



FACULTAD DE FARMACIA
QUÍMICA Y FARMACIA

**“ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LIBERACIÓN
DISOLUCIÓN DE METFORMINA DESDE UN PRODUCTO
FARMACÉUTICO PARA SU POTENCIAL EMPLEO COMO
COMPARADOR EN ESTUDIOS DE
BIOEQUIVALENCIA/BIOEXENCIÓN”**

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

MAXIMILIANO ANDRÉS BARRAZA GÓMEZ

Director de Tesis: Q.F. Alexis Aceituno Álvarez, PhD.

VALPARAÍSO - CHILE

2011

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS	ii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INTRODUCCION	1
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECIFICOS	17
MATERIALES Y METODOS	18
1. EQUIPOS Y MATERIALES.....	18
2. REACTIVOS.....	19
3. PREPARACION DE SOLUCIONES.....	20
4. VALIDACION DEL METODO DE DISOLUCION.....	21
4.1. Prueba de aptitud del sistema.....	21
4.1.1. Calibración y Verificación del equipo de disolución.....	21
4.1.2. Verificación del equipo preparador de medios de disolución.....	22
4.1.3. Verificación del funcionamiento del equipo HPLC.....	23
4.2. Validación Técnica HPLC:.....	24
4.2.1. Especificidad.....	26
4.2.2. Estabilidad.....	27
4.2.3 Linealidad.....	27
4.2.4. Precisión.....	29
4.2.5. Exactitud.....	31
4.2.6. Robustez.....	32
5. DETERMINACION DE LOS PERFILES DE DISOLUCION.....	34
RESULTADOS Y DISCUSION	39
1. VALIDACION DEL METODO DE DISOLUCION.....	39
1.1. Prueba de aptitud del sistema.....	39
1.1.1. Calibración y Verificación del equipo de disolución.....	39
1.1.2. Verificación del equipo preparador de medios de disolución.....	40
1.1.3. Verificación del funcionamiento del equipo analítico HPLC.....	41
1.2. Validación del método analítico.....	42
1.2.1. Especificidad.....	42

1.2.2. Estabilidad.....	51
1.2.3. Linealidad.....	52
1.2.4. Precisión	54
1.2.5. Exactitud	58
1.2.6. Robustez.....	60
2. PERFILES DE DISOLUCION.....	63
2.1. Resultados Glucophage.....	63
2.2. Resultados Glafornil.....	65
3. COMPARACION DE PERFILES DE DISOLUCIÓN.....	68
CONCLUSIONES	75
REFERENCIAS	76
ANEXOS	86
ANEXO I.....	86
1) RESULTADOS CALIBRACION QUIMICA EQUIPO DISOLUTOR	86
2) RESULTADOS CALIBRACION MECANICA EQUIPO DISOLUTOR	87
ANEXO II.....	88
CERTIFICADOS DE ANALISIS DE ESTANDAR Y PRODUCTOS FARMACEUTICOS UTILIZADOS EN EL ANALISIS.	88

RESUMEN

La metformina químicamente corresponde a una biguanida, de administración oral con efecto antihiperглиcemiante, que se emplea en el tratamiento de la diabetes mellitus no insulino-dependiente y como coadyuvante en pacientes en terapia insulínica. Este principio activo se categoriza como Clase III de acuerdo al sistema de clasificación biofarmacéutico.

El presente trabajo de tesis tuvo como propósito la determinación y análisis de los perfiles cinéticos de liberación-disolución *in vitro*, de los productos de referencia para estudios de bioexención en formas farmacéuticas sólidas que contienen 850 mg de metformina clorhidrato, con la finalidad de evaluar las cinéticas respectivas y establecer si se ajustan a los requisitos establecidos en el marco regulatorio de la bioexención, esto es, perfiles cinéticos de muy rápida liberación-disolución.

Para la cuantificación del principio activo se utilizó como metodología analítica la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y para las pruebas de disolución, se empleó un equipo de disolución manual.

Los resultados de los perfiles cinéticos de metformina a partir de los productos de referencia demostraron que éstos no cumplen la condición de muy rápida disolución. Asimismo, la comparación de estos perfiles demostró que los productos considerados como referencia por la autoridad sanitaria, presentan diferencias en su patrón de liberación, en los distintos medios de disolución, lo que podría ser atribuible a diferencias en la manufactura.

ABSTRACT

Metformin chemically corresponds to a biguanide, of oral administration with antihyperglycemic effect, that it is used in the treatment of non insulin dependent diabetes mellitus and as an adjuvant in insulin therapy patients. This active pharmaceutical ingredient is categorized as Class III according to the biopharmaceutical classification system.

This thesis study was aimed at the determination and analysis of the *in vitro* dissolution-release kinetic profiles of the reference products for biopharmaceutics studies with biowaiver purposes, of pharmaceutical solid dosage forms containing 850 mg of metformin hydrochloride, in order to evaluate the respective kinetic and establishing whether they fulfilled the requirements determined in the biowaiver application regulatory framework, which is, very rapid dissolution-release kinetic profiles.

For the quantification of the active pharmaceutical ingredient the analytical method used was the high performance liquid chromatography (HPLC), whereas dissolution tests were performed by the use of a manual dissolution apparatus.

The kinetic profiles results of metformin from the innovative products showed that they fail to meet the very rapid dissolution condition. Furthermore, the comparison of these profiles showed that the products concerned as reference by the bureau of health, differ in their release pattern in the different dissolution medias, which could be attributable to manufacturing differences.

INTRODUCCION

El aumento del número de productos farmacéuticos disponibles en el mercado global, derivado de la mayor esperanza de vida y diversificación de los tratamientos farmacológicos disponibles, ha producido un rápido crecimiento tanto del consumo de medicamentos como del gasto correspondiente. Sin embargo, millones de pacientes en el mundo carecen del acceso a medicamentos de calidad con eficacia y seguridad comprobadas, ya sea porque no están disponibles, por su alto costo, o porque no existen servicios adecuados o profesionales capacitados para prescribirlos ¹.

Para la Organización Mundial de la Salud (OMS) el acceso a los medicamentos se ha convertido actualmente en una parte fundamental del derecho de salud para el ser humano, ya que éstos desempeñan un papel crucial en muchos aspectos de la atención de salud ².

Para aumentar la cobertura con medicamentos, principalmente por razones de tipo económicas, las autoridades sanitarias de países desarrollados y en vías de desarrollo han impulsado el desarrollo y comercialización de los “medicamentos genéricos bioequivalentes”, que de acuerdo a la denominación internacional dada por los expertos de la OMS, se definen como aquellos medicamentos que han demostrado a través de estudios de bioequivalencia, tener la misma calidad en términos de seguridad y eficacia con respecto al

medicamento innovador y que su dispensación es autorizada una vez caducada la patente de este último ^{3,4}.

El medicamento de referencia (o comparador) se refiere al medicamento original o producto farmacéutico innovador, el cual es la primera especialidad farmacéutica que obtiene la autorización de comercialización e inscripción en el registro de medicamentos, y comúnmente corresponde a uno que cuenta o ha tenido protección por patentes ⁵. Descubierta y desarrollado por una compañía farmacéutica de investigación, el producto innovador es aprobado por las agencias de registro de medicamentos sobre la base de antecedentes científicos y técnicos de eficacia, seguridad y calidad ⁶.

A nivel internacional, los países que históricamente han reconocido la protección patentaria, autorizan el registro y comercialización de productos genéricos, después del vencimiento de la patente del producto innovador ⁷. Previo a la autorización de un registro, se requiere la realización de estudios que permitan establecer la equivalencia terapéutica (EQT), los que reemplazan a los costosos y complejos estudios de investigación y desarrollo, preclínicos y clínicos realizados por los laboratorios innovadores, debido a que el principio activo ya ha sido completamente evaluado ⁸.

Según estadísticas de Abril del 2011, el 20,3 % de los productos comercializados en Chile corresponde a productos de marca o innovadores, el 47,4% corresponde a genéricos con marca de fantasía y el 32,3 % a productos genéricos, que llevan el nombre del principio activo ⁹. En este contexto, ocho de cada diez medicamentos en Chile son productos que se expenden por

denominación genérica o como similares, que junto a Estados Unidos, donde esta cifra llega al 78%, son los países con mayores niveles de penetración de genéricos¹⁰.

Desde el año 2004, en nuestro país se encuentra en proceso de implementación y aplicación una “*Política de genéricos bioequivalentes*”¹¹. El Ministerio de Salud y el Instituto de Salud Pública de Chile, en un trabajo conjunto, llevaron a cabo modificaciones al Reglamento del Sistema Nacional de Control de Productos Farmacéuticos, destinados a avanzar en lo que respecta a EQT. Paralelamente, la Sección de Biofarmacia del Departamento de Control Nacional del Instituto de Salud Pública de Chile, elaboró a fines del año 2005 la “Norma que Define Criterios para Establecer Equivalencia Terapéutica a Productos Farmacéuticos en Chile”, definiendo los principios activos contenidos en productos farmacéuticos, a los cuales se les deberá exigir estudios de bioequivalencia *in vivo* o estudios *in vitro* (bioexención)¹². Este listado ha sido acordado sobre la base del riesgo sanitario, entre otros aspectos, y se ha actualizado con el transcurso de los años.

En enero de este año se estableció como fecha de inicio de la exigencia de estudios para demostrar EQT de 28 principios activos dosificados en formas farmacéuticas orales de liberación convencional¹³. Éstos sumados a los 15 contenidos en las listas anteriores de los años 2008 y 2009¹⁴⁻¹⁶, generan un total de 43 moléculas.

Para cada principio activo, el ISP definió los productos de referencia y estableció como plazo final a enero del 2012 para la presentación de estudios que permitan

asegurar la intercambiabilidad de los productos (EQT). En el caso de los productos farmacéuticos similares con registro vigente que no presentaren estudios de EQT en el plazo señalado, éstos se exponen a medidas que aún no han sido definidas por la autoridad sanitaria ¹³.

Para obtener el estatus de equivalente terapéutico en nuestro país, los productos deben: ser equivalentes farmacéuticos, contar con su registro sanitario vigente en el Instituto de Salud Pública, ser aprobados como seguros y efectivos, estar adecuadamente rotulados, ser elaborados en cumplimiento con las Buenas Prácticas de Manufactura (cGMP) y con los procesos de manufactura validados para entregar evidencia documentada de que el proceso es capaz de entregar de manera confiable y reiterada un producto de la calidad requerida. Además deben demostrar ser bioequivalentes o eficaces y seguros a través de estudios apropiados ¹⁷. No obstante las condiciones anteriores, la Organización Mundial de la Salud ha ampliado esta consideración a los productos que son alternativas farmacéuticas ¹⁸.

Los equivalentes farmacéuticos, se definen como productos farmacéuticos que contienen idénticas cantidades de los mismos principios activos (o sus sales o ésteres), en idéntica forma farmacéutica y vía de administración y cumplen con las mismas (o comparables) especificaciones de calidad, pero no necesariamente contienen los mismos excipientes ¹⁷. Como alternativas farmacéuticas se entienden aquellos productos que contienen la misma dosis molar del principio activo, pero en diferente forma farmacéutica y/o diferente forma química. Las alternativas farmacéuticas liberan el mismo principio activo por la misma vía de

administración pero no son equivalentes farmacéuticos y pueden o no ser equivalentes terapéuticos con el producto de referencia ¹⁸.

Se reconocen internacionalmente diversos métodos para establecer EQT entre productos farmacéuticos, siendo actualmente los más utilizados los Estudios de Biodisponibilidad Comparativa (Bioequivalencia) y los estudios *in vitro* que permiten optar a bioexenciones ^{19,20}.

La Biodisponibilidad (BD) se define como la velocidad y cantidad de un principio activo o fracción activa de un medicamento que es absorbida a partir de la forma farmacéutica administrada y que queda disponible en el sitio de acción ²¹. Este concepto permite predecir el comportamiento de un principio activo en el organismo y está relacionado con el efecto farmacológico de manera objetiva ^{18,22}.

Desde un punto de vista práctico esta definición plantea problemas, puesto que es difícil obtener un modelo de estudio que permita medir la cantidad y velocidad de un principio activo en el sitio de acción, es por eso que se plantea una segunda definición que señala que la BD es la velocidad y cantidad de principio activo que llega a la circulación sistémica ²³. Por lo tanto, para que un medicamento administrado por vía oral sea disponible en un 100%, toda la dosis contenida en una formulación debe pasar completamente a la circulación, esto significa que:

- El fármaco debe ser liberado por completo de la formulación
- Debe disolverse por completo y ser estable en los fluidos gastrointestinales

- Atravesar la barrera gastrointestinal hasta la circulación mesentérica e hígado sin ser metabolizado.
- Pasar a través del hígado hacia la circulación sistémica sin presentar cambios ²⁴.

Cualquier hecho que afecte el paso del fármaco a la circulación sistémica, influirá sobre la BD de éste ²⁴.

La BD de un fármaco también dependerá de factores asociados a la formulación y a su fabricación o manufactura. Entre estos factores están: las propiedades fisicoquímicas de las partículas farmacológicas liberadas en los fluidos gastrointestinales, la naturaleza y cantidad de disolvente, desintegrantes, lubricantes y humectantes, interacciones entre el fármaco y los excipientes, la presión de compactación y la velocidad de compresión usadas en la fabricación de comprimidos, y las condiciones de estabilidad como almacenamiento y caducidad. Es por ello que es necesario estudiar la formulación desde la perspectiva mecánica, para así desarrollar una forma de dosificación más optimizada ^{22,24}.

También es importante establecer si el principio activo adopta otra configuración o isoforma capaz de cristalizar, sea durante su síntesis o almacenamiento (polimorfismo). Este hecho se traduce en diferencias en características o propiedades físicas del estado sólido, que podrían afectar la dureza y densidad. Asimismo se alterarían propiedades fisicoquímicas como adsorción, punto de fusión, además de diferencias químicas en reactividad, estabilidad, solubilidad (por variación de energía), provocando consecuencias a

nivel farmacológico como: toxicidad, contraindicaciones, ineficacia, efectos secundarios y por ende menor biodisponibilidad ^{25,26}.

Los estudios que se utilizan para comparar la biodisponibilidad de dos formulaciones que contienen el mismo principio activo se denominan ensayos de bioequivalencia.

La bioequivalencia se define como la ausencia de una diferencia estadísticamente significativa en la velocidad y la cantidad de ingrediente activo que es absorbida, entre una formulación de referencia (innovador) y una formulación de prueba (producto similar), que se administran en la misma dosis molar bajo condiciones experimentales estandarizadas ²⁰. Si dos productos poseen una biodisponibilidad comparable, se espera entonces que generen un perfil plasmático semejante, y que la respuesta terapéutica sea similar, considerándose productos terapéuticamente intercambiables.

Los estudios *in vivo* que permiten asegurar la EQT son necesarios para ^{17-20,27,28} :

- a) Productos farmacéuticos de liberación inmediata, administrados por vía oral con acción sistémica, cuyos principios activos:
 - Poseen margen terapéutico estrecho.
 - Poseen curva dosis – respuesta muy pronunciada.
 - Presentan farmacocinética complicada por absorción incompleta o variable o no lineal (dependiente de la dosis en las proximidades del margen terapéutico).

- Presentan ventana de absorción a nivel del tubo intestinal.
 - Presentan eliminación presistémica o metabolismo de 1º paso elevado (> 70 %).
 - Presentan propiedades fisicoquímicas desfavorables, que no hayan sido corregidas en la formulación del producto.
- b) Presentan evidencia documentada de que hay problemas de biodisponibilidad.
- c) Productos farmacéuticos no orales ni parenterales, diseñados para que el principio activo se absorba y distribuya a nivel sistémico.
- d) Productos farmacéuticos formulados en asociaciones fijas, de liberación convencional, diseñados para que las sustancias activas se absorban y distribuyan a nivel sistémico, que contengan un principio activo que no les permita optar a una bioexención.

Los productos farmacéuticos que están exentos de los estudios *in vivo* son aquellos que presentan una relación biodisponibilidad/bioequivalencia “evidente por sí misma”, como las soluciones acuosas inyectables (intravenosas, intramusculares, subcutáneas e intratecales), soluciones acuosas de uso ótico y oftálmico, soluciones de uso oral (elixires, jarabes), fármacos en forma de gases o vapores, polvos para reconstitución como solución y los principios activos que puedan demostrar EQT a partir de estudios de bioexención^{29,30}.

Un estudio de bioexención es la alternativa al estudio de bioequivalencia *in vivo* por medio de la demostración de EQT terapéutica *in vitro* (pruebas que establecen el perfil cinético de disolución de un principio activo desde una forma farmacéutica sólida, con el fin de predecir su comportamiento *in vivo*)^{17,24} para un grupo de fármacos que cumplen los requisitos señalados por el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB) propuesto por Amidon y Col., en 1995³¹.

La prueba consiste en el estudio comparativo de los perfiles de disolución *in vitro* entre el producto farmacéutico similar y el innovador pudiendo además, utilizar la correlación *in vitro/in vivo* para indicar el desempeño de productos farmacéuticos similares en situaciones particulares. En la práctica este método presenta ventajas sobre los estudios *in vivo*, como su menor variabilidad, facilidad de control y mayores probabilidades de detectar diferencias entre dos productos farmacéuticos, si es que existen³². Además excluye la dependencia del reclutamiento de sujetos humanos para el estudio, hecho que elimina la posibilidad de efectos tóxicos en los voluntarios por reacciones adversas a medicamentos. Además es un método más rápido y más económico³³.

