *et al.* 1996³⁰ corresponde a 3,5, cuyo

valor no difiere significativamente del pKa experimental obtenido por el equipo Gemini Profiler, lo que fundamenta el GOF resultante de este estudio.

La solubilidad intrínseca de la materia prima activa alprazolam, resultante de la integración de los tres archivos, se obtuvo a un pH cercano a 8 con un valor de 44,3 $\mu\text{g/mL}$ y un ajuste GOF de 9,7. Como se puede observar, aunque el ajuste GOF cumple con el criterio de aceptación, éste se aleja de 1 y por ende el resultado experimental obtenido difiere del modelo teórico planteado en la tabla 5. El resultado informado por Laboratorio B respecto a la solubilidad mínima de la materia prima activa alprazolam corresponde a 125 $\mu\text{g/mL}$, obtenida a pH 5,5, siendo esta la solubilidad intrínseca estimada que se ingresó en el modelo teórico, la cual no se asemeja a la solubilidad intrínseca obtenida en este estudio, justificando de esta manera el GOF resultante.

En la figura 3, se puede apreciar el gráfico Bjerrum proveniente de la integración de los archivos de solubilidad intrínseca, el cual corresponde al número de protones cedidos en función del pH. En este gráfico, se puede observar que a medida que aumenta el pH de la solución la molécula se va deprotonando, obteniéndose un pKa aparente desplazado hacia la derecha. El pKa aparente es debido a la formación de precipitado (solute) en la solución, y puede estar desplazado tanto hacia la derecha como hacia la izquierda del pKa real, dependiendo del carácter ácido o básico de la molécula. En este caso, el pKa se encuentra desplazado hacia la izquierda, debido al carácter básico de la molécula alprazolam⁴³.

En cuanto al perfil de solubilidad en función del pH de la materia prima activa en estudio, se puede observar que a medida que aumenta el pH de la solución, la solubilidad de alprazolam va disminuyendo. Esto se debe al carácter básico de la molécula, en donde si el pH de una solución es menor que el pKa de la base, predomina la forma ionizada (protonada), y por ende la solubilidad de la materia prima aumenta; mientras que si el pH de una solución es mayor que el pKa de la base, predomina la forma neutra (deprotonada), y por ende la solubilidad de la materia prima disminuye⁴⁴.

Por otra parte, para determinar el Do se necesita el valor de solubilidad mínima de la materia prima en estudio dentro del rango de pH fisiológico. Sin embargo, la solubilidad intrínseca reportada de la materia prima activa alprazolam se obtiene a un pH fuera de este rango, motivo por el cual fue necesario determinar la solubilidad mínima en un rango de pH de 1,2 – 6,8 de cada titulación efectuada, cuyo promedio corresponde a 0,0367 mg/mL a un pH cercano a 6,8. De esta manera, empleando la solubilidad mínima promedio, dosis máxima de 1 mg y volumen de administración de 250 mL, se establece que el Do es menor a 1 y por ende se puede clasificar la materia prima activa alprazolam con la cual se elabora el producto bioequivalente comprimidos 0,5 mg de Laboratorio B como de alta solubilidad

Si se compara la solubilidad de alprazolam informada por otros autores (ver tabla 3), con la solubilidad mínima promedio obtenida en este estudio (0,0367 mg/mL cercana a 6,8), se puede apreciar que esta última es similar a la solubilidad reportada por Drugbank (0,040 mg/mL a pH 7,0)¹⁷. Cabe mencionar, que al comparar el resultado obtenido en el presente estudio con el resultado informado por Laboratorio B respecto a la solubilidad mínima de alprazolam en el rango de pH fisiológico, se puede observar que estos valores no son similares, sin embargo, en ninguno de los dos casos se afecta la clasificación de la materia prima activa alprazolam como de alta solubilidad.

5.2. VALIDACIÓN DE METODOLOGÍA ANALÍTICA

5.2.1. VALORACIÓN MATERIA PRIMA ALPRAZOLAM

El porcentaje de pureza del principio activo alprazolam encontrado en la valoración de la materia prima activa alprazolam de Laboratorio B corresponde 99,96%, con un coeficiente de variación porcentual de 0,97%, por lo que se cumple con el criterio de aceptación establecido por la USP¹⁴. De esta manera, la materia prima activa alprazolam puede ser utilizada como estándar secundario tanto en la validación de la metodología analítica como en el estudio cinético de liberación-disolución comparativo de formas

farmacéuticas solidas orales de liberación convencional que contengan el principio activo alprazolam.

5.2.2. VALIDACIÓN DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA ESTUDIO CINÉTICO DE LIBERACIÓN-DISOLUCIÓN COMPARATIVO

Respecto al parámetro selectividad, tanto en las muestras (producto de referencia y producto bioequivalente) como en el estándar alprazolam se observa una única señal, cuyos tiempos de retención y áreas de las muestras coinciden con el tiempo de retención y área del estándar, en los tres medios de disolución establecidos. Así mismo, en la lectura del blanco y blanco con detergente, no se observan señales que puedan interferir con la lectura de alprazolam, en los tres medios de disolución. De esta manera, se comprueba que el método analítico del estudio de liberación-disolución *in vitro* es capaz de cuantificar el analito de interés (alprazolam) sin que exista interferencia de otras sustancias químicas presentes en la muestra, estableciéndose que es selectivo para los tres medios de disolución.

Los resultados obtenidos en el parámetro de linealidad para los tres medios de disolución, respecto al %CV de cada nivel y %CV del factor de respuesta de todos los puntos de la curva de calibración, cumplen con los criterios de aceptación. Además, al inspeccionar visualmente el gráfico de área en función de la concentración del analito, se puede observar un comportamiento lineal en cada medio de disolución. Por otra parte, al evaluar la linealidad del método mediante la estadística de regresión lineal en los tres medios de disolución, se puede destacar que los coeficientes de determinación cumplen con el criterio de aceptación, demostrándose la existencia de regresión entre las variables de concentración y respuesta analítica y en todos los casos el intervalo de confianza del intercepto del eje "y" pasa por cero. En base a todo lo mencionado anteriormente, se comprueba que el método analítico del estudio de liberación-disolución *in vitro* es lineal en un rango de concentraciones establecido para cada medio de disolución.

En cuanto al estudio de precisión efectuado en los tres medios de disolución, tanto en repetibilidad como en precisión intermedia el coeficiente de variación porcentual de cada nivel cumple con el criterio de aceptación. Además, la estadística empleada en la precisión intermedia, correspondiente al Test Comparación de Medias, cumple con los criterios de aceptación especificados y por ende se confirma la condición de homogeneidad para varianzas iguales y en el caso de varianzas distintas se concluye que las medias de ambos conjuntos son significativamente iguales. De esta manera, es que el método analítico del estudio de liberación-disolución *in vitro* es preciso en un rango de concentraciones establecido para cada medio de disolución.

Por otra parte, los porcentajes de recuperación obtenidos en el estudio de exactitud para cada medio de disolución, se encuentran dentro de los límites especificados. Así mismo, la estadística utilizada en este parámetro para cada medio de disolución, en relación al test *t* de Student, cumple con el criterio de aceptación y por ende se demuestra que los valores (valor medio obtenido y valor teórico) no difieren significativamente. Al evaluar la exactitud del método analítico mediante la estadística de regresión, cuyos estimadores se obtuvieron a partir de un gráfico de cantidad de estándar agregado en función de la cantidad de estándar encontrado, se puede observar que el coeficiente de regresión, coeficiente de determinación y pendiente cumplen con los criterios de aceptación especificados. De esta manera, se demuestra estadísticamente que el método analítico del estudio de liberación-disolución *in vitro* es exacto en un rango de concentraciones establecidas para cada medio de disolución.

Si bien la validación se efectuó de manera independiente para cada medio de disolución, el rango de concentraciones en el cual el método analítico es lineal, preciso y exacto es el mismo a pH 1,2 y 4,5 (65,00 – 119,67% de la concentración de trabajo) y distinto a pH 6,8 (65,00 – 120,00% de la concentración de trabajo). Cabe mencionar, que debido a una segunda dilución empleada en los medios de disolución pH 1,2 y 4,5, la concentración de trabajo de estos es diferente a la concentración de trabajo empleada en el medio de disolución pH 6,8.

Los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad de la solución estándar alprazolam, para cada medio de disolución, cumplen con los criterios de aceptación especificados. Por lo tanto, se comprueba que la solución de estándar secundario alprazolam es estable en los tres medios de disolución, durante un periodo de tres días y manteniéndose almacenada en refrigeración (2 – 8°C).

En base a todo lo mencionado anteriormente, se demuestra que el método analítico para el estudio cinético de liberación-disolución comparativo de FFSO-LI que contengan alprazolam 0,5 mg, permite entregar resultados confiables y reproducibles dentro de los intervalos definidos y en todos los medios de disolución establecidos (solución HCl 0,1 N pH 1,2; solución amortiguadora de acetato pH 4,5; y solución amortiguadora de fosfato pH 6,8).

5.3. ESTUDIO CINÉTICO DE LIBERACIÓN-DISOLUCIÓN COMPARATIVO

Los resultados obtenidos en el estudio cinético de liberación-disolución *in vitro* corresponden al producto farmacéutico de referencia de Laboratorio A y al producto farmacéutico certificado actualmente como bioequivalente de Laboratorio B.

Al evaluar los perfiles de liberación-disolución, tanto del producto de referencia como del producto bioequivalente en solución de pH 1,2, se puede observar que ambos presentan un porcentaje acumulado disuelto promedio mayor al 85% a los 15 minutos. Así mismo, al analizar los perfiles de liberación-disolución de estos productos farmacéuticos en solución amortiguadora de pH 4,5, se puede apreciar que tanto el producto de referencia como el producto bioequivalente presentan un porcentaje acumulado disuelto promedio mayor al 85% a los 15 minutos. Por otra parte, los perfiles de liberación-disolución del producto de referencia y bioequivalente en solución amortiguadora de pH 6,8, también mostraron un porcentaje acumulado disuelto promedio mayor al 85% a los 15 minutos.

De esta manera, tanto el producto de referencia como el producto certificado como equivalente terapéutico presentan una cantidad acumulada disuelta promedio

mayor al 85% de principio activo alprazolam respecto de lo declarado, en un tiempo de 15 minutos y en los tres medios de disolución establecidos (solución HCl 0,1 N pH 1,2; solución amortiguadora de acetato pH 4,5; y solución amortiguadora de fosfato pH 6,8). Además, todas las cinéticas se realizaron bajo condiciones aceptadas por la guía técnica G-BIOF 02, es decir, empleando el aparato de paleta (aparato II USP), a 75 r.p.m. y en un volumen de 500 mL. De esta manera, según los criterios adoptados en la guía técnica G-BIOF 02 y en base a todo lo mencionado anteriormente, es que el producto farmacéutico de referencia de Laboratorio A y el producto certificado como bioequivalente de Laboratorio B presentan una muy rápida liberación-disolución⁷.

Como se menciona anteriormente, ambos productos farmacéuticos presentan la característica de muy rápida liberación-disolución y por ende no es necesaria la comparación de los perfiles cinéticos mediante el factor de similitud. De esta manera, se demuestra que el producto bioequivalente presenta un perfil de disolución similar al producto comparador y al mismo tiempo se comprueba el cumplimiento de uno de los requisitos que permitieron aprobar la solicitud de Bioexención en base al SCB para el producto equivalente terapéutico de Laboratorio B.

En base a los resultados obtenidos en el presente internado, se puede comprobar la alta solubilidad de la materia prima activa alprazolam que adquiere Laboratorio B y una muy rápida liberación-disolución tanto del producto de referencia como del producto certificado actualmente como equivalente terapéutico. Cabe mencionar, que no fue posible analizar la solubilidad de la materia prima activa alprazolam que adquiere Laboratorio A para compararla con la materia prima que utiliza Laboratorio B. Sin embargo, esto no impidió que se cumpliera satisfactoriamente el seguimiento a la calidad biofarmacéutica del producto bioequivalente.

6. CONCLUSIONES

1. La materia prima activa alprazolam empleada por Laboratorio B para la elaboración de su producto certificado como bioequivalente se clasifica como de alta solubilidad de acuerdo al Sistema de Clasificación Biofarmacéutico.
2. No fue posible determinar la clasificación de solubilidad de la materia prima activa alprazolam que adquiere Laboratorio A para la elaboración de su producto de referencia.
3. La metodología analítica utilizada en el estudio cinético de liberación-disolución *in vitro* de formas farmacéuticas sólidas orales de liberación inmediata que contienen alprazolam 0,5 mg, es adecuada para los fines previstos, ya que se cumple con las características de desempeño especificadas, permitiendo entregar resultados confiables y reproducibles.
4. Tanto el producto de referencia en la dosis de 0,5 mg de Laboratorio A como el producto equivalente terapéutico en la dosis de 0,5 mg de Laboratorio B presentaron la característica de muy rápida liberación-disolución en los tres medios establecidos (solución HCl 0,1 N pH 1,2; solución amortiguadora de acetato pH 4,5; y solución amortiguadora de fosfato pH 6,8).
5. Se comprueba experimentalmente el cumplimiento de los requisitos de solubilidad y disolución que permitieron la aprobación de bioexención en base al Sistema de Clasificación Biofarmacéutico del producto equivalente terapéutico de Laboratorio B.

6. Para complementar este estudio y asegurar la alta permeabilidad del principio activo alprazolam, se debería realizar una determinación de permeabilidad empleando un modelo *in vitro*, de cultivo celular u otro.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Decreto Supremo N° 1876: Reglamento del Sistema Nacional de Control de Productos Farmacéuticos. Publicada en el Diario Oficial de 09.09.96.
2. Resolución Exenta N° 727: Norma que define los criterios para establecer Equivalencia Terapéutica a productos farmacéuticos en Chile. Publicada en el Diario Oficial de 29.11.05.
3. Resolución Exenta N° 726: Norma que determina los principios activos contenidos en productos farmacéuticos que deben demostrar su equivalencia terapéutica y lista de productos farmacéuticos que sirven de referencia de los mismos. Publicada en el Diario Oficial de 29.11.05.
4. WHO. 2006. World Health Organization Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Fortieth Report. Geneva.
5. Resolución Exenta N° 515: Política Nacional de Medicamentos en la Reforma de Salud. Publicada en el Diario Oficial de 02.04.04.
6. ISP. 2007. Guía Técnica G–BIOF 01: Estudios de Biodisponibilidad Comparativa con Productos de Referencia (R) para establecer Equivalencia Terapéutica. Sección de Biofarmacia. Instituto de Salud Pública de Chile.
7. ISP. 2007. Guía Técnica G–BIOF 02: Bioexención de los estudios de Biodisponibilidad / Bioequivalencia para establecer Equivalencia Terapéutica de Formas Farmacéuticas Sólidas Orales. Sección de Biofarmacia. Instituto de Salud Pública de Chile.
8. Decreto Supremo N° 3: Reglamento del Sistema Nacional de Control de los Productos Farmacéuticos de Uso Humano. Publicada en el Diario Oficial de 25.06.11.
9. FDA. 2000. Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, USA.

10. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP y Crison JR. 1995. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutics Drug Classification: The Correlation of *in Vitro* Drug Product Dissolution and *in Vivo* Bioavailability. *Pharm Res.* 12(3): 413-420.
11. Blume HH y Schug BS. 1999. The biopharmaceutics classification system (BCS): Class III drugs – better candidates for BA/BE waiver? *Eur J Pharm Sci.* 9: 117-121.
12. Volpe DA. 2008. Drug Permeability Studies in Regulatory Biowaiver Applications. *Drug Absorption Studies. Biotechnology: Pharmaceuticals Aspects.* 7: 665-680.
13. ICH. 2000. International Conference on Harmonization Topic Q 6 A. Not for Guidance Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substance. ICH Harmonised Tripartite Guideline.
14. The United States Pharmacopeial Convention. 2012. USP 35 - NF 30: Farmacopea de los Estados Unidos de América – Formulario Nacional. Edición N° 35. The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
15. ICH. 2005. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline.
16. ISP. 2013. Listado de productos Bioequivalentes, actualizado al 13 de Diciembre de 2013. Subdepartamento de Biofarmacia y Bioequivalencia. Instituto de Salud Pública de Chile.
17. DrugBank. Open Data Drug & Drug Target Database. <http://www.drugbank.ca> (página visitada el 20 de noviembre del 2013).
18. Verster JC, Volkerts ER y Verbaten MN. 2002. Effect of Alprazolam on driving ability, memory functioning and psychomotor performance: Randomized placebo-controlled study. *Neuropsychopharmacology.* 27: 260-269.
19. Laboratorio A. Folleto de información al paciente, del producto de referencia, aprobado el 26.08.13.
20. Flórez J. 1997. Farmacología Humana. Edición N° 3. Masson, Barcelona. 455-456 pp.