El SCB categoriza a los fármacos en cuatro clases, tomando en cuenta tres factores principales que rigen la velocidad y el grado de absorción del principio activo desde formas farmacéuticas sólidas orales de liberación inmediata o convencional, que son: la solubilidad del API (ingrediente farmacéutico activo), la permeabilidad intestinal del API y la liberación-disolución a los diferentes pH del tubo digestivo de la forma farmacéutica que contiene al API. Todos estos factores determinan la biodisponibilidad de un producto farmacéutico^{29,34}.

Tabla I: Sistema de Clasificación Biofarmacéutico.

CLASE	SOLUBILIDAD	PERMEABILIDAD
1	Alta	Alta
2	Baja	Alta
3	Alta	Baja
4	Baja	Baja

Un fármaco se considera altamente soluble cuando la dosis terapéutica más elevada empleada es soluble en 250 mL o menos de medio acuoso en un intervalo de pH de 1,0 a 6,8. Por otro lado, un fármaco es altamente permeable cuando el grado de absorción intestinal (fracción de dosis absorbida) de una sustancia medicamentosa en humanos, es mayor o igual al 90% de una dosis administrada basada en el balance de masa o en comparación a una dosis intravenosa de referencia ²⁹.

Así, para los fármacos Clase I del SCB (alta solubilidad-alta permeabilidad) que demuestren una rápida disolución *in vitro* ($\geq 85\%$ de la cantidad declarada del fármaco disuelto en 30 minutos o menos) utilizando las condiciones y métodos de prueba recomendados, pueden optar a bioexención, ya que proporcionarían evidencia suficiente de una rápida disolución *in vivo*, asegurando de esta manera bioequivalencia *in vivo* ^{19,29}.

Sin embargo, para los productos clasificados por el SCB como Clase III (alta solubilidad-baja permeabilidad) la OMS ha sugerido que la posibilidad de bioexención sea extensiva para aquellos que presenten la propiedad de muy

rápida disolución ($\geq 85\%$ de la cantidad declarada del fármaco disuelto en 15 minutos o menos) en los 3 medios de disolución establecidos (pH 1,2; 4,5 y 6,8).³⁵

De acuerdo al SCB, la metformina clorhidrato corresponde a un fármaco de Clase III, es decir, de alta solubilidad y baja permeabilidad. Esta clasificación se basa en sus características fisicoquímicas, ya que es una molécula altamente soluble en agua³⁶ y en soluciones amortiguadoras de ácido clorhídrico pH 1,2; acetato pH 4,5 y fosfato pH 6,8³⁵, y poco permeable en membranas celulares³⁷.

Los principios activos de muy rápida disolución de la Clase III del SCB pueden tener un comportamiento *in vivo* similar a una solución oral, por lo que se espera que la permeabilidad a través de las membranas biológicas sea el paso crítico en la absorción de la molécula, puesto que si éstos presentan una rápida disolución en todos los medios de pH fisiológico tendrían un comportamiento *in vivo* similar al de una solución oral^{38,39}. Por ello, la cinética de absorción desde el tracto gastrointestinal sería dependiente de la fisiología del individuo más que de factores inherentes a la formulación, siempre que los excipientes no tengan efectos determinantes sobre el tránsito ni la permeabilidad del fármaco²⁹.

Metformina clorhidrato es una biguanida oral con efecto antihiperlicémico, que se emplea en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo I y II⁴⁰. Se obtiene de la reacción del clorhidrato de dimetilamina con dicindiamida⁴¹. La metformina químicamente corresponde a una base hidrofílica fuerte, ya que presenta un alto pKa (11,5), por lo que predomina su forma ionizada en el tracto gastrointestinal y a pH fisiológico²⁹. Por lo tanto, dado que la molécula presenta grupos ionizables, es esperable que puedan presentarse interacciones del tipo

iónicas con componentes del mismo sitio de absorción o con otros excipientes de la forma farmacéutica ⁴².

El fármaco disminuye tanto la glucosa basal como la postprandial, pero no estimula la secreción de insulina y por tanto no produce hipoglicemia ⁴³.

El efecto de la metformina está basado en 3 mecanismos de acción:

- a) Reduce la producción de glucosa hepática inhibiendo la gluconeogénesis y glicogénesis.
- b) En los músculos, aumentando la sensibilidad de la insulina, mejorando la ingesta y administración periférica.
- c) Demora en la absorción de glucosa intestinal ⁴³.

Adicionalmente, la metformina estimula la síntesis glucogénica intracelular actuando sobre la síntesis de glicógeno. Además, aumenta la capacidad de movilidad de todos los tipos de transportadores de glucosa de membrana ⁴⁴.

En humanos, independientemente de su acción antidiabética, metformina tiene un efecto favorable sobre el metabolismo de las lipoproteínas. Lo que se ha demostrado en dosis terapéuticas en estudios controlados, a mediano y largo plazo: La metformina reduce el colesterol total, el colesterol LDL y los niveles de triglicéridos ⁴⁵.

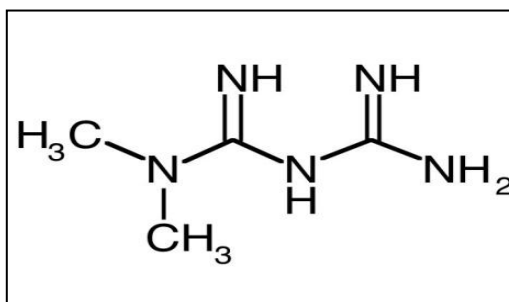


Figura 1: Estructura química de la molécula metformina: 3-(diaminometilidin)-1,1-dimetilguanidina.

En cuanto a sus propiedades farmacocinéticas, presenta una biodisponibilidad oral absoluta de 40-55% ⁴⁶, su concentración plasmática máxima se produce en aproximadamente 2,5 horas tras la administración oral. La absorción de la metformina en el tracto gastrointestinal es dependiente de la dosis, y los alimentos disminuyen ligeramente la velocidad y magnitud de su absorción ^{47,48}. La unión a proteínas plasmáticas del fármaco es prácticamente insignificante y no sufre biotransformación, eliminándose casi por completo por la orina en forma activa ⁴⁶. Su vida media de eliminación plasmática es de 2 a 4 horas, por lo que debe administrarse 2 a 3 veces al día ⁴⁹. Las reacciones adversas más frecuentes son las gastrointestinales, tales como: anorexia, náuseas, molestias abdominales y diarrea que aparecen en más del 50% de los pacientes ⁵⁰.

El fármaco presenta un bajo coeficiente de partición (K) y la magnitud de la distribución entre una fase orgánica y una acuosa dependerá del pH de la primera (coeficiente de distribución). Estas características hacen que probablemente la permeabilidad intestinal o de membranas celulares se vea dificultada para este principio activo ⁵¹.

Sobre la base de los antecedentes expuestos anteriormente y el estudio comparativo realizado por Cheng y Cols (2004) ³⁵, en el cual se correlacionan los estudios de bioequivalencia *in vivo* con los perfiles de disolución *in vitro*, de comprimidos de metformina de 500 mg, se concluye que se justificaría la exención de estudios de bioequivalencia para las formas farmacéuticas convencionales que contengan este principio activo, basándose para ello, en la comparación de los perfiles de disolución mediante el cálculo del factor de similitud (f_2).

En Chile el producto de referencia para estudios de bioequivalencia o bioexención de metformina es Glucophage[®] Forte comprimidos recubiertos 850 mg, de Laboratorios Roche Chile Ltda., que ha sido sometido a estudios de comparación de perfiles de disolución *in vitro*, dando como resultado una imposibilidad de confirmar EQT, debido a que el producto utilizado como referencia no cumplió con el requisito de muy rápida disolución para fármacos clase III del SCB ($\geq 85\%$ del fármaco disuelto en 15 minutos) ^{8, 52}. Cabe destacar que las metodologías utilizadas en estos estudios fueron espectrofotometría UV.

En el caso del producto farmacéutico Glafornil[®] comprimidos recubiertos 850 mg, de laboratorios Merck S.A., posee el mismo licenciante (misma licencia de fabricación) que el producto Glucophage[®], que para ambos es Merck Sante S.A.S, Francia. Por lo que a partir de enero de este año es también considerado como producto de referencia ¹³.

A pesar de que las plantas de fabricación de ambos productos no son las mismas, Glucophage[®] es fabricado en Productos Roche S.A., México, y a su vez Glafornil[®] es fabricado en Merck Sante S.A.S, Francia ⁵³; es legítimo establecer

que ambos productos cumplen con los mismos requisitos farmacotécnicos, y que de acuerdo al marco regulatorio de los estudios biofarmacéuticos puedan optar a ser los productos farmacéuticos de referencia para establecer EQT a través de estudios de bioexención.

El presente estudio busca caracterizar los perfiles cinéticos de disolución de los productos de referencia para estudios de bioequivalencia de formas farmacéuticas sólidas que contienen metformina clorhidrato en la potencia de 850 mg, uno de los principios activos que tienen exigencia de presentación de estudios farmacocinéticos para establecer su EQT, con la finalidad de determinar el patrón de liberación-disolución de estos productos, contribuyendo con información científico-técnica que le permita a la autoridad regulatoria, tomar decisiones fundamentadas respecto de la posibilidad de subrogar los estudios de bioequivalencia en sujetos humanos para productos similares que contengan este principio activo en la dosis indicada.

HIPÓTESIS

Dado que la metformina se clasifica como perteneciente al grupo III del sistema de clasificación biofarmacéutico, y estudios anteriores con Glucophage no son concluyentes respecto de la posibilidad de bioexención, la determinación de las características de los perfiles cinéticos de los productos de referencia establecidos por la autoridad sanitaria: comprimidos convencionales de Glaformil® 850 mg, y Glucophage® 850 mg, permitirían dilucidar si estos productos cumplen con los requisitos farmacotécnicos y biofarmacéuticos para ser utilizados como referencia en los estudios in vitro con fines de bioexención.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si los productos farmacéuticos de referencia establecidos por la autoridad sanitaria: Glaformil[®] comprimidos convencionales, de 850 mg, y Glucophage[®] comprimidos convencionales, de 850 mg, presentan las características cinéticas de liberación disolución que satisfacen los requisitos del marco regulatorio de las Bioexenciones para fármacos Clase III del SCB.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar la validación de la metodología analítica en HPLC para la determinación cuantitativa del principio activo metformina clorhidrato y la calibración del equipo de disolución.
- Obtener, caracterizar y comparar los perfiles cinéticos de disolución de metformina clorhidrato desde los fármacos Glaformil[®] comprimidos convencionales, de 850 mg, y Glucophage[®] comprimidos convencionales, de 850 mg, en los medios buffer establecidos en los procedimientos para optar a bioexención (buffers en el rango de pH 1,2-6,8).
- Determinar de acuerdo a los resultados obtenidos, si los productos farmacéuticos Glaformil[®] y Glucophage[®], de 850 mg, permiten que sus características de liberación-disolución los consideren apropiados para ser utilizados como comparadores de los estudios biofarmacéuticos *in vitro* con fines de bioexención.

MATERIALES Y METODOS

1. EQUIPOS Y MATERIALES

- Equipo cromatógrafo HPLC Shimadzu LC-20A Prominence Liquid Chromatograph, equipado con sistema de inyección automática SIL-20A Prominence Autosampler, horno CTO-20AC Prominence Column Oven, detector SPD-M20A Prominence Diode Array Detector (DAD) (Longitud de onda de extracción para la detección de Metformina Clorhidrato = 236nm) e integrador CBM-20A Prominence Communicator Bus Module.
- Columna Kromasil 60-5CN packing L10 (250 mm de largo, diámetro interno 4,6 mm, tamaño de partícula de 5 μ) Azko Nobel.
- Equipo de disolución ERWEKA DT 700, aparato 2 a 75 rpm.
- Preparador de medios de disolución ERWEKA MediPrep 120.
- Purificador de agua Millipore, modelo Simplicity Simpakor 1.
- Balanza analítica Sartorius, modelo CP225D 0,00001 g.
- Balanza granataria Belltronic Scales, modelo ES-6000H.
- pH-metro Fisher Scientific, Accumment model 15.
- Baño ultrasónico MRC, modelo DC 150H.
- Baño ultrasónico Branson, modelo 8510.
- Agitador magnético con placa térmica Torrey Pines Scientific, modelo HS 1112.
- Campana Labconco.
- Filtros para jeringa de membrana GV PVDF 0,22 μ m, Millipore.

- Filtros de membrana de ésteres de celulosa 0,22 μm , Millipore.
- Medidor de oxígeno disuelto ECDO6 Handy 12mm Dissolved Oxygen Sensor, Eutech Instruments.
- Micropipeta Eppendorf Research P-200.
- Bomba de vacío marca Welch Dry Fast, modelo 2037.
- Material de vidrio tipo A.

2. REACTIVOS

- Estándar secundario de metformina clorhidrato MERCK (primarizado con estándar USP metformina clorhidrato); Pureza: 100,3%.
- Estándar prednisona RS USP.
- Tabletas prednisona RS USP lote P0E203.
- Metanol grado HPLC (J.T.BAKER).
- Fosfato monobásico de potasio p.a. (J.T. BAKER).
- Acetato de sodio p.a. (MERCK).
- Acido acético glacial p.a. (MERCK).
- Acido clorhídrico 37% p.a. (Riedel de Haën).
- Cloruro de potasio p.a. (MERCK).
- Hidróxido de sodio lentejas p.a. (MERCK).

3. PREPARACION DE SOLUCIONES

- *Preparación de Solución Buffer pH 6,8:* Pesar 62 g de Fosfato monobásico de potasio, disolver en agua purificada con agitador mecánico y agregar 8 g de Hidróxido de sodio. Llevar a un volumen de 9 L con agua purificada. Agitar y ajustar a pH con soluciones de ajuste.
- *Preparación de Solución Buffer pH 4,5:* Pesar 26,2 g de Acetato de sodio, disolver en agua purificada con agitador mecánico. Agregar 126 mL de Ácido acético 2 N. Llevar a un volumen de 9 L con agua purificada. Agitar y ajustar a pH con soluciones de ajuste.
- *Preparación de Solución Buffer pH 1,2:* Tomar un volumen de 3 L de cloruro de potasio 0,2 N, agregar 3 L de Ácido clorhídrico 0,2 N, llevar a un volumen de 8 L con agua purificada con agitador mecánico y ajustar a pH con soluciones de ajuste.
- *Preparación de Solución de Ácido acético 2 N:* Medir 58 mL de Ácido acético glacial y transferir a un matraz de 500 mL aforando con agua purificada.
- *Preparación de Solución de Cloruro de Potasio 0,2 N:* Pesar 70 g de Cloruro de potasio, disolver en agua purificada con agitador mecánico en un matraz aforado a 2 L.
- *Preparación de Solución de Ácido Clorhídrico 0,2N:* Medir 36 mL de Ácido clorhídrico al 37% p/v, y disolver con agua purificada en un matraz de 2 L con agitador mecánico.

- *Solución para ajuste de pH: Hidróxido de Sodio 2 M:* Pesar 40 g de Hidróxido de sodio y disolver en matraz de 500 mL y llevar a volumen con agua purificada.
- *Solución para ajuste de pH: Ácido Fosfórico al 85%:* Medir 85 mL de Ácido fosfórico, transferir a matraz de 100 mL, adicionar 15 mL de agua purificada y mezclar⁵⁴.

4. VALIDACION DEL METODO DE DISOLUCION

4.1. Prueba de aptitud del sistema

4.1.1. Calibración y Verificación del equipo de disolución.

a) *Calibración mecánica:*^{17,55}

La calibración mecánica del equipo de disolución se llevó a cabo utilizando *un kit de validación/calificación* ERWEKA con certificación al día. Este kit contiene elementos como tacómetro, nivel de burbuja, medidor de vibraciones, caliper, compás, vástago centrador y una base medidora de altura del elemento de agitación.

Las operaciones que se llevaron a cabo fueron:

- Inspección del equipo que comprenda: geometría, nivel del baño y vibración externa presente.
- Inspección visual general del equipo: limpieza, detección de grietas, roturas, etc.

- Inspección del sistema de agitación: verticalidad, centrado de los vástagos, altura, velocidad de rotación.
- Verificar el centrado de los vasos.
- Comprobar la altura de las paletas o canastillos.
- Examinar el sistema de muestreo (limpio y uniforme en todos los vasos).
- Verificar la desgasificación del medio de disolución.
- Revisar la temperatura del medio de disolución y fluctuaciones.

b) Calibración química: ^{12,54,56}

Se realizaron pruebas que permitieron garantizar la confiabilidad del equipo de disolución, para esto se utilizaron comprimidos calibradores USP de prednisona, cuya certificación es trazable. Los resultados de estas pruebas deben estar dentro de los límites de aceptación del lote evaluado.

4.1.2. Verificación del equipo preparador de medios de disolución ERWEKA MediPrep 120.

El equipo MediPrep 120 es un equipo preparador de medios para test de disolución que es capaz de reducir el oxígeno disuelto a menos de 5 ppm y ambientarlo a temperatura de trabajo ($37\pm 5^{\circ}\text{C}$). El equipo realiza la desgasificación del medio, llevándolo a vacío y haciéndolo recircular. Este proceso se ve favorecido al aumentar la temperatura del medio a $\sim 41^{\circ}\text{C}$ como lo recomienda el método de desgasificación de la USP ^{54, 57}.