21. López AC, Moreno L y Villagrasa V. 2010. Manual de Farmacología: Guía para el uso racional del medicamento. Edición N° 2. Elsevier, Madrid. 43 pp.
22. O'Connor WT, Earley B y Leonard BE. 1985. Antidepressant properties of the triazolobenzodiazepines alprazolam and adinazolam: studies on the olfactory bulbectomized rat model of depression. Br J clin Pharmacol. 19: 45S-56S.
23. Huybrechts I. 1991. The pharmacology of alprazolam: a review. Clin Ther. 13(1): 100-17.
24. Quitkin FM, Adams DC, Bowden CL, Heyer EJ, Rifkin A, Sellers EM, Tandon R y Taylor BP, editores. 1998. Current Psychotherapeutic Drugs. Edición N° 2. American Psychiatric, Washington. 159 pp.
25. Salazar M, Peralta C y Pastor FJ, editores. 2009. Tratado de Psicofarmacología: Bases y aplicación clínica. Edición N° 2. Editorial Médica Panamericana, Madrid. 379 pp.
26. Nudelman NS y Cabrera CG. 2002. Isolation and structural elucidation of degradation products of alprazolam: photostability studies of alprazolam tablets. J Pharm Sci. 91(5): 1274-86.
27. Cho MJ, Sethy VH y Haynes LC. 1986. Sequentially labile water-soluble prodrugs of alprazolam. J Med Chem. 29(8): 1346-50.
28. Gonsalves AR, Pineiro M, Martins JM, Barata PA y Menezes JC. 2010. Identification of Alprazolam and its degradation products using LC-MS-MS. ARKIVOC: Online J Org Chem. 2010(5): 128-141.
29. Florence AT y Attwood D. 2011. Physicochemical Principles of Pharmacy. Edición N° 5. Pharmaceutical Press, London, UK. 68 pp.
30. Laihanen N, Muttonen E y Laaksonen M. 1996. Solubility and Intrinsic Dissolution Rate of Alprazolam Crystal Modifications. Pharm Dev Technol. 1(4): 373-380.
31. TSRL, Inc. Therapeutic Systems Research Laboratories. <http://www.tsrlinc.com> (página visitada el 20 de noviembre del 2013).

32. Hedaya MA. 2012. Basic Pharmacokinetics. Edición N° 2. CRC Press, Boca Raton, FL. 104 pp.
33. Sugano K. 2012. Biopharmaceutics Modeling and Simulations: Theory, Practice, Methods, and Applications. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey. 41-42 pp.
34. Gemini profiler pION INC, USA. Instruction manual, rev 3.2.1. 2009. Estados Unidos.
35. EMA. 2008. Guideline on the Investigation of Bioequivalence. Committee for Medicinal Products for Human Use.
36. Instituto de Salud Pública. Sistema de consulta productos farmacéuticos registrados. registrosanitario.ispch.gob.cl (página visitada el 15 de noviembre del 2013).
37. Oh D, Curl RL y Amigon GL. 1993. Estimating the Fraction Dose Absorbed from Suspensions of Poorly Soluble Compounds in Humans: A Mathematical Model. Pharm Res. 10(2): 264-270.
38. Kazemifard AG, Javadzadeh N y Gholami K. 2008. A New universal high-performance liquid chromatographic method for determination of 1,4-benzodiazepines as bulk drug and in pharmaceutical formulations. Acta Pol Pharm. 65(2): 179-186.
39. ICH. 1996. Guidance for Industry. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. ICH Harmonised Tripartite Guideline.
40. Castillo B y Gonzales R. 1996. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. Rev Cubana Farm. 30(1).
41. Berenson ML, Levine DM y Krehbiel TC. 2006. Estadística para Administración. Edición N° 4. Prentice Hall, Mexico. 313 pp.
42. Pérez JA y Pujol M. 2001. Validación de Métodos Analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria A.E.F.I. 46-105 pp.
43. Mannhold R, Kubinyi H y Folkers G, editores. 2008. Molecular Drug Properties: Measurement and Prediction. Wiley-VCH, Weinheim. Vol. 37. 72-73 pp.

44. Pandit NK. 2007. Introduction to the Pharmaceutical Sciences. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore. 32-34 pp.

8. ANEXOS

Anexo N° 1

 ANAMED SLNC S. Físicoquímica	REGISTRO VERIFICACIÓN EQUIPOS HPLC Shimadzu Prominence	Versión: 3
		Actualización: 24/05/2013
	RG-01-IT-422.00-037	Página 1 de 10

Fecha Inicio: 27/05/2013

1. EQUIPO

Equipo HPLC (marca /modelo) : Shimadzu Prominence 20A

N° Interno : EQ-HPLC-007

Encargado Inventario : Q.F. Alexis Avelino

Responsable del equipo : Q.F. Pedro Silva

Sección o Unidad : Sección Físico Químico

2. ANTECEDENTES DEL EQUIPO

	Modelo Colocar ticket o escribir modelo o indicar N/A	N° de Serie Colocar N° serie o N/A	N° Inventario Colocar N° inv. o N/A
Degasificador	DGU-20A5	L20244504827	30202
Bomba	LC-20AD	L20104509369	30203
M. Automático	SIL-20A / (SIL-20AC HT)	L20164503369	30204
Integrador/controlador	CBM-20A	L20234505114	30206
Detector diodos	SPD-M20A	L20154503166	30205
Detector fluorescencia	RF-10 AXL	C20954506545	30208
Horno Columna	CTO-20AC	L20214503520	30207
Inyector Manual	-	-	-
Ethernet switch	EN14905-VWY	-	30209
CPU	DELL OPTIPLEX 740	L51534500438	30211
Monitor	DELL E 178FBP	CN-0R1979-74201-1A0	30210
Teclado	DELL SK-8115	CN-005415-71016-189	30212
Mouse	DELL M056VC	-	-
Software	IC SOLUTION	VERSION 1.24 SP1	-

3. DOCUMENTACIÓN DEL EQUIPO

	Existencia	Estado	N° Registro
Ficha Técnica	OK	OK	000072
IT-Uso Equipo	OK	OK	IT-422.00-030
IT-Verificación Equipo	OK	ACTUALIZADO	IT-422.00-037
Bitácora (Registro de Uso)	OK	OK	Folio 007
Etiqueta Identificación	OK	OK	EQ-HPLC-007
Manuales	OK	OK	

Figura 1. Verificación Equipo Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (1)

 ANAMED SLNC S. Físicoquímica	REGISTRO VERIFICACIÓN EQUIPOS HPLC Shimadzu Prominence	Versión: 3
		Actualización: 24/05/2013
	RG-01-IT-422.00-037	Página 10 de 10

6. CONCLUSIONES

6.1. SE VERIFICO EL EQUIPO ENCONTRANDOSE OPERATIVO, SALVO EN EL SENSOR DE SUSTANCIAS VOLÁTILES DEL HORNO (CTO-70AC)

7. ANALISTAS

7.1. TESTA: DIEGO SILVA Firma: 

7.2. Pedro Silva Firma: 

Fecha término 28/05/2013

8. JEFE SECCIÓN:

CALIFICACIÓN: APTO NO APTO APTO CON RESTRICCIONES OTROS

OBSERVACIONES

NO SE VERIFICO DETECTOR DE FLUORESCENCIA

NO SE APLICA VERIFICACIÓN GRADIENTE Y LINEALIDAD, ÉSTA ES ANUAL

VERIFICAR SEMANALMENTE LA LÁMPARA D₂, YA QUE SOBREPASA AÑOS DE USO.

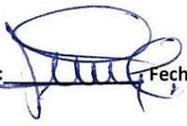
Nombre Oswaldo Mercado C. Firma:  Fecha: 28/05/13

Figura 2. Verificación Equipo Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (2)

Anexo N° 2



U.S. Pharmacopeia
The Standard of Quality™

USP Certificate

Alprazolam LOT I0G195


Molecular Formula
C₁₇H₁₃ClN₄
Molecular Weight
308.76
CAS Number
28981-97-7
LABEL TEXT

For use with specified USP-HPLC Tests. Not for use as a drug. Read MSDS before using.

REFERENCE STANDARD

ALPRAZOLAM CIV 200 mg

NDC # 00216-0104-05

WARNING! Reproductive Hazard

Do not dry. For quantitative applications, use a value of 0.998 mg of alprazolam per mg of material on the as is basis. Keep container tightly closed.

CAT. NO. 1015008 USP ROCKVILLE, MD LOT I0G195



USP certifies that the USP Reference Standards Committee, in accordance with their rules and procedures, determined that this USP Reference Standard lot is suitable to assess compliance with the monograph standards for which it is specified. The critical characteristics of this lot are usually determined independently in three or more laboratories, including USP, government, academic, and industrial collaborators.

QA Director

Figura 3. Certificado de análisis Estándar de Referencia USP alprazolam (1)

Calculation Value

Unless otherwise stated on the Reference Standard label, a value of 100.0% should be used in USP or NF compendial applications for which the use of this Reference Standard is intended. Please refer to the specific Reference Standard label for further information.

Expiration

Current lots are identified in the Official USP Reference Standards catalog. In some cases, the previous lot may still be considered official. If so, it is identified in the column marked "Previous Lot/Valid Use Date." Ordinarily, the previous lot is carried in official status for about one year after the current lot enters distribution.

It is the responsibility of each user to determine that this lot is current when used. To ensure up-to-date information, USP publishes the Official USP Reference Standards Catalog, which contains official lot designations. This information is also available on the USP web site, at www.usp.org, as well as in the bimonthly subscription publication, *Pharmacopeial Forum*.

Instructions for Use

Follow the instructions in the appropriate USP or NF Monographs and General Requirements for Tests and Assays of the current *USP-NF*. In the event that instructions on the label of this lot differ from those found in the current *USP-NF*, those on the label supersede any instructions listed in Chapter <11>.

Non-Monograph Use

The suitability of this Reference Standard for use in non-compendial applications is solely the responsibility of the user.

LEGAL NOTICE

USP MAKES NO REPRESENTATION OR WARRANTY WITH RESPECT TO THE ACCURACY, COMPLETENESS, OR CURRENTNESS OF THIS CERTIFICATE; AND USP SPECIFICALLY DISCLAIMS ANY OTHER WARRANTY, EXPRESS, IMPLIED, OR STATUTORY, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO, THE IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. USP DOES NOT WARRANT THAT THE INFORMATION CONTAINED HEREIN MEETS THE CUSTOMER'S REQUIREMENTS. USP SHALL NOT BE LIABLE ON ACCOUNT OF ANY SUCH ERRORS OR OMISSIONS.

USP Reference Standards are not intended for use as drugs, dietary supplements, or as medical devices.
This document is not a Material Safety Data Sheet.

This certificate may not be reproduced without the express written permission of USP.

Copyright 2007 The United States Pharmacopeial Convention, Inc. All rights reserved.

Figura 4. Certificado de análisis Estándar de Referencia USP alprazolam (2)

Anexo N° 3

Tabla 1. Valoración materia prima activa alprazolam: Esquema de inyecciones

Muestra	Vial	Lecturas	Test
Blanco	1	1 vez	Evaluación Carry Over
Estándar Trabajo	2	5 veces	Test de Aptitud del Sistema; variación del factor de respuesta $V_{FR} \leq 2 \%$
Estándar Control	3	5 veces	Test de Aptitud del Sistema; variación del factor de respuesta $V_{FR} \leq 2 \%$
Blanco	1	1 vez	Evaluación Carry Over
Muestra A	4	3 veces	Determinación concentración de la muestra con el estándar trabajo
Muestra B	5	3 veces	Determinación concentración de la muestra con el estándar trabajo
Muestra C	6	3 veces	Determinación concentración de la muestra con el estándar trabajo
Blanco	1	1 vez	Evaluación Carry Over
Estándar Trabajo	2	2 veces	Variación del factor respuesta $V_{FR} \leq 2 \%$
Estándar Control	3	2 veces	Variación del factor respuesta $V_{FR} \leq 2 \%$
Blanco	1	1 vez	Evaluación Carry Over

Anexo N° 4



Figura 5. Preparación de muestras del parámetro selectividad

*Procedimiento realizado en los tres medios de disolución.

**Procedimiento realizado a pH 1,2 y pH 4,5.

***Procedimiento empleado en la preparación de muestra del estudio de estabilidad.

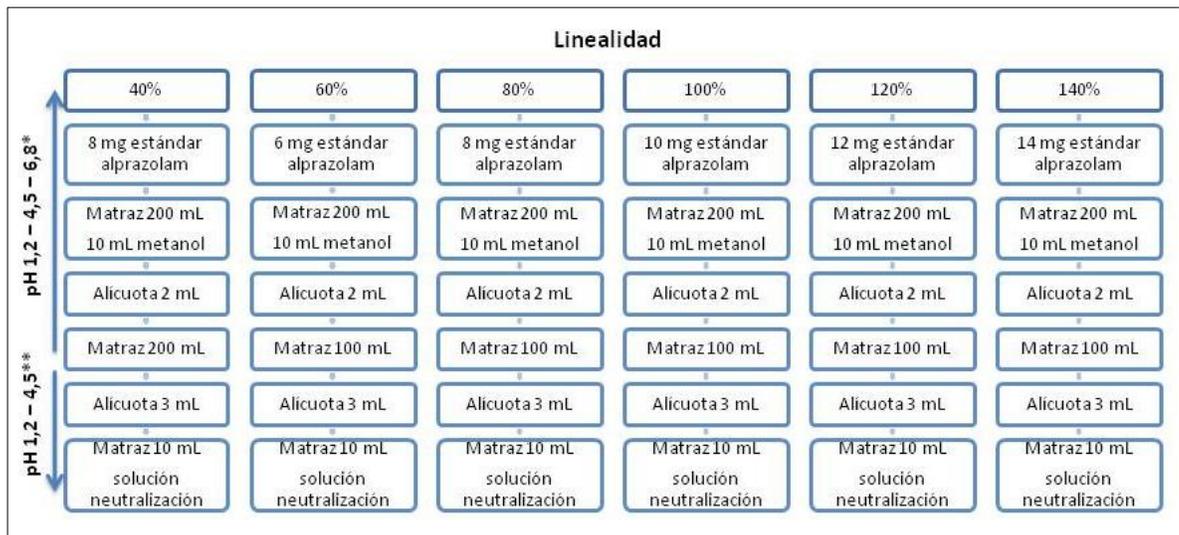


Figura 6. Preparación de muestras del parámetro linealidad

*Procedimiento realizado en los tres medios de disolución.

**Procedimiento realizado a pH 1,2 y pH 4,5.

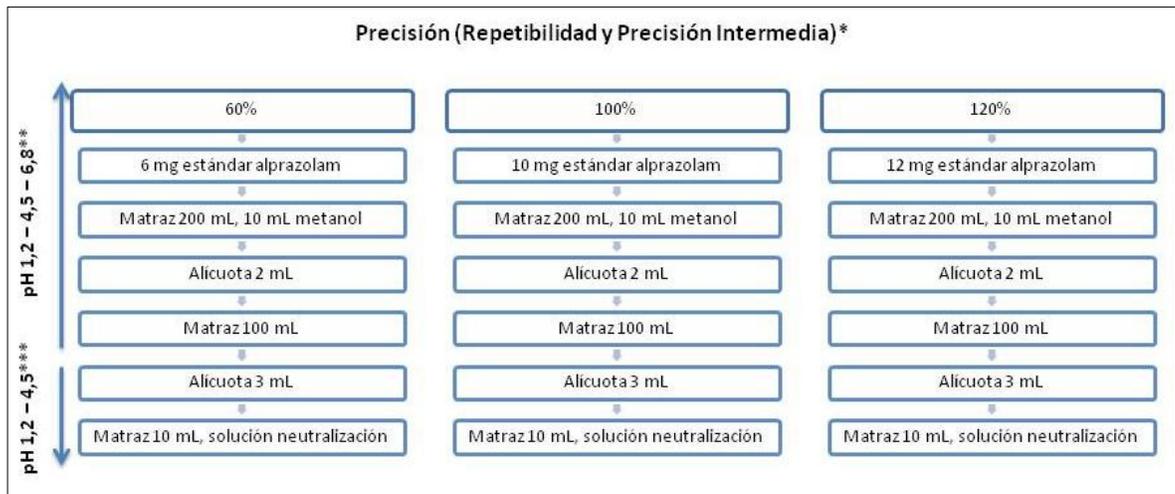


Figura 7. Preparación de muestras del parámetro precisión

*Tanto en repetibilidad como en precisión intermedia se efectuó el mismo procedimiento descrito, solo que en días diferentes.