Se verificó la capacidad del equipo, analizando el grado de desgasificación y dispensación. La desgasificación se evaluó utilizando un medidor de oxígeno disuelto, comparando los resultados al analizar el medio (agua bidestilada) antes y después del proceso de desgasificación. El resultado se expresa partes por millón (ppm) de oxígeno disuelto, calibrando el instrumento a 100% cuando el electrodo se encuentra expuesto al aire. Se realizaron tres lecturas al agua sin desairear y cinco lecturas al agua posterior a la desgasificación e inmediatamente después de ser dispensada.

Para la dispensación, se pesaron 5 dispensaciones de 900 mL en vasos de disolución, luego se calculó el volumen en función de la densidad del agua a la temperatura comprendida entre 35 – 37°C. El peso requerido para estas mediciones debe ser de 894 g \pm 1% (885,06 – 902,94 g) y la exactitud de la dispensación respecto del valor nominal debe tener un error menor al 2%⁵⁷.

4.1.3. Verificación del funcionamiento del equipo HPLC

El ruido de la señal base se evaluó antes de cada análisis y siempre debe ser menor a 5×10^{-4} Volt. Esto se puede verificar en base a una opción que entrega el software del equipo (Shimadzu LCsolution), midiendo y calibrando la línea base de las mediciones.

Se verificó la intensidad de la lámpara de deuterio utilizada por el detector y la exactitud de longitud de onda a través de un sistema de autochequeo incluido en el software LCsolution⁵⁸.

Se realizó una prueba de aptitud del sistema (en las condiciones cromatográficas del método analítico empleado) por medio de un análisis de repetibilidad de lecturas de estándar de metformina clorhidrato a una concentración aproximada al 100% (0,400 mg/mL) en medio buffer fosfato pH 6,8. Esto permite en función de la respuesta (área), tiempos de retención, factor de capacidad, platos teóricos y factor de cola o tailing evaluar indirectamente el volumen de inyección, la longitud de onda y la integración⁵⁹.

En cuanto a la exactitud del flujo, ésta se determinó programando la velocidad de flujo de la bomba en 1,0 mL/min durante 5 minutos. Se recibe el flujo en un matraz aforado de 10 mL y con un cronómetro se mide el tiempo empleado en llegar al aforo. El límite aceptable de variación es de 10%⁵⁹.

4.2. Validación Técnica HPLC:

La validación de una técnica analítica es el proceso por el cual se establece experimentalmente a través de la aplicación de un diseño experimental apropiado, análisis estadísticos de datos y criterios de aceptación adecuados, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.

La USP clasifica en cuatro categorías (I, II, III, IV) los métodos analíticos para establecer los parámetros requeridos para su validación. En la categoría III se encuentran los métodos analíticos empleados para evaluar características de desempeño, como liberación y/o disolución de fármacos, por lo tanto, se evaluarán los parámetros requeridos para esta categoría⁵⁴.

De los siguientes parámetros, solo la precisión se exige en todos los casos, en tanto los demás se requerirán dependiendo de la naturaleza de cada prueba específica. Además de la precisión (precisión intermedia y repetibilidad), se evaluará la exactitud, especificidad, linealidad, robustez y estabilidad del analito¹².

La técnica analítica seleccionada fue cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa. La capacidad de esta técnica para separar los componentes de una muestra en función de la afinidad de éstos por la fase móvil y fase estacionaria permite obtener sensibilidad y selectividad sobre la molécula en análisis. Además, esta técnica permite detectar eventuales interferencias provenientes, por ejemplo, de la matriz de la muestra, productos de degradación, fase móvil, etc. El sistema de detección con arreglo de diodos acoplado al HPLC favorece aún más la selectividad^{59,60}.

La metodología utilizada para la validación de la técnica analítica a utilizar, fue una adaptación del método USP establecido para los comprimidos de glipizida con metformina, las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las siguientes:

Tipo de columna : Columna Kromasil 60-5CN packing L10 (250 mm de largo, diámetro interno 4,6 mm, tamaño de partícula de 5 μ) Azko Nobel.

Fase móvil : Metanol: Solución amortiguadora fosfato de potasio monobásico 0,025 M pH 6,0 \pm 0,005 (13:12).

Velocidad de flujo : 1,5 mL/minuto.

Vol. de inyección : 10 µL.

Temperatura : 25° C.

Longitud de onda : 236 nm.

4.2.1. Especificidad

Fue el primer parámetro evaluado, y permite conocer en qué grado la respuesta del método es únicamente proporcionada por la presencia del analito, libre de interferencia de otros componentes de la matriz de la muestra. Permite demostrar que el método es capaz de discriminar sin interferencias el analito de sustancias de composición similar y otros productos que puedan estar presentes en la muestra⁶⁰.

Para ello, se incluyeron pruebas que garantizaron la identificación del analito, la evaluación de interferencia de impurezas, los productos de degradación, los residuos de solventes y los excipientes en la señal del analito⁶¹. Las pruebas realizadas correspondieron a lecturas en las condiciones de trabajo del estándar, las muestras, los medios de disolución, los medios de disolución más una gota de detergente empleado en el lavado del material de vidrio utilizado, la lectura de la fase móvil.

El criterio de aceptación que se utilizó en este caso es el de *resolución*, pero debido a que se medía solo la presencia de un analito y el método era capaz de detectar un pico cromatográfico atribuible a metformina, se utilizaron las pruebas de pureza del estándar del principio activo, ya que permitieron determinar

que el *peak* cromatográfico del analito no podía ser atribuible a más que un solo componente⁶².

4.2.2. Estabilidad

Es un requerimiento básico demostrar la estabilidad de la muestra y estándares durante el tiempo comprendido entre su preparación y finalización del análisis, especialmente cuando se utilizan equipos automatizados en donde las muestras pueden permanecer en el muestreador automático por horas antes de ser analizadas⁶².

Para su determinación se almacenaron las soluciones estándar y de estudio en condiciones que aseguraran su estabilidad, en seguida se analizaron en el período de tiempo especificado y se compararon los resultados con los obtenidos con una solución a tiempo 0 que se considera como el 100%. El rango de recuperación debe estar entre 98 y 102% del valor promedio¹².

4.2.3 Linealidad

Es la capacidad para obtener resultados que sean directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración (cantidad) del analito en las muestras dentro de un intervalo establecido por la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método ha sido probado, y dentro del cual se puede efectuar una interpolación en una curva estándar. La selección del rango y el número de puntos experimentales está estrictamente relacionada con la aplicación del método⁶¹.

Para pruebas de disolución de formas farmacéuticas de liberación inmediata se debe preparar una curva equivalente al 10 – 120% de fármaco disuelto⁶¹.

Para considerar que el método es lineal en este rango, se debe evaluar la curva resultante, a través del método de los mínimos cuadrados, y ser graficada para su documentación⁶⁰, para ello los datos obtenidos de las áreas resultantes se evaluaron en el software Microsoft Office Excel 2007.

El coeficiente de determinación de la recta no debe ser menor a 0,98, y el coeficiente de variación de las cinco determinaciones de cada punto de la curva debe ser menor o igual a un 2%^{12,61}.

Otro parámetro a considerar es el factor de respuesta (figura 2) de cada punto de la curva en función de su concentración, el coeficiente de variación de los factores de respuesta debe ser menor o igual a un 2% para considerarse lineal y garantizar que la recta sea paralela al eje de las abscisas (ajustado con el intercepto del eje de las ordenadas)⁶².

$$\text{Factor de Respuesta (FR)} = \frac{\text{Respuesta (Área)}}{\text{Concentración } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)}$$

Figura 2: Ecuación Factor de Respuesta.

4.2.4. Precisión

La precisión refleja la medida en que los valores de una serie repetida de ensayos analíticos que se realizan a una muestra homogénea son semejantes entre sí ⁶³.

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

a) Precisión intermedia: estudia la variabilidad de la técnica utilizada efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, pero en condiciones operativas distintas y en un mismo laboratorio. Se evalúan los efectos causados al variar una serie de factores, como el día del ensayo, el analista, el instrumento ^{12,61}.

Para la evaluación de los resultados obtenidos en el estudio de la precisión intermedia se aplica el “*Test de Comparación de Medias*”, siguiendo los siguientes pasos ⁶²:

i. Comparación de varianza (varianzas homocedásticas): La comparación de dos varianzas se llevo a cabo empleando el test de Fisher (F) de dos colas. El valor de F debe compararse con el valor de F crítico para el nivel de significancia correspondiente (0,05) y los grados de libertad referidos a la varianza del numerador y del denominador (n_1-1 y n_2-1). La variable comparada correspondió a las áreas cromatográficas.

Si el F crítico es mayor que el F calculado se concluye que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de los dos conjuntos de datos, con lo cual se puede calcular la varianza común.

ii. **Determinación de varianza común:** Si ambas varianzas son homocedásticas debe calcularse la varianza conjunta, que es una estimación de la varianza común de los dos conjuntos de datos.

iii. **Comparación de medias:** El objeto de esta prueba es ver qué sucede con la hipótesis que afirma la inexistencia de diferencia significativa entre medias aritméticas, se postula la hipótesis nula de la siguiente manera: $H_0:$ o
 $H_1:$

Se calcula el estadístico t de student (t_{exp}) y se compara con el t crítico (t_{crit}) para un nivel dado de significancia (0,95) y grados de libertad ($n_1 + n_2 - 2$). La diferencia () puede resultar mayor, menor o igual a 0. Por lo tanto H_0 es aceptada si $t_{exp} \leq t_{crit}$.

iv. **Test de Cochran** (cuando no se cumple la condición de homogeneidad de varianza). Se aplica cuando las varianzas no son iguales, y se basa en comparar el valor de t_{exp} con el valor del t' (t de Cochran). Si el $t_{exp} \leq t'$ Cochran, se concluye que las medias de ambos conjuntos son significativamente iguales ⁶².

b) **Repetibilidad:** Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas, en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto. Se expresa matemáticamente por coeficiente de variación y no debe ser mayor a 2% ^{12,61}.

En ambas pruebas se realizaron seis determinaciones a tres niveles de concentración, incluidas en el rango de linealidad: bajo, medio (100%) y alto, con pesadas independientes cada una ⁶².

4.2.5. Exactitud

La exactitud expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental obtenido ⁶³. Se llevo a cabo empleando el método de adición patrón ⁶². Se trabajó a tres niveles de concentración dentro del intervalo de linealidad, con pesada independiente (nivel inferior, medio y superior), y se procede de la siguiente forma:

Se prepara una solución con las muestras en análisis (Glafornil[®] y Glucophage[®]) de concentración desconocida, pero dentro del rango de linealidad (cercana al 20% de la concentración de trabajo). Esta solución es el “blanco madre”. Se agrega a un matraz de aforo una cantidad de estándar que permita llegar a una concentración cercana al nivel establecido (40; 100 y 120%); se agrega una alícuota de “blanco madre” al matraz, con el mismo grado de precisión en cada nivel de concentración (utilizando pipetas del mismo volumen e incertidumbre) y se lleva a aforo con el medio de disolución correspondiente. La solución resultante se nombrará como “blanco de trabajo”. Se prepara una solución de estándar para determinar la concentración de ambos “blancos” y así obtener el porcentaje de recuperación, el cual debe estar entre 95 y 105 %. Se

realizan mínimo tres lecturas de cada “blanco” con coeficientes de variación no mayores al 2% ^{17,62}.

Tabla II: Determinación de concentración teórica y nivel de trabajo.

Concentración Teórica	X (app =20%)	X + 20% Cst.	X + 80% Cst.	X + 100% Cst.
Nivel de trabajo	-	1 (40%)	2 (100%)	3 (120%)

Tabla III: Ejemplo de cálculo para determinación de porcentaje de estándar encontrado en exactitud.

Área Estándar + Blanco	Área Prom. de Blanco	Área St. Agregado	Área real St. agregado	Conc. St. agregado	Conc St. Encontrado	% St. Encontrado
(X+A)	X	(X+A)-X=A	Z	Y	$A * Y/Z = B$	$B*100/Y$

4.2.6. Robustez

La robustez es la capacidad de un método analítico de permanecer inalterado ante pequeñas, pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros asociados a cambios susceptibles de producirse durante su utilización.

Se seleccionan factores operacionales que sean susceptibles de variar durante la utilización del método ⁶¹, el rango se determina en función de la incertidumbre asociada a cada factor ⁶⁴. En los análisis por HPLC, los factores a modificar pueden ser: porcentaje del componente orgánico de la fase móvil, pH de la fase móvil, temperatura de la columna, velocidad de flujo, tipo de columna, variación de la longitud de onda del detector, etc., siendo los parámetros a evaluar

el factor de capacidad, la resolución, el número de platos teóricos, las áreas, el tailing, etc ^{61,62}.

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

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

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

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

Factor A = Longitud de onda del detector. El rango utilizado se determinó multiplicando por 5 el error absoluto de la exactitud de la longitud de onda del detector determinado en la calificación de operación del equipo HPLC: $\pm 0,4\text{nm} \cdot 5 = \pm 2,0 \text{ nm}$.^{58, 62}.

Factor B = Velocidad de flujo. El rango utilizado se determinó disminuyendo y aumentando en un 10% el flujo establecido en la metodología a utilizar ⁶².

Factor C = Composición orgánica de la fase móvil. Se seleccionó este factor para controlar el error proveniente del material volumétrico utilizado en la mezcla de los componentes de la fase móvil y el rango se determinó en base a la incertidumbre absoluta proveniente del error (\pm) de las probetas utilizadas, correspondiente a un $\pm 5\%$ del valor total de la fase orgánica.

Los parámetros a evaluar son:

- Área
- Platos teóricos
- Asimetría del *peak* (tailing)

Para la evaluación estadística de los resultados, se comienza con la determinación de la influencia de cada factor y luego se calcula su intervalo de confianza, el que debe incluir el cero ⁶¹.

- Factor A = $(R_2+R_4+R_6+R_8)/4 - (R_1+R_3+R_5+R_7)/4$
- Factor B = $(R_3+R_4+R_7+R_8)/4 - (R_1+R_2+R_5+R_6)/4$
- Factor C = $(R_5+R_6+R_7+R_8)/4 - (R_1+R_2+R_3+R_4)/4$

Siendo “R” el valor del parámetro evaluado en cada ensayo, realizando 5 lecturas en cada uno de ellos.

5. DETERMINACION DE LOS PERFILES DE DISOLUCION.

Se determinó el perfil de disolución a 12 unidades posológicas de un mismo lote de fabricación, para ambos productos de referencia (Glaformil[®] y

Glucophage®), utilizando el aparato USP N° 2 a 75 rpm en 900 mL de los siguientes medios de disolución: solución de Ácido Clorhídrico a pH 1,2; solución tamponada de Acetato pH 4,5; y solución tamponada de Fosfato pH 6,8, a $37 \pm 0,5$ °C cada una de ellas ^{12,54,65}.

Bajo el concepto que establece que como mínimo deben obtenerse cuatro puntos de muestreo y al menos uno después de disuelto el 85% del fármaco⁴, el número de recolección de las muestras se realizó en intervalos suficientes para caracterizar el perfil de disolución de los fármacos ^{2,17}. Los puntos de muestreo utilizados se esquematizan en la siguiente tabla:

Tabla V: Tiempos de muestreo para los productos en estudio en cada medio de disolución.

Medio de Disolución	Tiempos de muestreo (min)							
	5	10	15	30	45	60	75	90
Buffer 1,2 – Glucophage®	X	X	X	X	X	X		
Buffer 1,2 - Glafornil®	X	X	X	X	X	X	X	X
Buffer 4,5 - Glucophage®	X	X	X	X	X	X		
Buffer 4,5 - Glafornil®	X	X	X	X	X	X	X	
Buffer 6,8 - Glucophage®	X	X	X	X	X	X		
Buffer 6,8 - Glafornil®	X	X	X	X	X	X		

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

Además, a través de un perfil de disolución se puede determinar la constante de velocidad del proceso (K_D), el tiempo necesario para que se disuelva un determinado porcentaje del fármaco ($t_{n\%}$), detectar tiempos de latencia y cambios cinéticos durante un proceso de disolución ⁶⁶.

Para el cálculo de porcentaje de fármaco disuelto, primero se determinó la concentración (mg/mL) de fármaco disuelto a través de la fórmula expresada en la figura 3, y posteriormente a través de un complemento del software Microsoft Office Excel 2007 llamado *DDSolver*. Con esta herramienta se obtuvo el valor del porcentaje disuelto de fármaco introduciendo los datos de concentración a tiempo t , dosis y volumen contenido en el vaso disolutor.

$$[\bar{A}_{prom} * C_{st} / \bar{A}_{st}] * Fd = C_{FD}$$

Figura 3: Ecuación determinación concentración fármaco disuelto.

Donde:

\bar{A}_{prom} = Área promedio de producto de prueba a tiempo t ($n = 3$ inyecciones a cada tiempo en cada vaso).

C_{st} = Concentración conocida de estándar de metformina clorhidrato cercana al 100% de trabajo (0,400 mg/mL).

\bar{A}_{st} = Área promedio de estándar de metformina clorhidrato (n = 5 inyecciones por corrida).

Fd = Factor de dilución.

C_{FD} = Concentración fármaco disuelto.

En cuanto a la determinación del orden cinético, se evaluaron los modelos cinéticos de primer orden, orden cero y raíz del tiempo. Para ello se construyeron gráficos que relacionan el tiempo con la cantidad de fármaco disuelto a cada tiempo t de acuerdo a lo que indica cada modelo.