**Procedimiento realizado en los tres medios de disolución.

***Procedimiento realizado a pH 1,2 y pH 4,5.

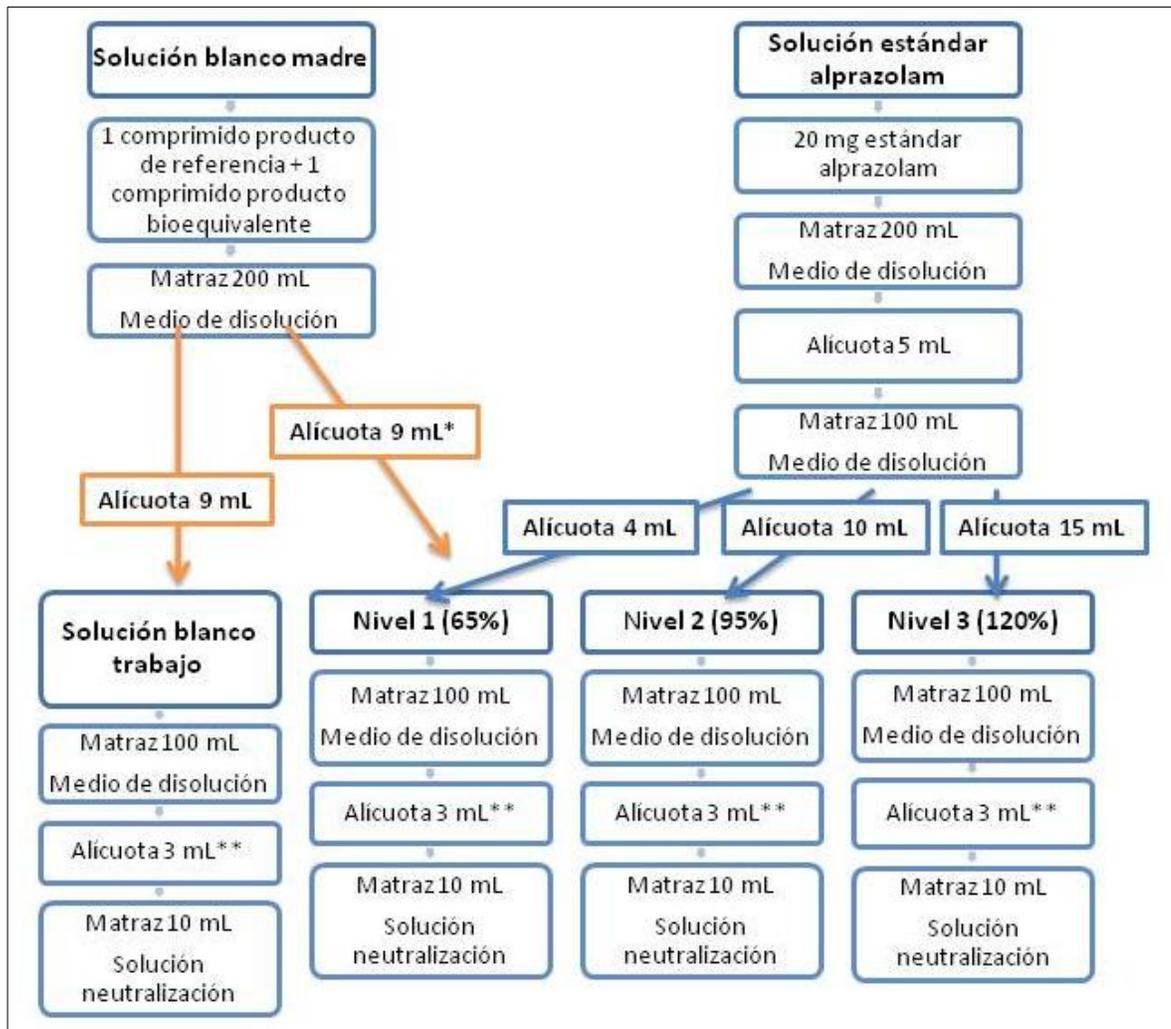


Figura 8. Preparación de muestras del parámetro exactitud

*Se adicionó una alícuota de 9 mL a cada nivel (nivel 1, nivel 2 y nivel 3).

**Procedimiento realizado a pH 1,2 y pH 4,5.

Anexo N° 5

	REPORTE DE VERIFICACIÓN DEL EQUIPO DISOLUTOR RG-03-IT-422.00-026	Actualización:03/05/2013
		VERSIÓN:1 Página 1 de 2

Folio: _____
R-DI- _____

1.0.- EQUIPO
 Equipo Disolutor (marca /modelo): Exweta DT-700
 Código Interno: EQ-DI-005

	Modelo	N° de Serie	N° Inventario
Equipo :	N/A	N/A	N/A
Bomba :	N/A	N/A	N/A
Muestreador Atomático :	N/A	N/A	N/A
Bomba de Muestreo :	N/A	N/A	N/A
Termometro :	—	—	—

2.0.- PARAMETROS A VERIFICAR

Verificación Física :

Nivel	CUMPLE	Veloc Rotac.	CUMPLE
Bamboleo	CUMPLE	Altura	CUMPLE
Centrado	CUMPLE		

Verificación Química :

Prednisona	
Paleta	Canastillo
CUMPLE	CUMPLE

3.0.- RESULTADOS

Verificación física :

Paleta

Vaso	Nivel (Horizont)	Bamboleo (ejes)		Centrado (eje/vaso)	Velocidad de rotación		Altura
		50 rpm	100 rpm		50 rpm	100 rpm	
1	OK	0,0	0,0	0,24	49,9	99,8	24,7
2	OK	0,0	0,0	0,90	49,9	99,9	25,1
3	OK	0,0	0,0	0,57	49,9	100,0	24,2
4	OK	0,0	0,0	0,46	49,9	99,9	24,0
5	OK	0,0	0,0	0,86	50,0	99,9	25,2
6	OK	0,0	0,0	1,14	50,0	100,0	25,2

Canastillo

Vaso	Nivel (Horizont)	Bamboleo (ejes)		Centrado (eje/vaso)	Velocidad de rotación		Altura
		50 rpm	100 rpm		50 rpm	100 rpm	
1	OK	0,0	0,01	0,24	49,9	99,8	24,3
2	OK	0,05	0,25	0,90	49,9	99,9	25,2
3	OK	0,02	0,01	0,57	49,9	100,0	24,0
4	OK	0,17	0,02	0,46	49,9	99,9	24,8
5	OK	0,03	0,07	0,86	50,0	99,9	24,9
6	OK	0,02	0,09	1,14	50,0	100,0	24,2

Figura 9. Verificación Equipo de Disolución (1)

 <p style="font-size: small;">Instituto de Salud Pública Ministerio de Salud Gobierno de Chile</p>	<p>REPORTE DE VERIFICACIÓN DEL EQUIPO DISOLUTOR RG-03-IT-422.00-026</p>	<p>Actualización: 03/05/2013</p> <hr/> <p>VERSION: 1 Página 1 de 2</p>
---	--	--

Verificación Química

Etapa 1:

Vaso	Prednisona (Paleta)	Prednisona (Canastillo)
1	35	65
2	31	73
3	30	71
4	28	72
5	31	73
6	33	77

Etapa 2:

Vaso.	Prednisona (Paleta)	Prednisona (Canastillo)
1	34	74
2	33	68
3	34	64
4	33	80
5	31	61
6	33	71

4.0.- REGISTROS

Hojas de trabajo	N° de Folio
Prednisona Paleta	
Prednisona Canastillo	

5.0.- CONCLUSIONES

Ca Di-005 cumple verificación física y verificación química (Etapa 2).