El método para la obtención de la constante de velocidad del proceso (K_d) utilizando un modelo cinético de disolución de orden uno, se obtiene al construir un gráfico que relacione el logaritmo de $1 - Q_t/Q_{inf}$ con el tiempo, obteniendo una recta con pendiente igual a $Q_{inf} - K_d/2,303$, de la cual podemos caracterizar la constante de velocidad de disolución de primer orden, K_d .

La ecuación en forma logarítmica de un modelo cinético de disolución de orden uno es la siguiente:

$$\log \left[1 - \frac{Q_t}{Q_{\infty}} \right] = \frac{K_d t}{2,303}$$

Figura 4: Ecuación logarítmica modelo cinético de disolución orden uno.

Donde:

Q_t = Cantidad de fármaco disuelto a tiempo t (%).

Q_{inf} = Cantidad de fármaco disuelto luego de un tiempo infinito (%).

t = Tiempo (min).

K_d = Constante de velocidad del proceso.

Posteriormente, se compararon los perfiles de disolución de los productos Glafornil® y Glucophage® obtenidos en los distintos medios de disolución utilizando la ecuación del *Factor de Similitud* (f_2)^{12,17}. Este método corresponde a la transformación logarítmica de la raíz cuadrada recíproca de la suma del error cuadrado, y es una medición de la similitud en el porcentaje de disolución entre las dos curvas obtenidas a partir de los datos del estudio. Esta fórmula ha sido científicamente validada y adoptada internacionalmente por las agencias reguladoras como un criterio para asegurar la similitud entre dos perfiles de disolución *in vitro*, Su fórmula corresponde a la siguiente:

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

Figura 5: Ecuación Factor de Similitud (f_2)

Donde:

n = número de tiempos de muestreo hasta alcanzar el 85% de porcentaje disuelto.

R_t = porcentaje disuelto promedio en el tiempo t del producto de referencia.

E_t = porcentaje disuelto promedio en el tiempo t del producto en estudio.

Para permitir el uso de datos promedio el coeficiente de variación de las muestras analizadas, no deberá ser mayor al 20% para los puntos temporales más tempranos del perfil de liberación-disolución, y no más del 10% en los demás puntos temporales del perfil. Un valor de $f_2 \geq 50$ (50-100) refleja la equivalencia de las dos curvas y por lo tanto, la bioequivalencia entre los productos, pudiendo establecerse la EQT entre el producto en estudio con el de referencia¹⁸.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. VALIDACION DEL METODO DE DISOLUCION

1.1. Prueba de aptitud del sistema

1.1.1. Calibración y Verificación del equipo de disolución.

a) Calibración mecánica: Todos los parámetros analizados para la calificación física y mecánica del equipo de disolución estuvieron dentro del rango de aceptación establecidos por la USP 34, 2011. Los resultados de esta calibración se detallan en el anexo 1.

b) Calibración química: Se ejecutó de acuerdo a las especificaciones establecidas en la USP 34, 2011 para la calibración química con el aparato N° 2 de disolución utilizando 6 comprimidos calibradores USP de prednisona (lote P11300). Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla VI: Resultados de calibración química del equipo de disolución.

Comprimido USP Prednisona	% Promedio Disuelto	CV	Límite de aceptación %	Criterio
Lote P11300	32,5	2,72	27-38	Cumple

Los resultados aseguran que el sistema de disolución funciona de manera óptima utilizando el aparato N° 2 (Paleta).

1.1.2. Verificación del equipo preparador de medios de disolución.

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

Tabla VII: Oxígeno en agua determinado con ECDO6 Dissolved Oxygen Sensor expresado como partes por millón de O₂ presente en el agua.

Oxígeno disuelto en agua (ppm)			
Promedio Antes de desgasificar (n=5)	Promedio Agua Desgasificada (n=5)	Límite de Aceptación	Criterio
8,80	3,78 ± 0,37	Menor a 5 ppm de oxígeno disuelto	Cumple

Para la verificación del volumen de dispensación del preparador de medios, se pesaron seis dispensaciones de 900 mL de agua cada una, se midió su temperatura, se determinó el volumen en función de su densidad y se calculó la desviación estándar relativa, la que debe ser menor a 2% (ver Tabla VIII).

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

Peso Requerido	Peso min/máx. (g)	Temperatura de dispensación	Promedio Mediciones (g) n = 5	CV
894 g ± 1 %	885,06 - 902,94 g	35 - 37°C	895,02	0,21

1.1.3. Verificación del funcionamiento del equipo analítico HPLC Shimadzu.

Los resultados de la *prueba de aptitud* del equipo HPLC Shimadzu, se obtuvieron realizando lecturas de estándar de metformina clorhidrato a una concentración aproximada al 100% (0,400 mg/mL) en medio buffer fosfato pH 6,8. Los resultados de los parámetros evaluados deben tener un coeficiente de variación menor a 2%^{61,62}.

Tabla IX: Repetibilidad de tres parámetros en HPLC de una muestra de estándar de metformina clorhidrato, a una concentración de 0,408 mg/mL en medio buffer fosfato pH 6,8.

	Área	Platos teóricos	Tailing
n	5	5	5
Promedio	11.398.806	6.084,24	1,28
DV	5.275,43	27,63	0,01
CV%	0,05	0,45	0,25

La exactitud de velocidad de flujo del equipo HPLC se estableció al determinar la desviación porcentual del valor obtenido experimentalmente respecto del valor nominal (1,0 mL/min) durante 5 minutos. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla X: Resultados para de la exactitud de flujo y análisis estadístico.

Muestra	Volumen (mL)	Tiempo (min)	Flujo (mL/min)
n	5	5	5
Promedio	5,00	4,99	1,00
CV	-	0,53	0,53

Los resultados tanto de la *prueba de aptitud* del equipo HPLC como los de exactitud de flujo, cumplen con los criterios de aceptación, demostrando de esta forma que el equipo funcionara correctamente en los ensayos a realizar.

1.2. Validación del método analítico

1.2.1. Especificidad

La especificidad del método se observa en los siguientes cromatogramas de los ensayos seleccionados y se presentan en las figuras 4 a la 18.

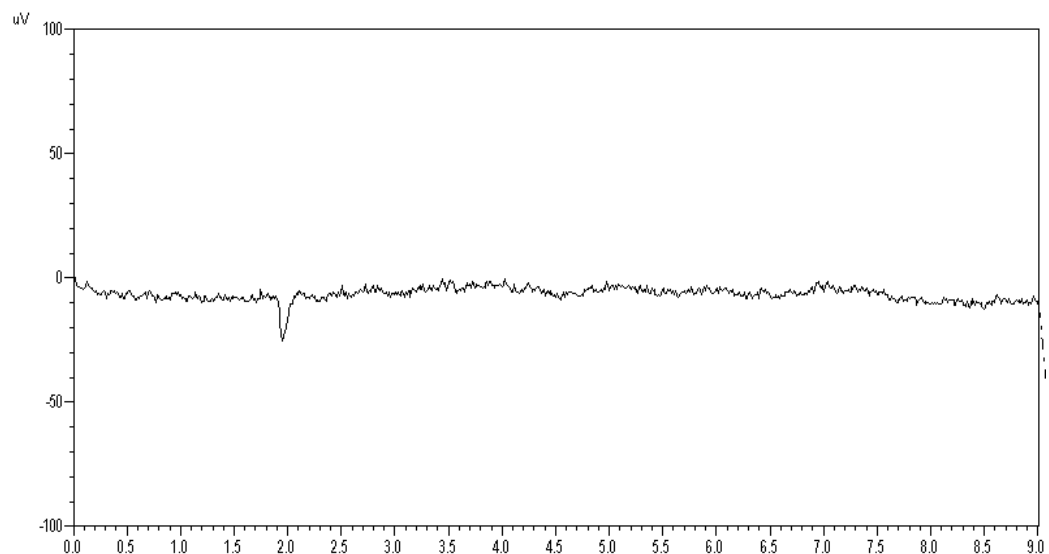


Figura 6: Cromatograma obtenido luego de la inyección de fase móvil.

Especificidad en medio de disolución pH 1,2:

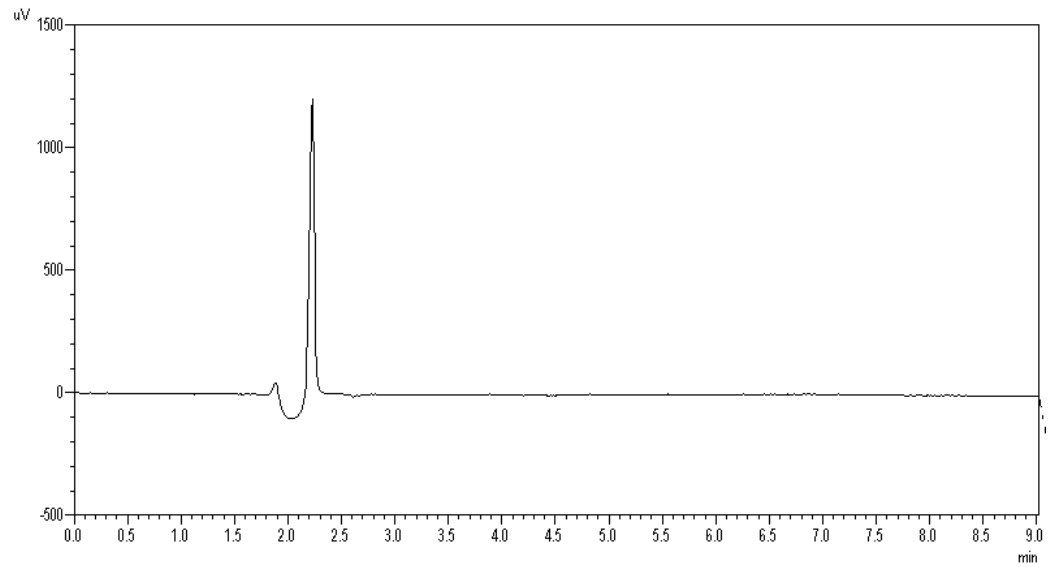


Figura 7: Cromatograma de la inyección del medio de disolución pH 1,2.

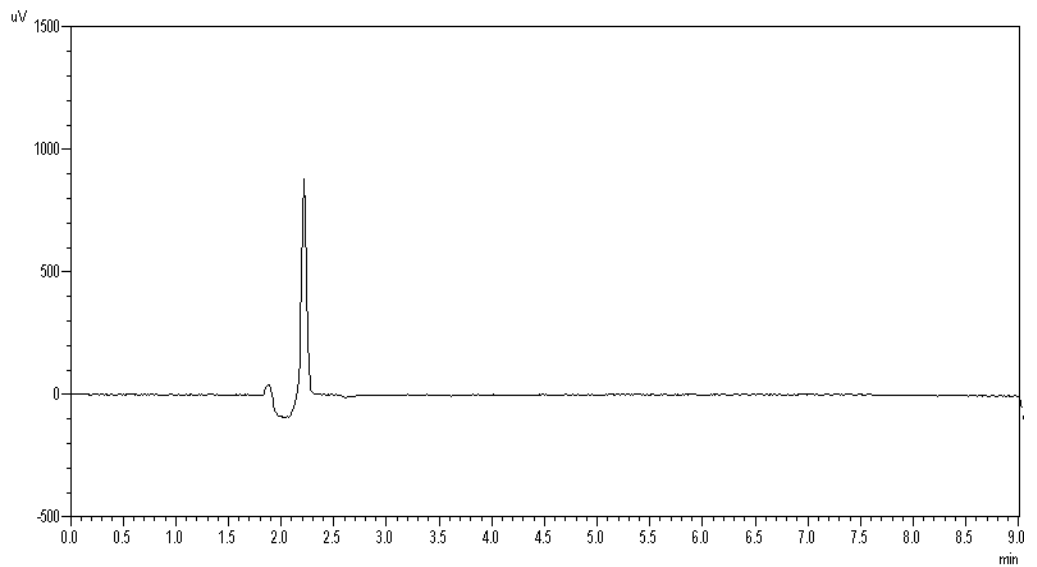


Figura 8: Cromatograma para la inyección de medio de disolución pH 1,2 más una gota de detergente empleado en el lavado del material de vidrio utilizado.

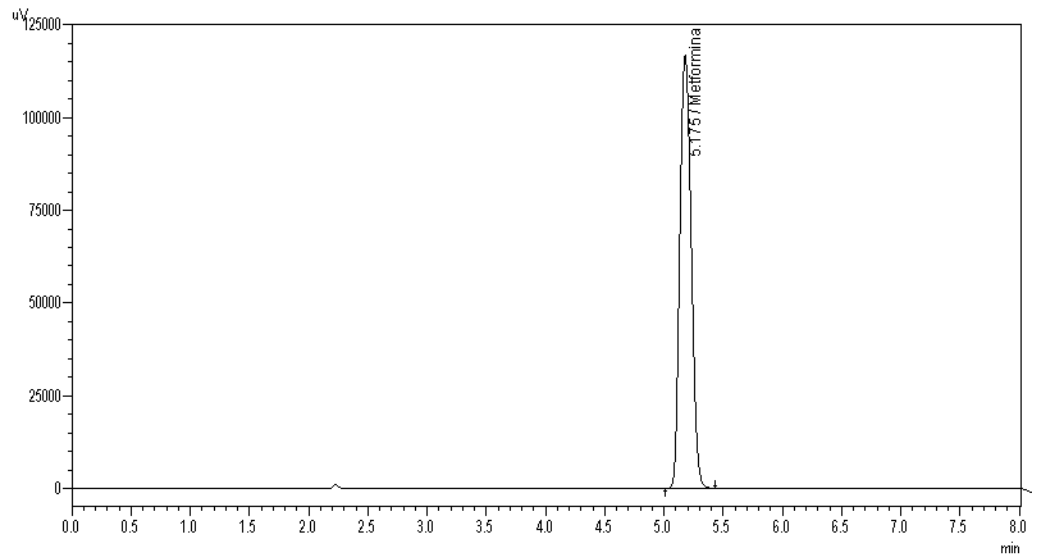


Figura 9: Cromatograma de la inyección de estándar de metformina al 100% de la concentración de trabajo, en medio de disolución pH 1,2.

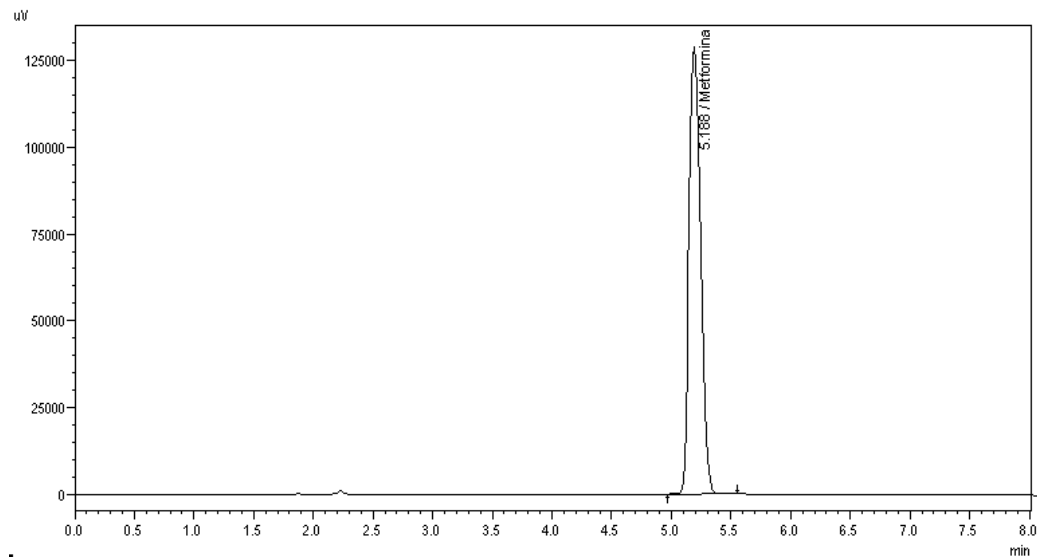


Figura 10: Cromatograma de la inyección de Glafornil® al 100% de la concentración de trabajo, en medio de disolución pH 1,2.

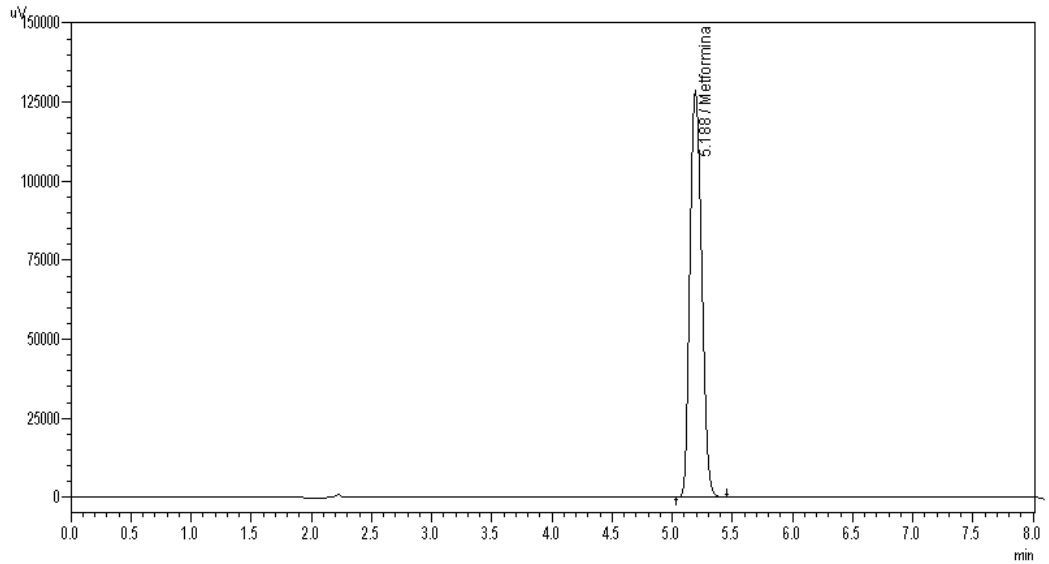


Figura 11: Cromatograma de la inyección de Glucophage® al 100% de la concentración de trabajo, en medio de disolución pH 1,2.