Fecha de próxima verificación:

6.0.- OBSERVACIONES

7.0.- ANALISTAS

Nombre	Firma
<i>Johnna Henríquez H.</i>	<i>JH</i>
<i>Mónica Varela M.</i>	<i>Mónica Varela M.</i>

8.0.- VºBº SUPERVISOR

[Firma]

Jefe (S) Sección Subdepto. Laboratorio Nacional de Control

FECHA DE TERMINO: *17-07-13*

Figura 10. Verificación Equipo de Disolución (2)

Anexo N° 6

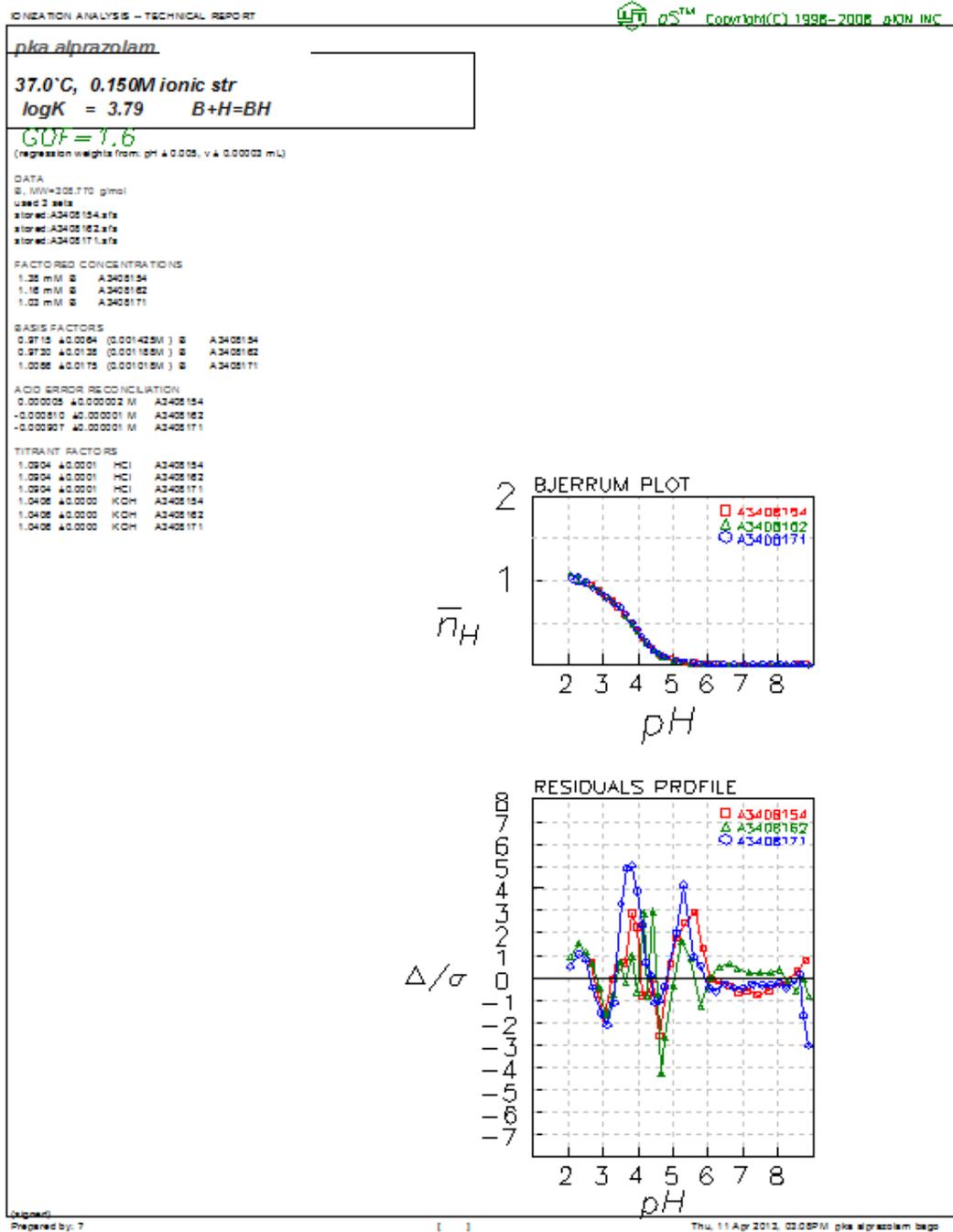


Figura 11. Resultado pKa materia prima activa alprazolam: Documento obtenido por Software pS

Anexo N° 7

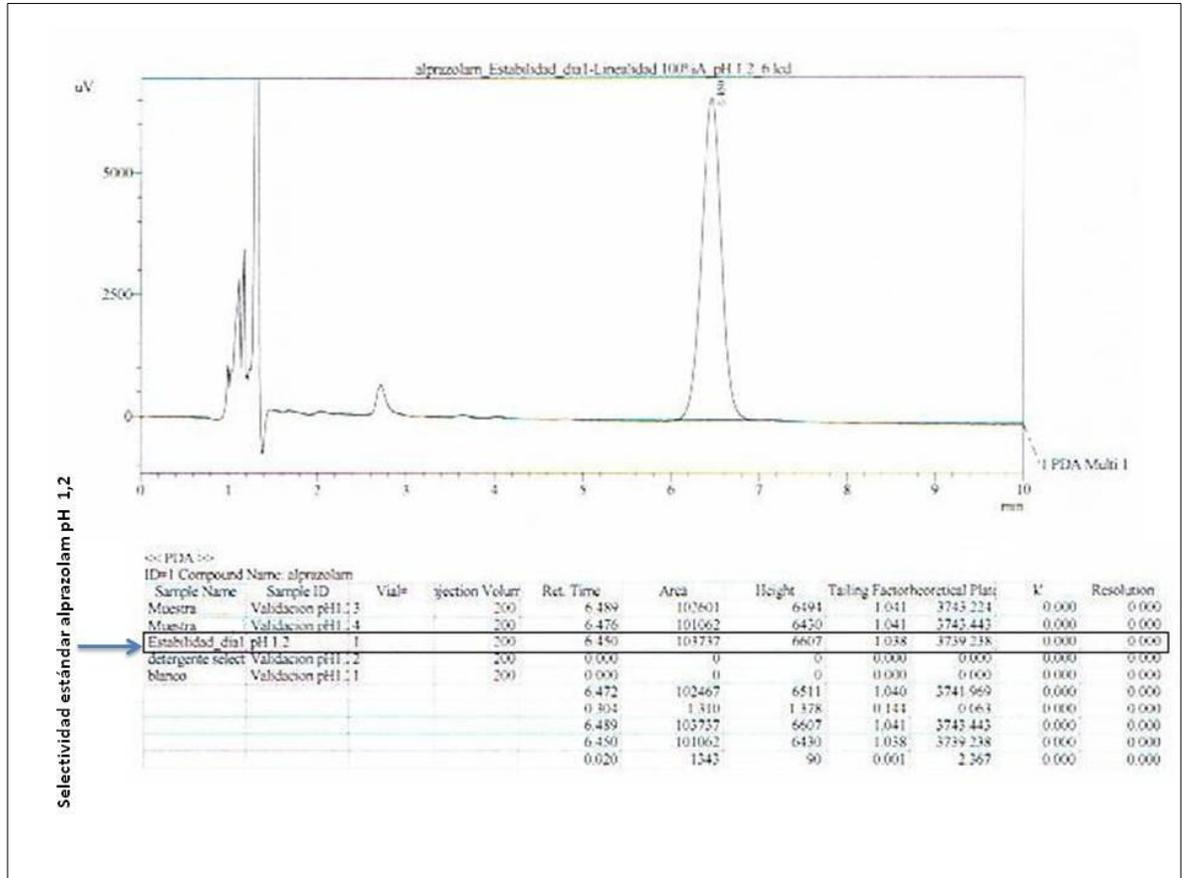


Figura 12. Selectividad pH 1,2: Cromatograma estándar alprazolam 100% de concentración de trabajo