Especificidad en medio de disolución pH 4,5:

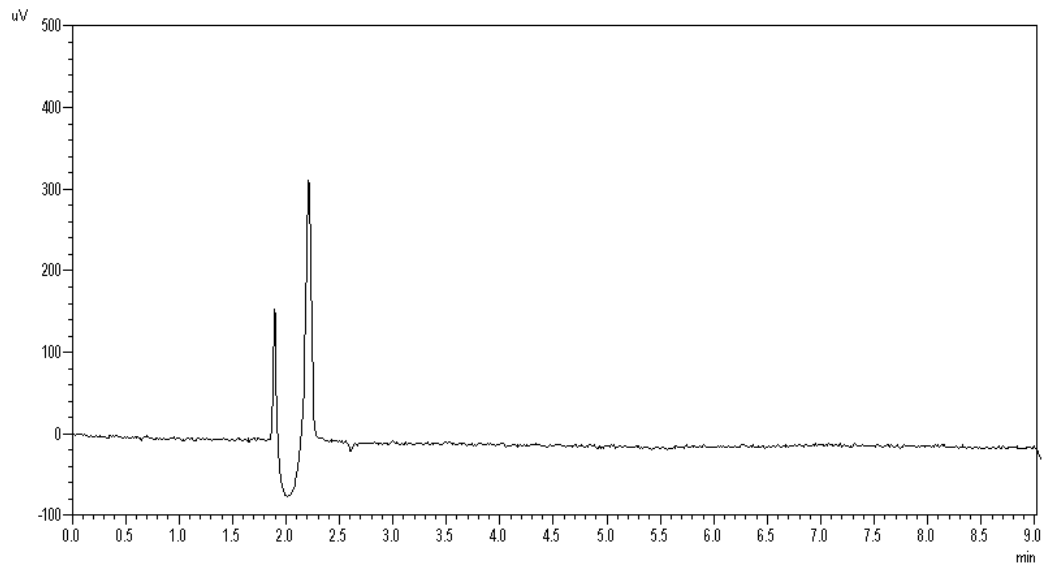


Figura 12: Cromatograma de la inyección del medio de disolución pH 4,5.

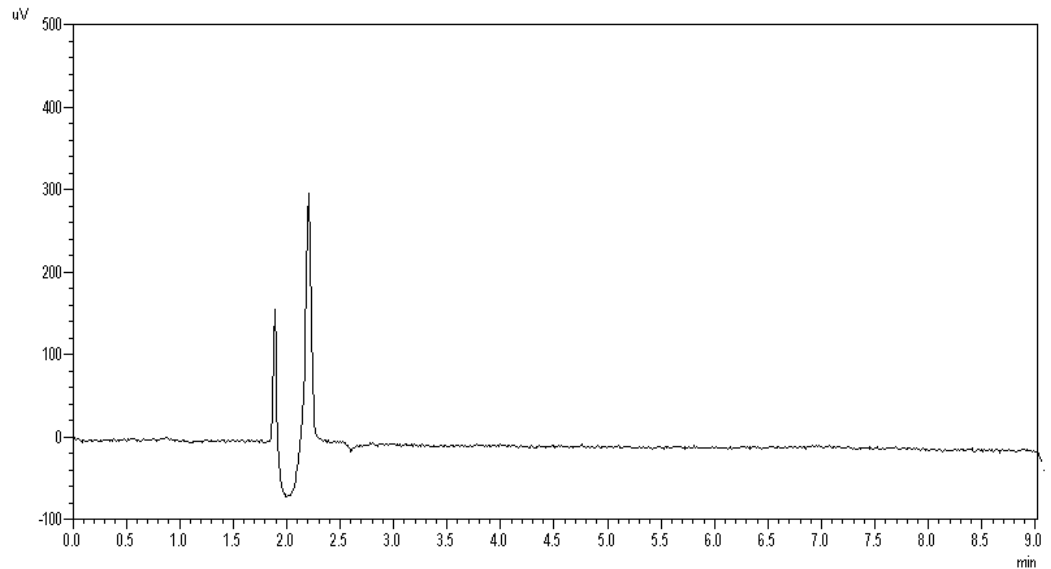


Figura 13: Cromatograma para la inyección de medio de disolución pH 4,5 más una gota de detergente empleado en el lavado del material de vidrio utilizado.

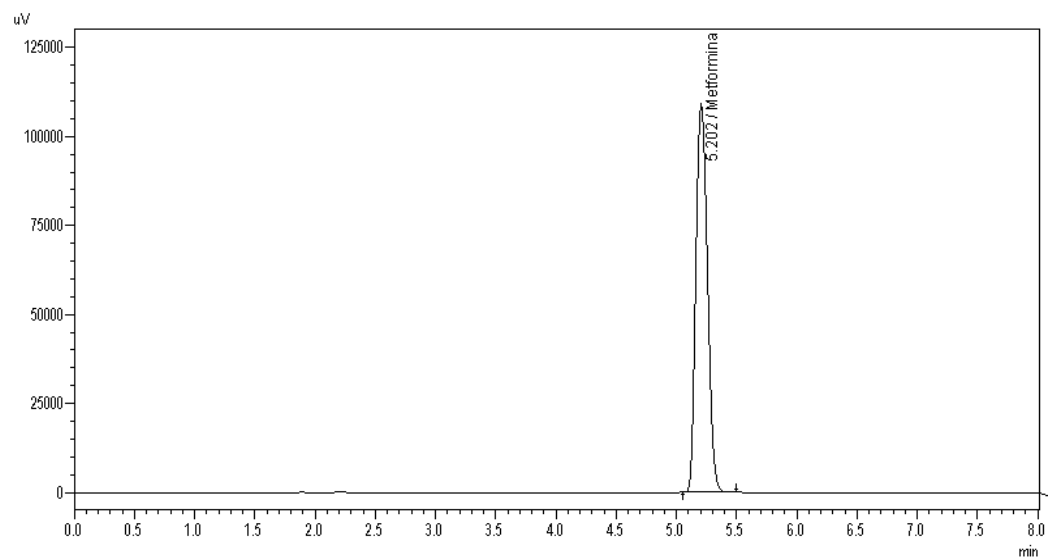


Figura 14: Cromatograma de la inyección de estándar de metformina al 100% de la concentración de trabajo, en el medio de disolución pH 4,5.

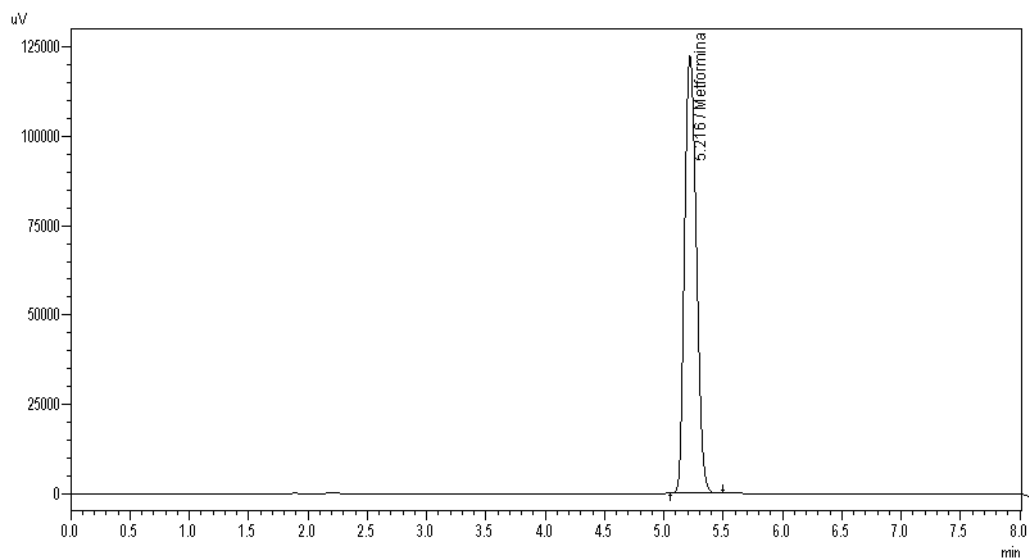


Figura 15: Cromatograma de la inyección de Glafornil® al 100% de la concentración de trabajo, en medio de disolución pH 4,5.

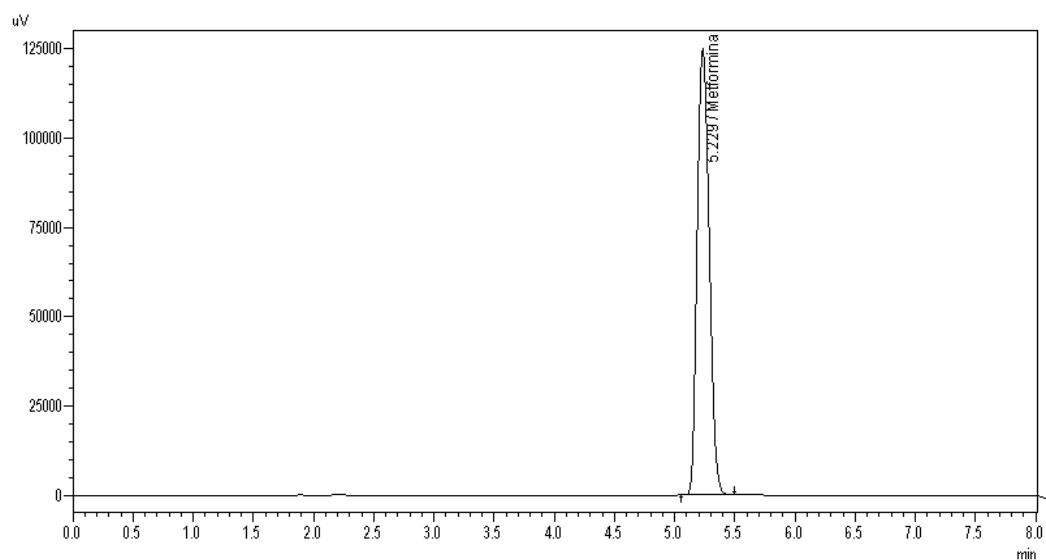


Figura 16: Cromatograma de la inyección de Glucophage® al 100% de la concentración de trabajo, en medio de disolución pH 4,5.

-Especificidad en medio de disolución pH 6,8:

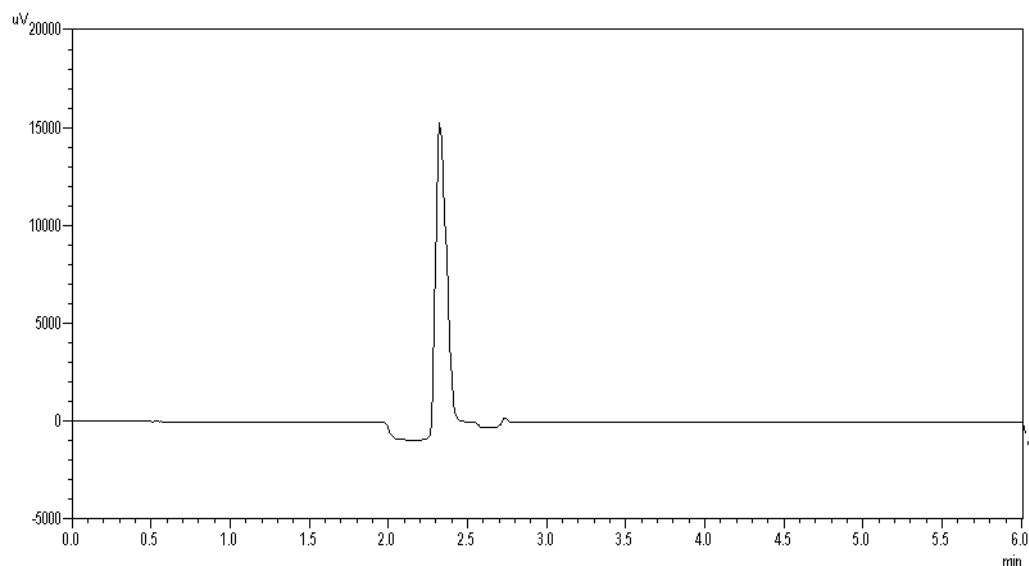


Figura 17: Cromatograma de la inyección del medio de disolución pH 6,8.

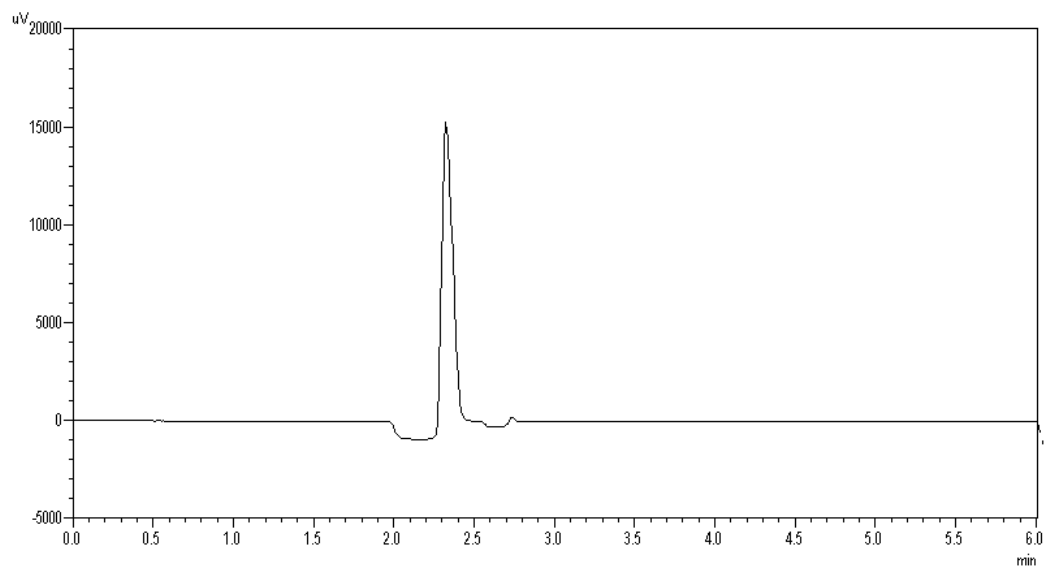


Figura 18: Cromatograma para la inyección de medio de disolución pH 6,8 más una gota de detergente empleado en el lavado del material de vidrio utilizado.

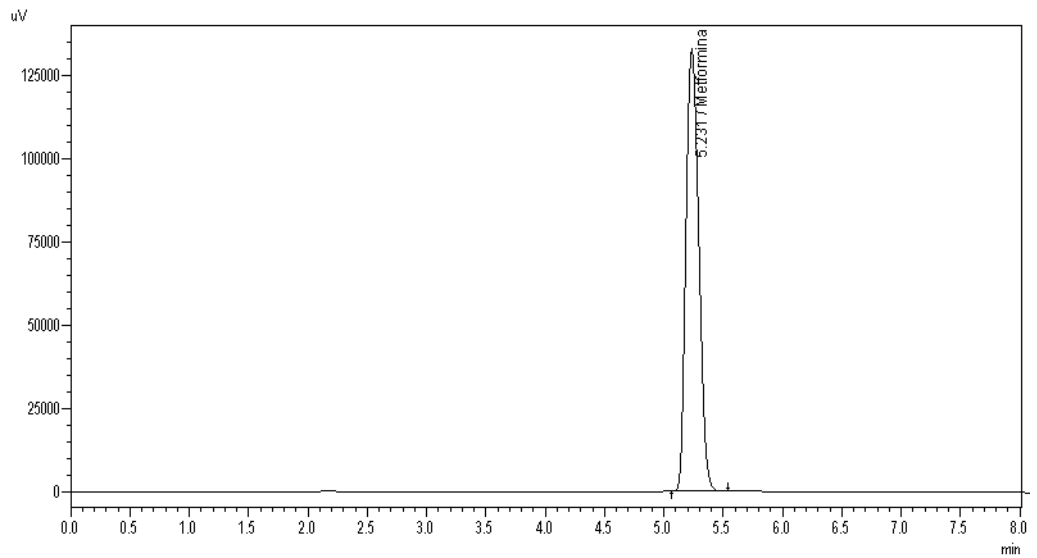


Figura 19: Cromatograma de la inyección de estándar de metformina al 100% de la concentración de trabajo, en el medio de disolución pH 6,8.

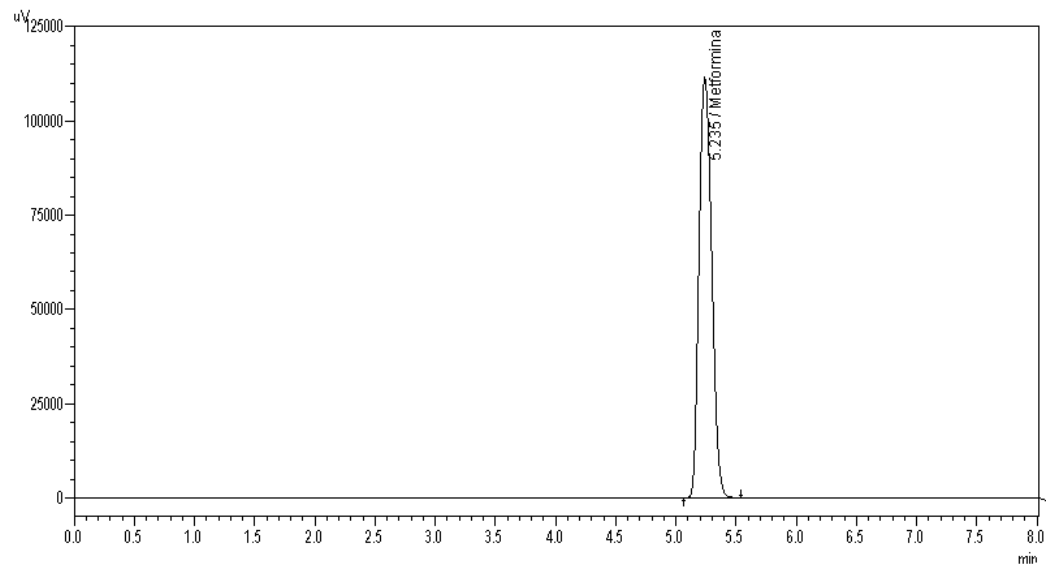


Figura 20: Cromatograma de la inyección de Glafornil® al 100% de la concentración de trabajo, en medio de disolución pH 6,8.

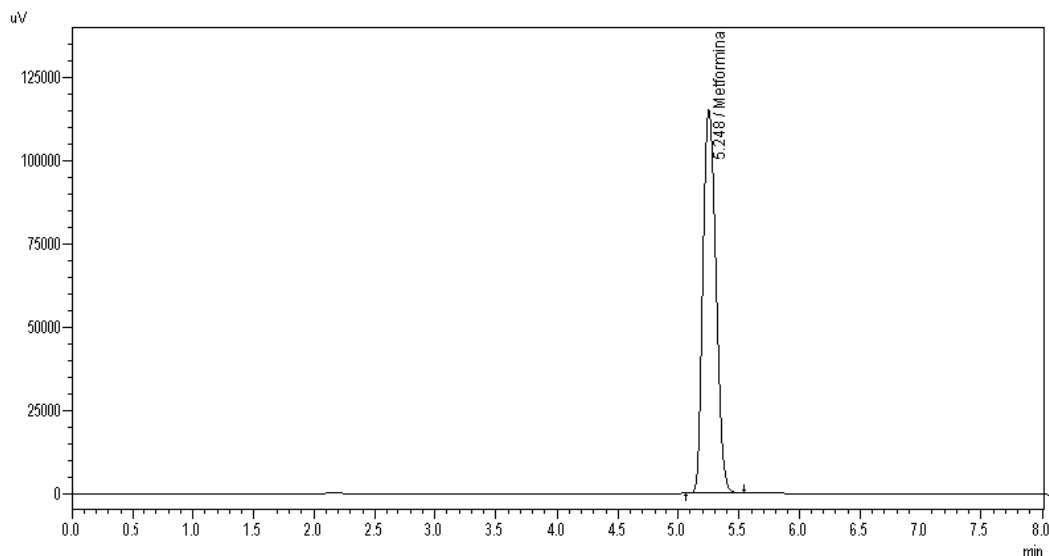


Figura 21: Cromatograma de la inyección de Glucophage® al 100% de la concentración de trabajo, en medio de disolución pH 6,8.

Los cromatogramas de la fase móvil (Figura 3), de los blancos de cada medio de disolución (figuras N° 4, 9 y 14) y de los medios de disolución más detergente (Figuras N° 5, 10 y 15) no presentan señal (*peak*). Los resultados tanto para el estándar como para las muestras de Glucophage® y Glafornil® al 100% de la concentración de trabajo en los 3 medios, mostraron un solo *peak* con las mismas áreas y tiempos de retención, bien definidos y simétricos (de acuerdo a los resultados de resolución y taling obtenidos), por lo que de esta forma se infiere que la respuesta del método es proporcionada únicamente por el analito a cuantificar.

1.2.2. Estabilidad

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

Tabla XI: Porcentaje de recuperación a partir de 5 lecturas para prueba de estabilidad a tiempo 0, 24 y 48 horas, a temperatura ambiente y de refrigeración (2-8°C) de soluciones de estándar de metformina clorhidrato y de los productos farmacéuticos en estudio.

		Tiempo Cero (%)	24 Horas T° Ambiente	24 Horas Refrigerado	48 Horas T° Ambiente	48 Horas Refrigerado
pH 1,2	Estándar	100	100,12	100,28	100,50	100,58
	Glafornil	100	100,35	100,23	100,71	100,62
	Glucophage	100	100,13	100,06	100,43	100,38
pH 4,5	Estándar	100	100,13	99,96	100,5	100,29
	Glafornil	100	100,12	100,23	100,49	100,30
	Glucophage	100	100,40	100,36	100,41	100,52
pH 6,8	Estándar	100	100,20	100,31	100,01	100,13
	Glafornil	100	100,24	100,19	99,99	99,92
	Glucophage	100	100,28	99,98	99,66	99,65

Nota: 100% Corresponde a una concentración aproximada de 0,400 mg/mL

Los resultados indicaron que tanto las muestras del estándar como de los comprimidos analizados en todos los medios de disolución fueron químicamente estables durante la manipulación y el tiempo de análisis de las mismas.

1.2.3. Linealidad

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

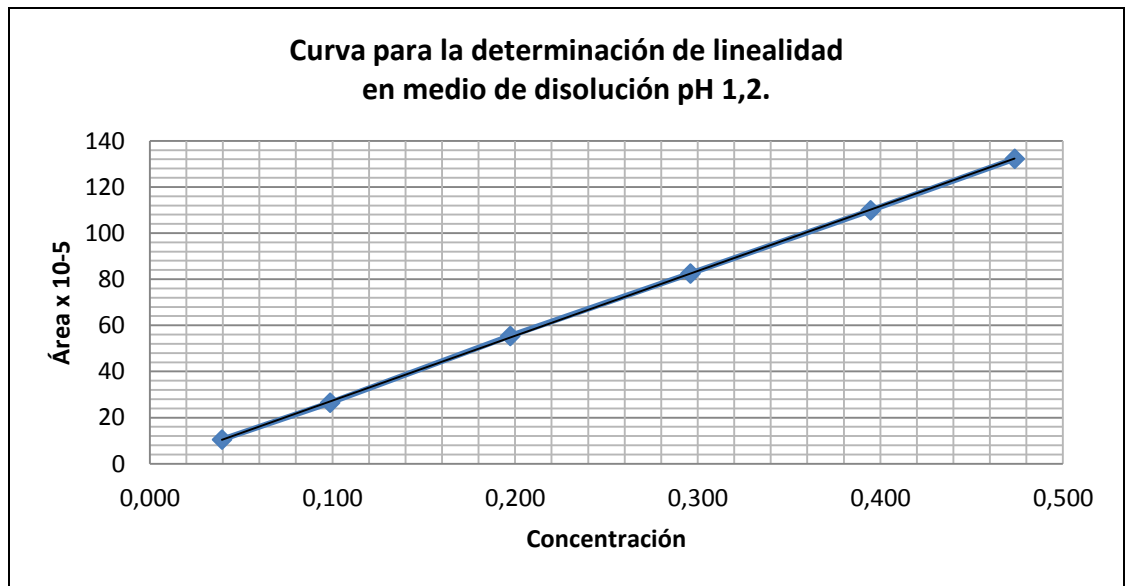


Figura 22: Curva para la determinación de linealidad del método analítico de Metformina en medio de disolución pH 1,2.

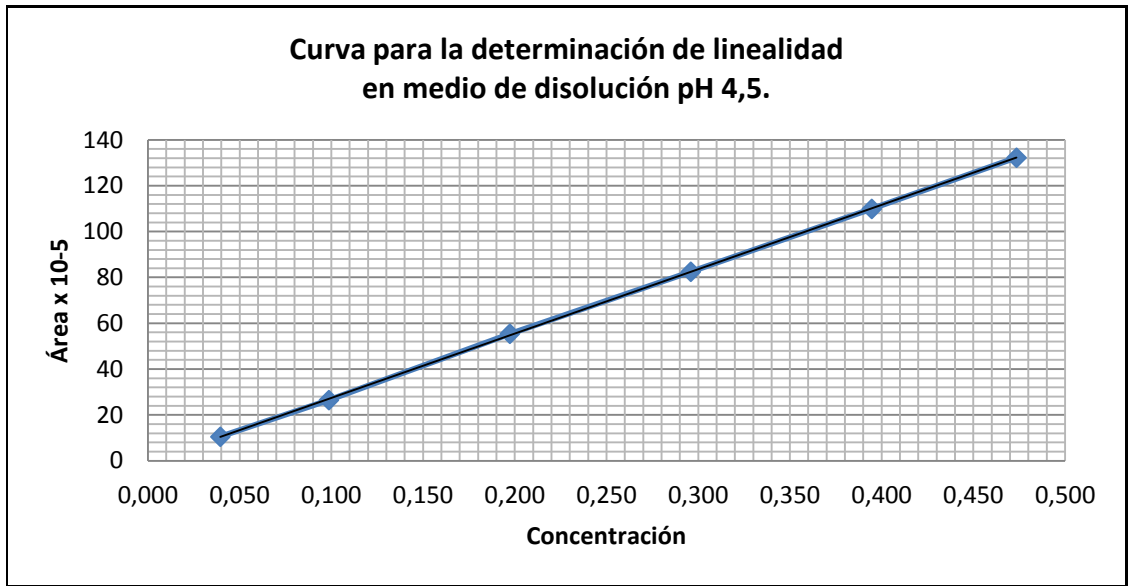


Figura 23: Curva para la determinación de linealidad del método analítico de Metformina en medio de disolución pH 4,5.

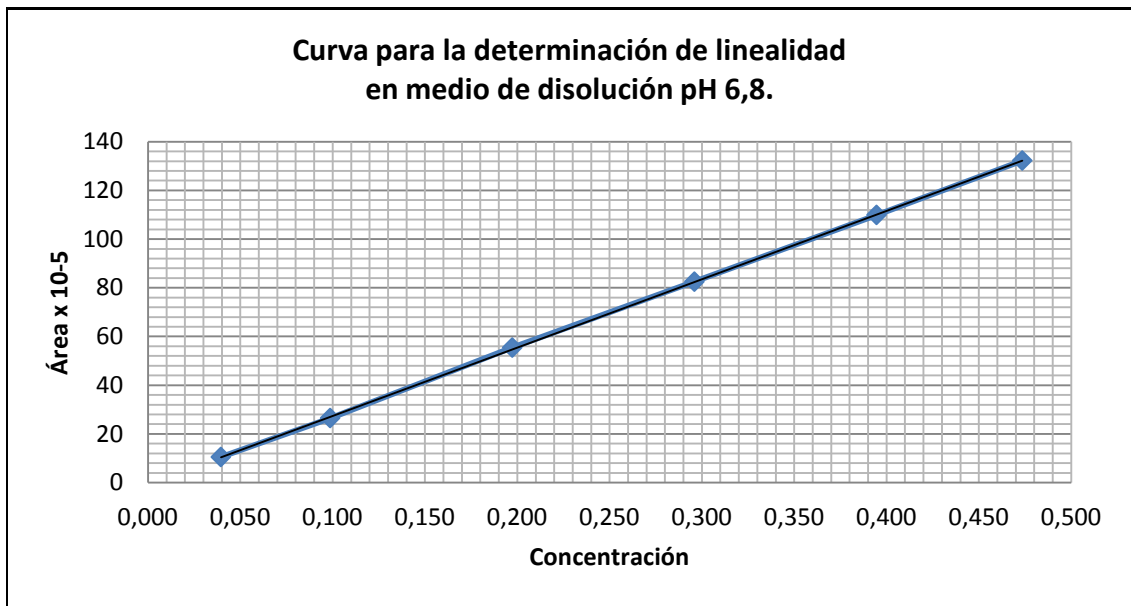


Figura 24: Curva para la determinación de linealidad del método analítico de Metformina en medio de disolución pH 6,8.

Tabla XII: Parámetros estadísticos para el cálculo de linealidad de una solución estándar en seis niveles de concentración en los distintos medios.

Parámetros Estadísticos	pH 6,8	pH 4,5	pH 1,2	Criterio
Pendiente	280,3455	277,7462	280,6916	
Intercepto eje Y	-0,6353	-0,3068	-0,6522	
Coefficiente de Correlación (r)	0,9999	0,9999	1,0000	
Coefficiente de determinación (r²)	0,9999	0,9998	0,9999	≥ 0,98
CV del Factor de Respuesta (FR)	1,5278	1,7043	1,6664	≤ 2

Todos los valores cumplen con los criterios de aceptación, por lo tanto se demuestra que el método es lineal dentro del rango de concentraciones de trabajo en los tres medios de disolución empleados. Los factores de respuesta obtenidos son semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente y los interceptos del eje de las ordenadas incluyen el 0.

1.2.4. Precisión

Tanto para la repetibilidad y la precisión intermedia se prepararon tres concentraciones que estén dentro del intervalo de linealidad (bajo, medio y alto) con pesadas independientes en cada nivel y se realizaron 6 lecturas. Las concentraciones elegidas fueron cercanas al 40%, 100% y 120%.

Las siguientes tres tablas corresponden a los resultados de repetibilidad y precisión intermedia.

Tabla XIII: Resultados del *Test de comparación de medias* para el cálculo de precisión intermedia del medio pH 1,2.

Comparación de Medias						
Parámetros	40%		100%		120%	
	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>
Media	96,093	96,111	99,077	98,189	98,358	98,905
Varianza	0,0259	0,0002	0,0182	0,0037	0,0091	0,0103
Nº Determinaciones	6	6	6	6	6	6
Comparación de Varianza						
F crítico (tabla)	4,2839		4,2839		4,2839	
F calculado	152,7082		4,8858		1,1223	
Varianza Común	0,0130		0,0110		0,0097	
Grados de libertad	10		10		10	
Varianzas Iguales						
Estadístico t experimental	No considerar		No considerar		1,3323	
Valor crítico de t (2 colas)	No considerar		No considerar		2,2281	
Calificación t	No Considerar		No Considerar		Cumple	
Varianzas Distintas						
Estadístico t experimental	0,0452		2,1636		No considerar	
Valor t' Cochran (2 colas)	2,5706		2,5706		No considerar	
Calificación t'	Cumple		Cumple		No Considerar	

Tabla XIV: Resultados del *Test de comparación de medias* para el cálculo de precisión intermedia del medio pH 4,5.

Comparación de Medias						
Parámetros	40%		100%		120%	
	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>
Media	100,433	100,232	100,499	99,588	98,829	97,942
Varianza	0,0030	0,0208	0,0075	0,0389	0,0208	0,0084
Nº Determinaciones	6	6	6	6	6	6
Comparación de Varianza						
F crítico (tabla)	4,2839		4,2839		4,2839	
F calculado	7,0164		5,1851		2,4829	
Varianza Común	0,0119		0,0232		0,0146	
Grados de libertad	10		10		10	
Varianzas Iguales						
Estadístico t experimental	No considerar		No considerar		2,1580	
Valor crítico de t (2 colas)	No considerar		No considerar		2,2281	
Calificación t	No Considerar		No Considerar		Cumple	
Varianzas Distintas						
Estadístico t experimental	0,4885		2,2066		No considerar	
Valor t' Cochran (2 colas)	2,5706		2,5706		No considerar	
Calificación t'	Cumple		Cumple		No Considerar	

Tabla XV: Resultados del *Test de comparación de medias* para el cálculo de precisión intermedia del medio pH 6,8.

Comparación de Medias						
Parámetros	Nivel 1		Nivel 2		Nivel 3	
	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>
Media	100,183	100,593	99,738	100,418	98,891	99,506
Varianza	0,0066	0,0217	0,0035	0,0192	0,0026	0,0279
Nº Determinaciones	6	6	6	6	6	6
Comparación de Varianza						
F crítico (tabla)	4,2839		4,2839		4,2839	
F calculado	3,3097		5,5416		10,5977	
Varianza Común	0,0141		0,0113		0,0153	
Grados de libertad	10		10		10	
Varianzas Iguales						
Estadístico t experimental	0,9984		No considerar		No considerar	
Valor crítico de t (2 colas)	2,2281		No considerar		No considerar	
Calificación t	Cumple		No Considerar		No Considerar	
Varianzas Distintas						
Estadístico t experimental	No considerar		1,6585		1,4951	
Valor t' Cochran (2 colas)	No considerar		2,5706		2,5706	
Calificación t'	No Considerar		Cumple		Cumple	

Para la repetibilidad, en los tres pH y tres niveles de concentración el coeficiente de variación de las áreas fue menor al 2%.

Para los resultados de precisión intermedia, los valores tanto del t crítico como el t' de Cochran (dependiendo de los respectivos resultados de las varianzas) demuestran que las medias aritméticas calculadas son estadísticamente iguales, por lo que se concluye que el método es preciso.

1.2.5. Exactitud

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

Tabla XVI: Porcentaje de recuperación para cada nivel de concentración en el medio de disolución pH 1,2 y criterio de aceptación.