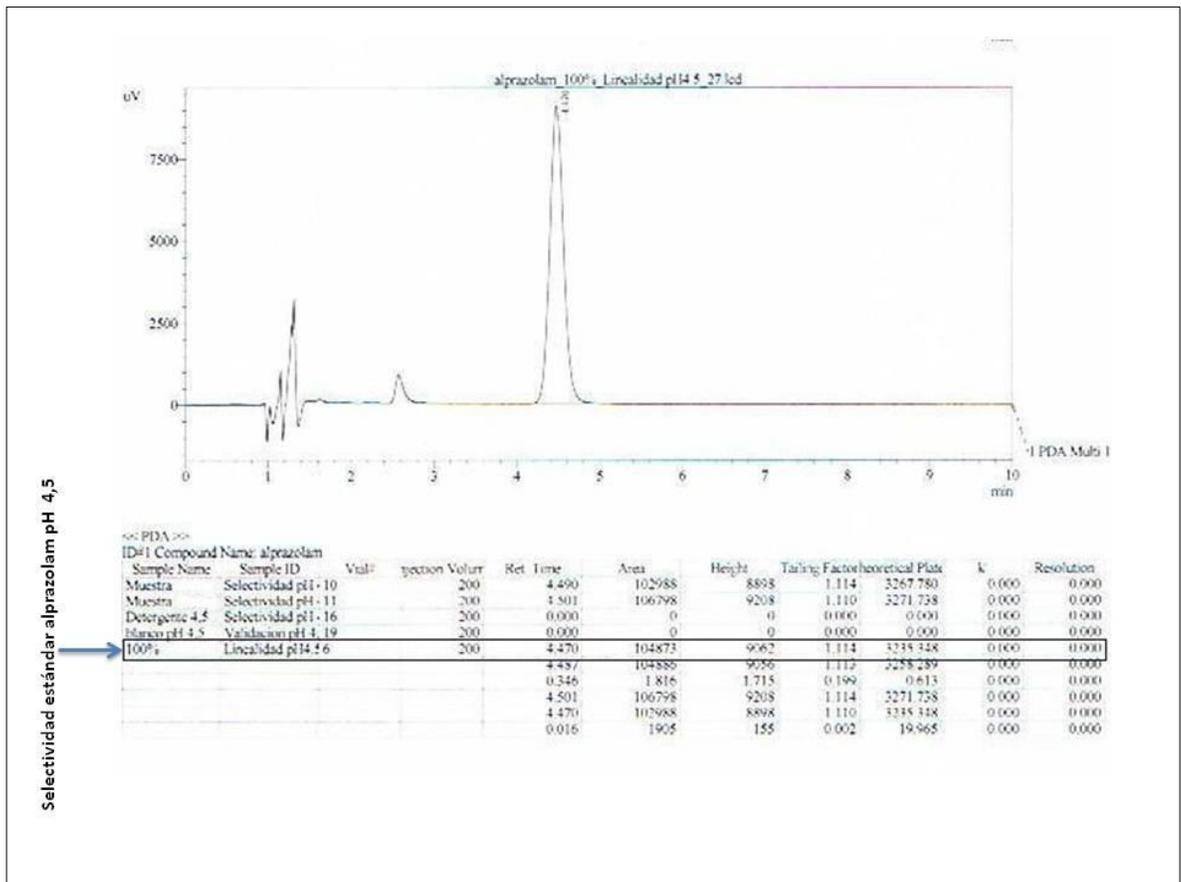


Figura 13. Selectividad pH 4,5: Cromatograma estándar alprazolam 100% de concentración de trabajo

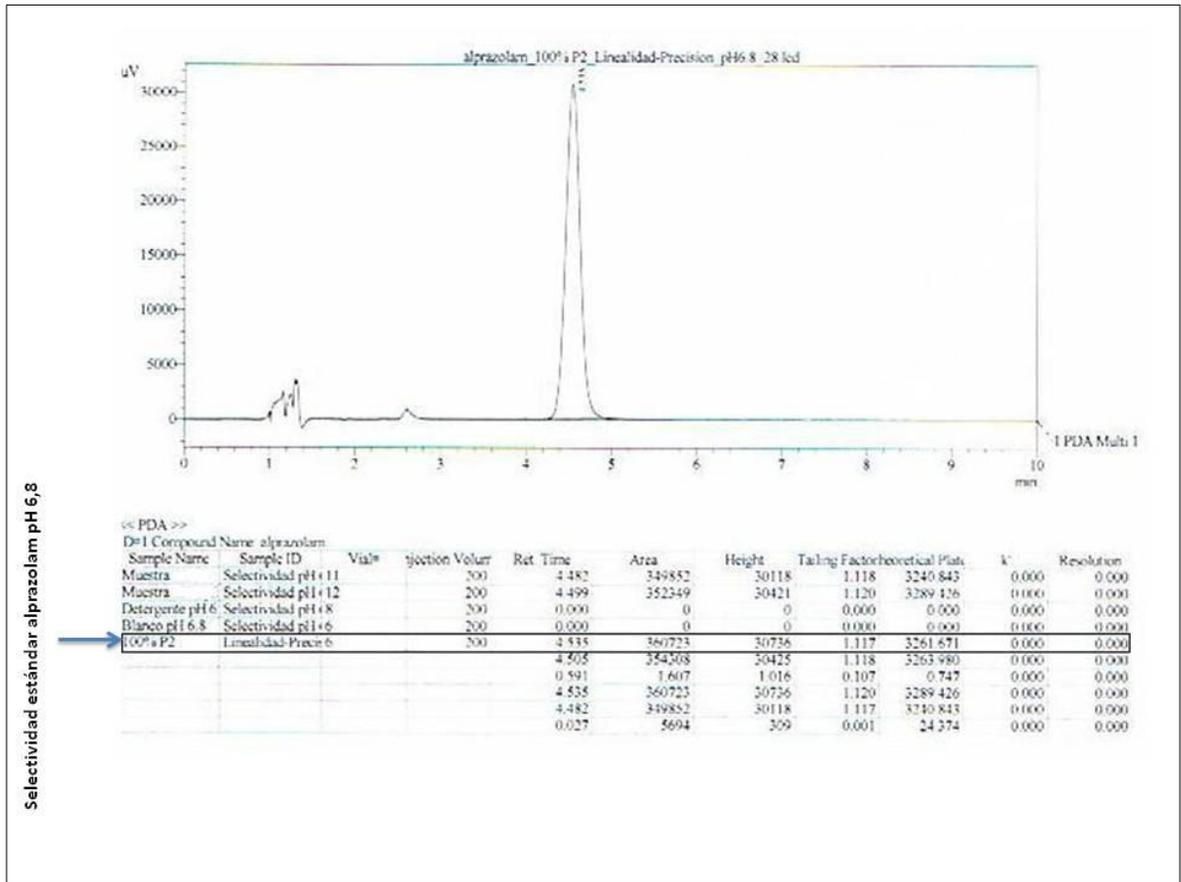


Figura 14. Selectividad pH 6,8: Cromatograma estándar alprazolam 100% de concentración de trabajo