Nivel de Trabajo	C mg/ml St. Agreg.	C mg/ml St. Encont.	% St.	% Prom. por Nivel	Criterio	Calificación
1	0,0828	0,0832	100,14	100,39	98-102%	<i>Cumple</i>
			100,35			
			100,68			
2	0,3313	0,3348	101,01	101,04	98-102%	<i>Cumple</i>
			101,06			
			101,05			
3	0,4142	0,4109	99,15	99,21	98-102%	<i>Cumple</i>
			99,13			
			99,34			
		Promedio	100,21	100,21	98-102%	<i>Cumple</i>
		DS	0,82	0,93		
		% CV	0,82	0,93		

Tabla XVII: Porcentaje de recuperación para cada nivel de concentración en el medio de disolución pH 4,5 y criterio de aceptación.

Nivel de Trabajo	C mg/ml St. Agreg.	C mg/ml St. Encont.	% St. Encontrado	% Prom. por Nivel	Criterio	Calificación
1	0,0832	0,0822	99,28	98,85	98-102%	<i>Cumple</i>
			98,56			
			98,70			
2	0,3327	0,3343	100,35	100,47	98-102%	<i>Cumple</i>
			100,51			
			100,56			
3	0,4159	0,4133	99,17	99,37	98-102%	<i>Cumple</i>
			99,45			
			99,48			
		Promedio	99,56	99,56	98-102%	<i>Cumple</i>
		DS	0,75	0,83		
		% CV	0,75	0,83		

Tabla XVIII: Porcentaje de recuperación para cada nivel de concentración en el medio de disolución pH 6,8 y criterio de aceptación.

Nivel de Trabajo	C mg/ml St. Agreg.	C mg/ml St. Encont.	% St. Encontrado	% Prom. por Nivel	Criterio	Calificación
1	0,0868	0,0874	100,51	100,80	98-102%	<i>Cumple</i>
			101,22			
			100,67			
2	0,3470	0,3483	100,25	100,38	98-102%	<i>Cumple</i>
			100,51			
			100,36			
3	0,4338	0,4266	98,29	98,35	98-102%	<i>Cumple</i>
			98,44			
			98,33			
		Promedio	99,84	99,84	98-102%	<i>Cumple</i>
		DS	1,15	1,31		
		% CV	1,15	1,31		

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

1.2.6. Robustez

Mediante la matriz resultante del análisis factorial correspondiente a 8 ensayos (2^3) para el estándar de metformina clorhidrato al 100%, se evaluó si el método analítico es robusto dentro de los rangos establecidos para esta prueba, basándose en la incertidumbre de los factores analíticos seleccionados.

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

Tabla XIX: Influencia de los factores y su intervalo de confianza de los parámetros cromatográficos área, platos teóricos y tailing en el medio pH 1,2.

Análisis del parámetro ÁREA		IC (factor $\pm t \cdot S_{\text{exp}}/\sqrt{n}$)	
Influencia factor A	-1.458.652	-1.964.076	-953.228
Influencia factor B	-207.591	-713.015	297.833
Influencia factor C	61.630	-443.794	567.055
Intervalo de confianza	505.424		
Desviación Estándar	754.543		

Análisis del parámetro PLATOS TEÓRICOS		IC (factor $\pm t \cdot S_{\text{exp}}/\sqrt{n}$)	
Influencia factor A	-90,057	-189,796	9,682
Influencia factor B	-6,266	-106,004	93,473
Influencia factor C	99,055	-0,684	198,793
Intervalo de confianza	99,739		
Desviación Estándar	148,899		

Análisis del parámetro TAILING		IC (factor $\pm t \cdot S_{exp}/\sqrt{n}$)	
Influencia factor A	-0,0033	-0,0101	0,0034
Influencia factor B	-0,0012	-0,0080	0,0056
Influencia factor C	-0,0063	-0,0131	0,0004
Intervalo de confianza	0,0068		
Desviación Estándar	0,0101		

Tablas XX: Influencia de los factores y su intervalo de confianza de los parámetros cromatográficos área, platos teóricos y tailing en el medio pH 4,5.

Análisis del parámetro ÁREA		IC (factor $\pm t \cdot S_{exp}/\sqrt{n}$)	
Influencia factor A	-932.925	-1.334.414	-531.436,31
Influencia factor B	139.448	-262.041	540.936,86
Influencia factor C	-359.611	-761.100	41.878,52
Intervalo de confianza	401.489		
Desviación Estándar	599.379		

Análisis del parámetro PLATOS TEÓRICOS		IC (factor $\pm t \cdot S_{exp}/\sqrt{n}$)	
Influencia factor A	13,293	-36,680	63,265
Influencia factor B	-36,124	-86,097	13,849
Influencia factor C	37,520	-12,453	87,493
Intervalo de confianza	49,973		
Desviación Estándar	74,604		

Análisis del parámetro TAILING		IC (factor $\pm t \cdot S_{exp}/\sqrt{n}$)	
Influencia factor A	-0,0010	-0,0038	0,0018
Influencia factor B	0,0013	-0,0014	0,0041
Influencia factor C	0,0000	-0,0028	0,0028
Intervalo de confianza	0,0028		
Desviación Estándar	0,0041		

Tabla XXI: Influencia de los factores y su intervalo de confianza de los parámetros cromatográficos área, platos teóricos y tailing en el medio pH 6,8.

Análisis del parámetro ÁREA		IC (factor $\pm t \cdot S_{exp}/\sqrt{n}$)	
Influencia factor A	-1.215.379	-1.636.325	-794.432
Influencia factor B	-184.661	-605.608	236.286
Influencia factor C	2.446	-418.501	423.392
Intervalo de confianza	420.947		
Desviación Estándar	628.427		

Análisis del parámetro PLATOS TEÓRICOS		IC (factor $\pm t \cdot S_{exp}/\sqrt{n}$)	
Influencia factor A	-100,603	-204,752	3,546
Influencia factor B	-77,402	-181,552	26,747
Influencia factor C	67,683	-36,466	171,832
Intervalo de confianza	104,149		
Desviación Estándar	155,483		

Análisis del parámetro TAILING		IC (factor $\pm t \cdot S_{exp}/\sqrt{n}$)	
Influencia factor A	0,0071	-0,0050	0,0192
Influencia factor B	-0,0012	-0,0133	0,0109
Influencia factor C	-0,0080	-0,0201	0,0041
Intervalo de confianza	0,0121		
Desviación Estándar	0,0181		

De los parámetros analizados, sólo el área se vio influenciada por el Factor A (longitud de onda), situación observada en los tres medios de disolución.

Al visualizar el espectro de absorción UV, el punto de la curva donde se ubica la longitud de onda de extracción (236 nm), está cercana al máximo de absorción, por lo que la absorbancia variará entre los valores de longitud de onda cercanos a esta zona.

A pesar de esto, la exactitud de longitud de onda del detector demostrada en la etapa de verificación del equipo HPLC asegura resultados confiables en este aspecto.

2. PERFILES DE DISOLUCION

Los perfiles cinéticos de liberación/disolución de metformina se determinaron a partir de 12 unidades posológicas de un mismo lote de cada producto en tres medios de disolución, los cuales corresponden a soluciones amortiguadoras de ácido clorhídrico, buffer acetato y buffer fosfato de pH 1,2, 4,5 y 6,8, respectivamente, elaboradas de acuerdo a lo señalado en la USP 34,2011.

Los resultados obtenidos como porcentaje de fármaco disuelto y su coeficiente de variación (CV) se describen en las siguientes tablas:

2.1. Resultados Glucophage

Tabla XXII: Porcentajes promedio de la cantidad disuelta de 12 unidades posológicas de metformina clorhidrato desde Glucophage® 850 mg en función de tiempo, en los tres medios de disolución.

Glucophage® 850 mg						
	pH 1,2		pH 4,5		pH 6,8	
Tiempo (minutos)	% Fármaco disuelto	CV	% Fármaco disuelto	CV	% Fármaco disuelto	CV
5	21,44	17,89	21,20	14,45	22,11	7,24
10	63,24	9,35	46,36	8,50	45,60	11,57
15	82,28	6,83	66,10	7,27	62,62	8,44
30	94,70	3,69	95,01	3,47	91,58	6,49
45	97,95	2,13	98,80	2,31	99,73	2,66
60	100,47	1,38	100,65	1,78	102,40	1,91

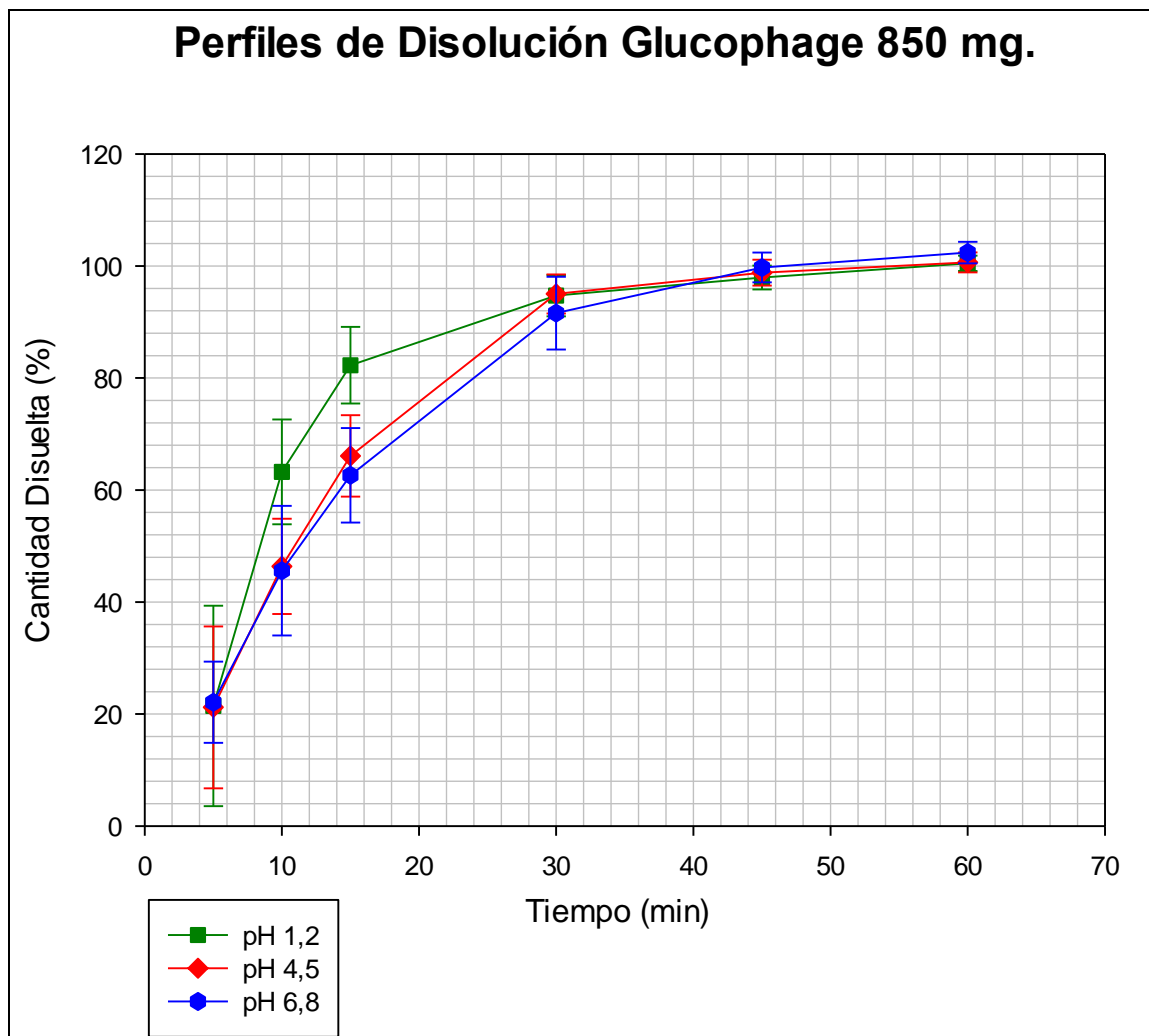


Figura 25: Perfil cinético de disolución del producto Glucophage® 850 mg en los tres medios de disolución.

Tabla XXIII: parámetros cinéticos de disolución de metformina desde el producto farmacéutico Glucophage 850 mg.

	Parámetros	Medios de disolución		
		pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8
Cinéticas de disolución desde Glucophage®	r^2	0,971	0,989	0,994
	Pendiente	-0,045	-0,049	-0,039
	Intercepto	2,040	2,198	2,119
	K_D (min^{-1})	0,105	0,113	0,090

La disolución de Glucophage® comprimidos convencionales de 850 mg, se ajustó a una cinética de orden uno en los tres pH evaluados. Al visualizar los perfiles cinéticos de liberación-disolución se puede apreciar la similitud que existe entre éstos, demostrando de esta forma un perfil similar en los 3 medios tamponados estudiados.

2.2. Resultados Glafornil.

Tabla XXIV: Porcentajes promedio de la cantidad disuelta de 12 unidades posológicas de metformina clorhidrato desde Glafornil® 850 mg en función del tiempo, en los tres medios de disolución.

Glafornil® 850 mg						
	pH 1,2		pH 4,5		pH 6,8	
Tiempo (minutos)	% Fármaco disuelto	CV	% Fármaco disuelto	CV	% Fármaco disuelto	CV
5	20,81	10,32	22,05	11,76	32,52	12,63
10	32,53	7,66	32,21	5,78	49,17	12,15
15	40,47	8,33	40,45	4,82	64,11	9,02
30	56,48	7,78	57,13	1,86	92,81	4,56
45	68,85	4,74	68,01	3,08	99,64	2,76
60	76,67	3,71	77,06	3,59	102,26	1,92
75	82,88	2,99	86,05	2,55	-	-
90	88,28	1,61	-	-	-	-

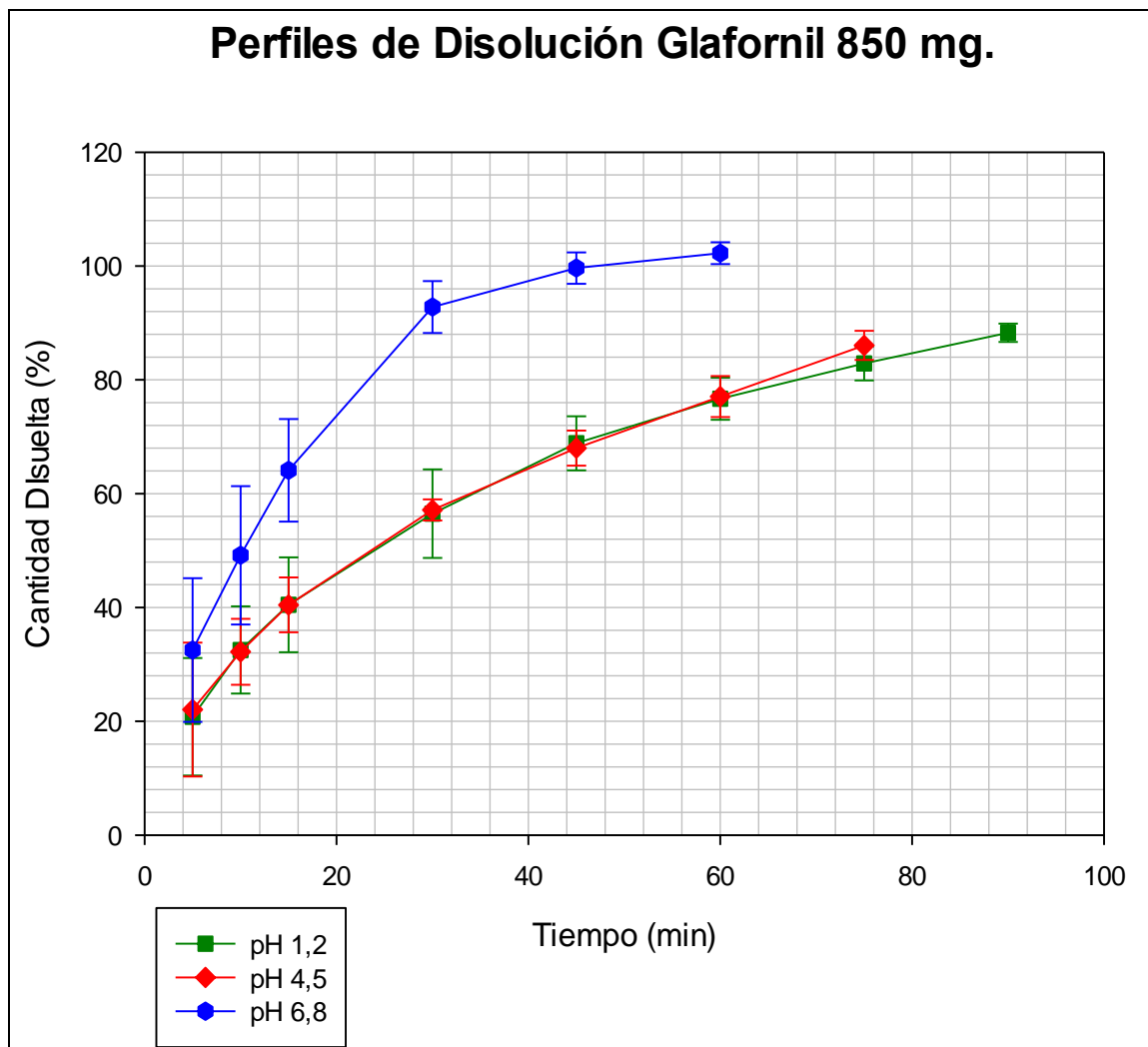


Figura 26: Perfil cinético de disolución del producto Glafornil® 850 mg en los tres medios de disolución.

Tabla XXV: Parámetros analizados para la selección del modelo cinético de disolución de Glafornil® 850 mg, en tres medios de disolución.