Anexo N° 8

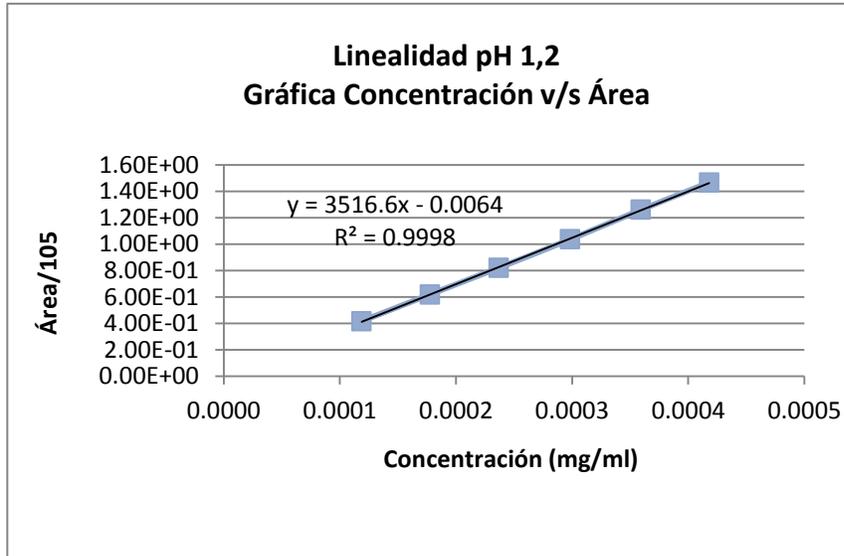


Figura 15. Linealidad pH 1,2: gráfica concentración en función del área

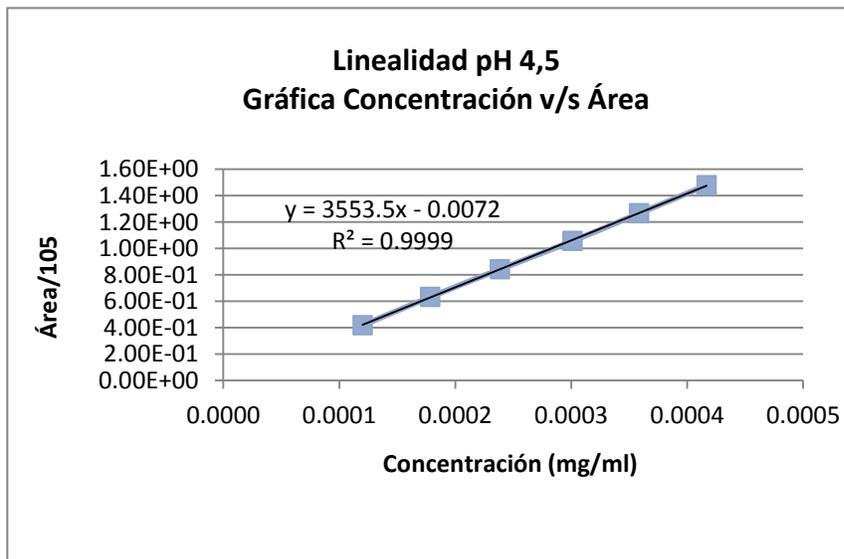


Figura 16. Linealidad pH 4,5: gráfica concentración en función del área

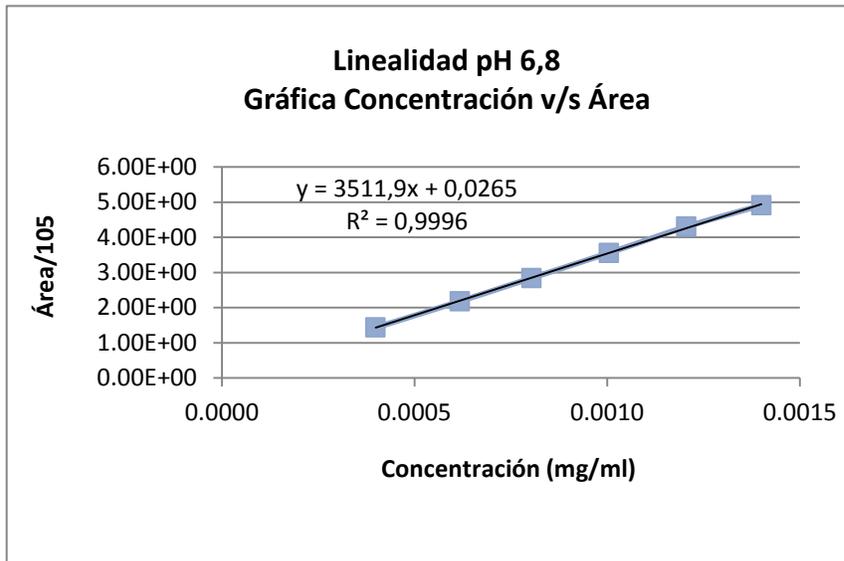


Figura 17. Linealidad pH 6,8: gráfica concentración en función del área

Anexo N° 9

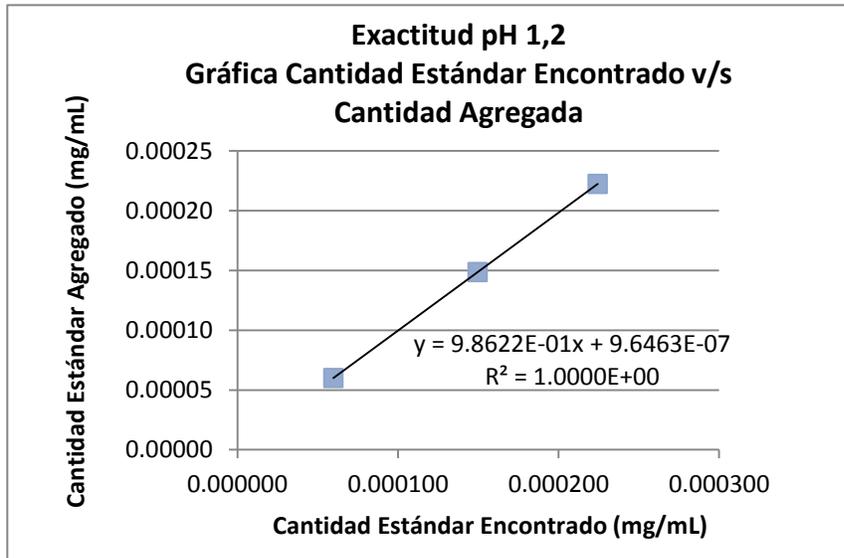


Figura 18. Exactitud pH 1,2: gráfico cantidad de estándar encontrando en función de la cantidad de estándar agregado

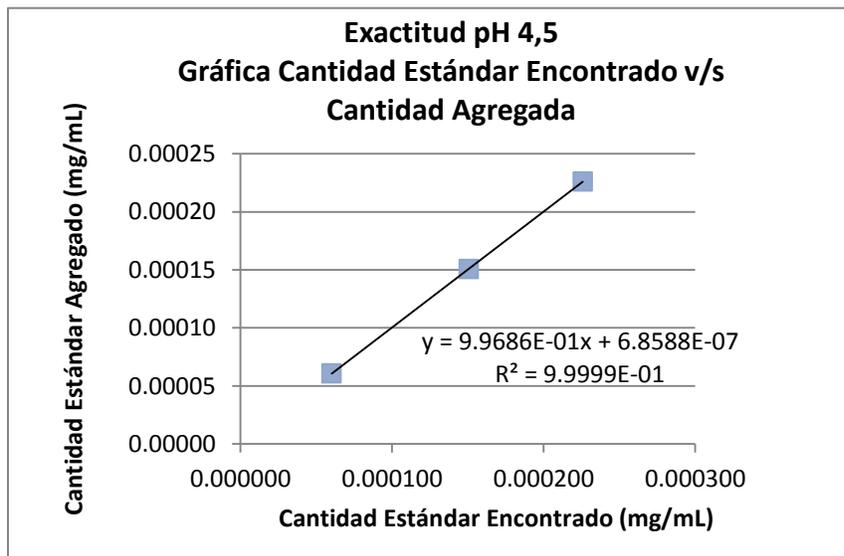


Figura 19. Exactitud pH 4,5: gráfico cantidad de estándar encontrando en función de la cantidad de estándar agregado

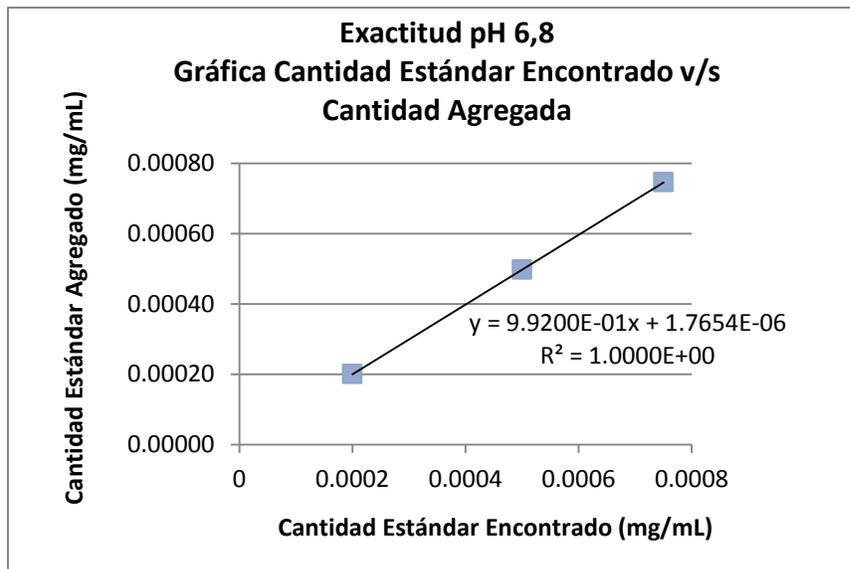


Figura 20. Exactitud pH 6,8: gráfico cantidad de estándar encontrando en función de la cantidad de estándar agregado