	Parámetros	Medios de disolución		
		pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8
Cinéticas de disolución desde Glafornil®	r	0,999	0,998	0,999
	Pendiente	-0,009	9,877	18,694
	Intercepto	1,928	1,286	-9,276
	K_D (min^{-1})	0,022	0,023	0,092

La disolución de Glaformil[®] comprimidos convencionales de 850 mg, se ajustaron a una cinética de orden uno en los tres pH evaluados, al igual que en Glucophage[®]. Pero el perfil de disolución de este producto muestra diferencias visiblemente notorias entre las cinéticas de liberación, cuando éstas se caracterizan a distintos pH.

3. COMPARACION DE PERFILES DE DISOLUCIÓN

Para la comparación de perfiles de disolución de ambas referencias entre sí, se utilizó el factor de similitud (figura 2). Los resultados se describen en los siguientes gráficos:

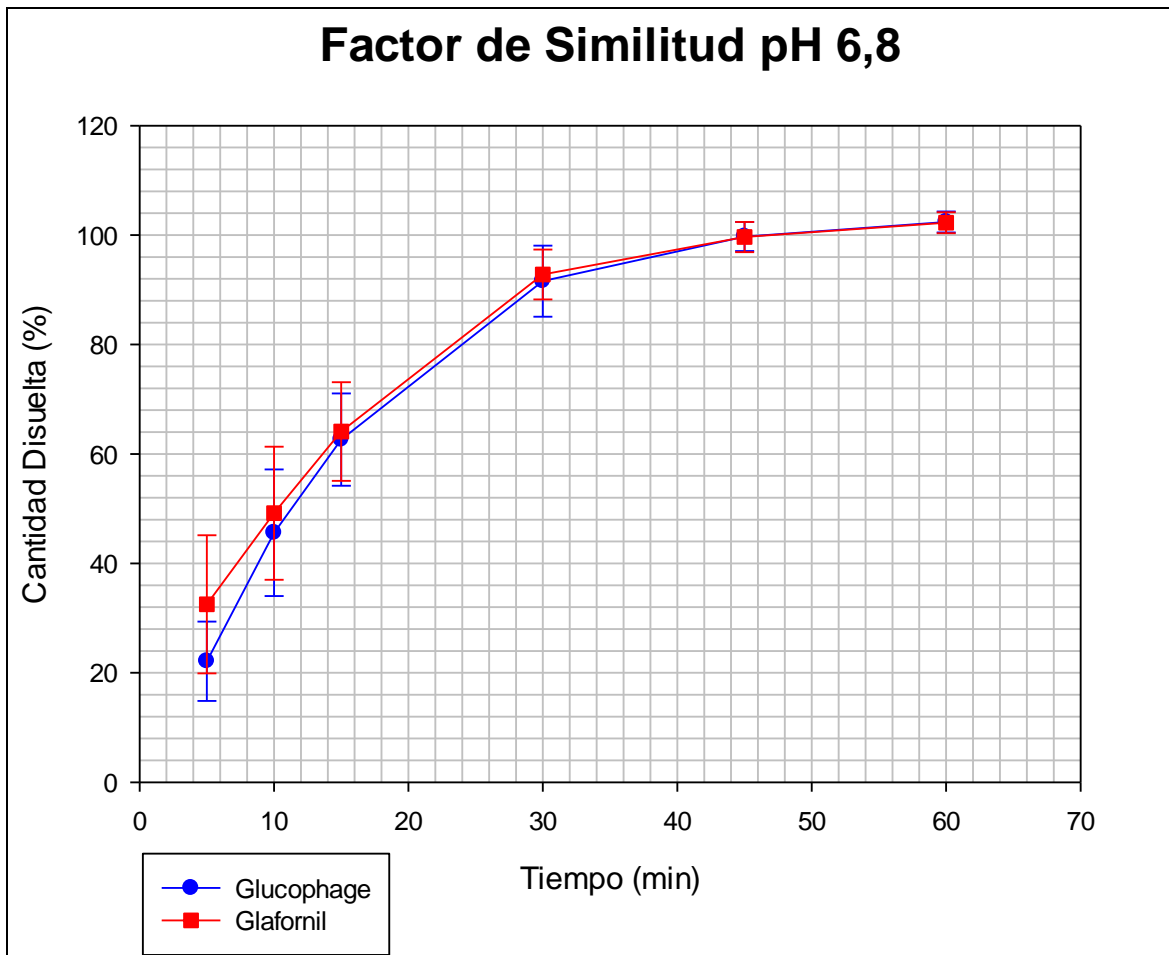


Figura 27: Comparación perfiles cinéticos de disolución de los productos Glafornil® y Glucophage® en el medio de disolución pH 6,8.

Tabla XXVI: Factor de similitud para cada tiempo del perfil de disolución a pH 6,8.

Factor de similitud pH 6,8				
Tiempo	5	10	15	30
$\sum (R - T)^2$	108,261	12,748	2,217	1,524
f_2	62,31			

Factor de Similitud entre los perfiles de disolución es 62,31.

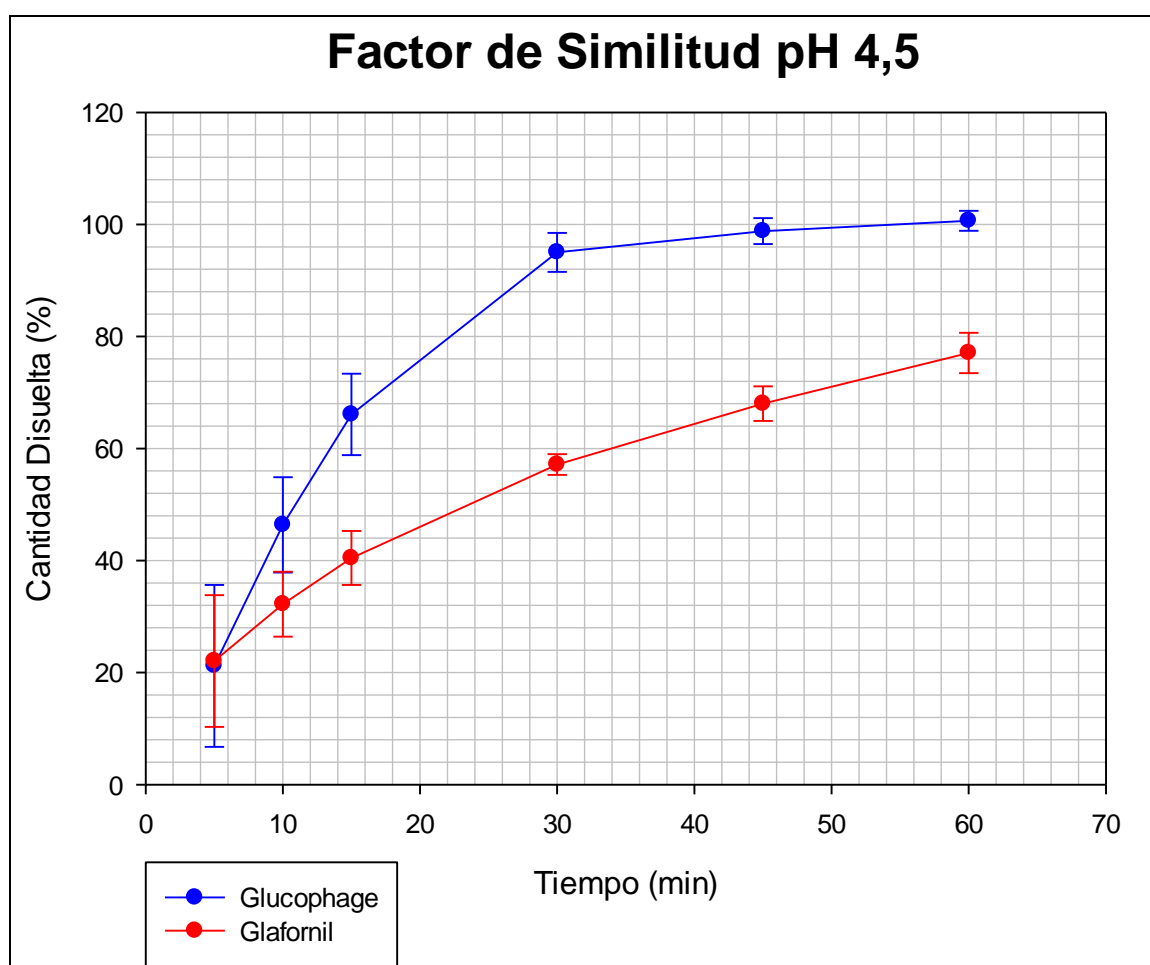


Figura 28: Comparación perfiles cinéticos de disolución de los productos Glafornil® y Glucophage® en el medio de disolución pH 4,5.

Tabla XXVII: Factor de similitud para cada tiempo del perfil de disolución a pH 4,5.

Factor de similitud pH 4,5				
Tiempo	5	10	15	30
$\sum (R - T)^2$	0,729	200,235	657,899	1433,923
f_2	31,02			

Factor de Similitud entre los perfiles de disolución es 31,02.

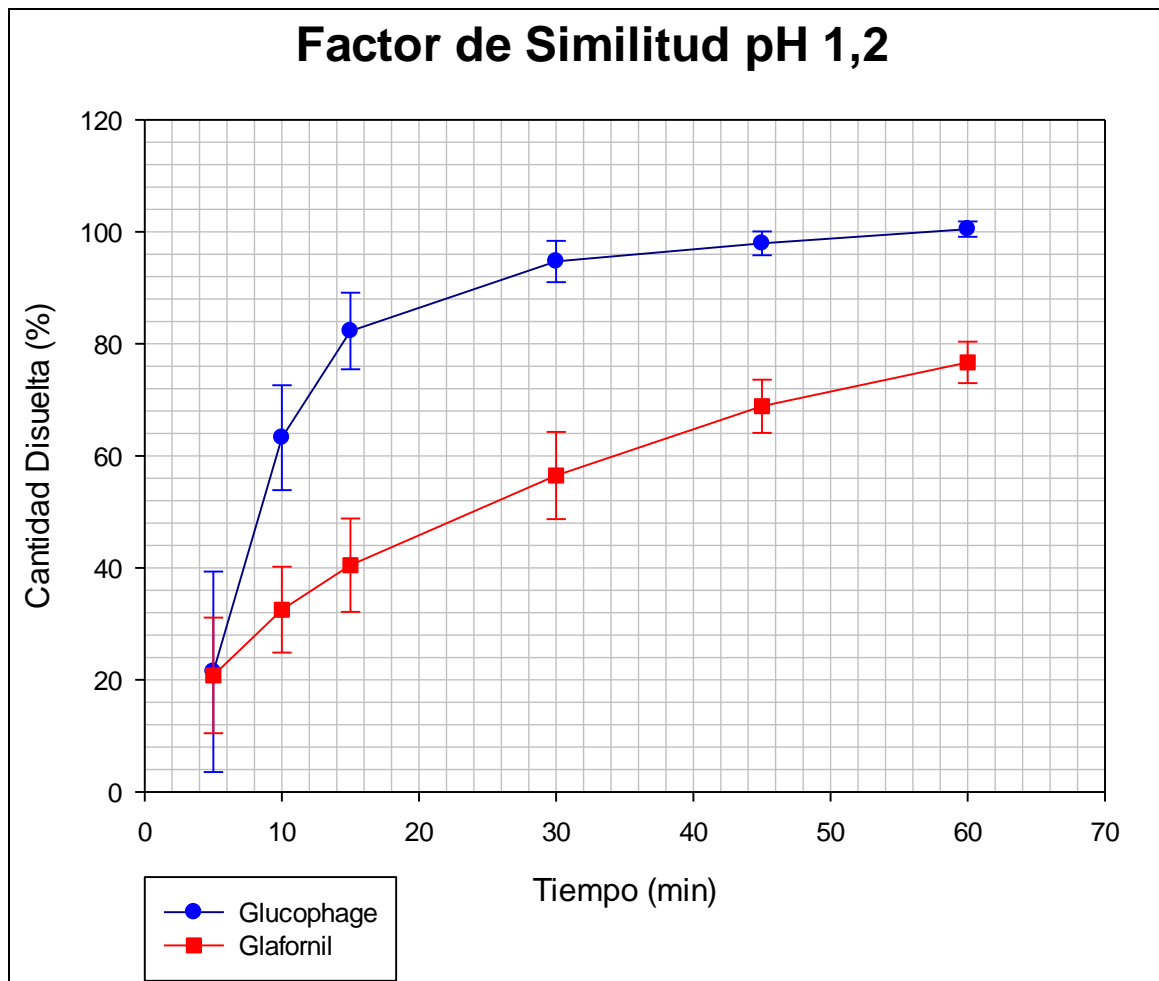


Figura 29: Comparación perfiles cinéticos de disolución de los productos Glafornil® y Glucophage® en el medio de disolución pH 1,2.

Tabla XXVIII: Factor de similitud para cada tiempo del perfil de disolución a pH 1,2.

Factor de similitud pH 1,2				
Tiempo	5	10	15	30
$\sum (R - T)^2$	0,398	943,094	1747,879	1461,434
f_2	24,58			

Factor de Similitud entre los perfiles de disolución es 24,58.

En el cálculo del factor de similitud, se utiliza el valor del promedio del porcentaje disuelto de los productos de referencia y prueba, sin reflejar la dispersión asociada a cada perfil de disolución. En otras palabras, no toma en cuenta la variabilidad dentro de ambos perfiles⁶⁸. Para considerar la variabilidad, las entidades reguladoras exigen para este cálculo una variación inferior al 20% en los puntos temporales más tempranos del perfil de liberación-disolución (p.ej., 10 minutos) y menor al 10 % en los tiempos posteriores^{17,18,65}.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio (Tablas XXII y XXIV), los productos sometidos a los ensayos de disolución cumplen con los requisitos de variabilidad, mencionados anteriormente en todos los medios utilizados. De hecho presentan una clara tendencia a la disminución en el coeficiente de variación en el tiempo.

Los valores obtenidos a partir del cálculo del factor de similitud entre los productos comparadores, indican que los productos no son similares, debido a que no se obtienen factores de similitud mayores o iguales que 50 excepto en el medio buffer fosfato pH 6,8.

Considerando que Glaformil[®] es fabricado bajo el mismo licenciante que el producto Glucophage[®], se esperaba un comportamiento similar o cercano a los obtenidos con el segundo producto. Las diferencias observadas establecen un marco complejo incluso para el empleo de ambos productos de referencia en estudios de bioequivalencia.

Independiente de las diferencias observadas entre los comportamientos cinéticos de metformina liberada desde ambos productos farmacéuticos considerados como comparadores, ninguno de los productos de referencia se ajusta a los requisitos establecidos para poder recomendarlos adecuados a los propósitos de una bioexención, ya que por tratarse de formas farmacéuticas convencionales que contienen un fármaco clase III, las velocidades de liberación disolución distan de ser muy rápidas. Como consecuencia, y dado que los productos comparadores son los que determinan la posibilidad de bioexención, no cabría la opción de que los productos similares que contuvieran el principio activo en esta potencia pudieran eximirse de la ejecución de estudios de bioequivalencia in vivo. Esto no excluye la posibilidad de que otras potencias de los mismos principios activos puedan optar a bioeximirse por estudios de proporcionalidad de la dosis, cuando la potencia mayor del fármaco ha demostrado ser bioequivalente con el producto comparador a la misma potencia.

Cuando se analiza las causas de este comportamiento, para un principio activo altamente soluble como lo es metformina en el rango de pH fisiológico abarcado, se podrían dar los argumentos para una serie de causas probables. Por ejemplo, entre éstas, podrían mencionarse diferencias en la formulación o en el

proceso de fabricación de los productos farmacéuticos de referencia. Trabajos experimentales anteriores han demostrado que ciertos excipientes podrían afectar la permeabilidad de la metformina, dado el potencial de este fármaco para interactuar a través de cargas con otros componentes de la formulación (ver estructura química)⁵¹.

Adicionalmente, los ingredientes inactivos pueden tener más de un origen, y si hubiese diferencias en ciertas características de calidad de los mismos, éstos podrían conducir a resultados inesperados. De la misma forma, el proceso de producción puede verse afectado por cambios en los procesos de granulación o compresión, que otorgarían diferencias en algunas de las propiedades físicas de la forma farmacéutica tales como la distribución del tamaño de partículas de los gránulos para compresión y de la dureza de los comprimidos finales.

Cuando se analizan los resultados de las cinéticas de liberación disolución a pH 6,8 no se observan diferencias significativas entre los perfiles generados a partir de ambos productos, por lo que en términos de especificaciones de calidad de producto farmacéutico terminado, ambos cumplen con los requisitos establecidos por el fabricante. Este comportamiento enmascara otras características biofarmacéuticas, que son por ejemplo, aquellas exigidas para poder optar a bioexención. Cabe destacar que la caracterización a través de perfiles de liberación-disolución deriva de la necesidad de enmarcarse dentro de las especificaciones establecidas por el sistema de clasificación biofarmacéutico, que fue adoptado recién en el año 1995 por la FDA a consecuencia de los trabajos pioneros de Amidon y colaboradores en la Universidad de Michigan, EE.UU.³¹ Y

no corresponde a una exigencia para los laboratorios innovadores ajustarse a este marco, ya que estos fármacos demuestran su seguridad y eficacia a través de estudios clínicos.

Los hallazgos que derivan de los resultados obtenidos vienen a confirmar la necesidad de contar con procesos de fabricación validados y estandarizados entre laboratorios de la misma empresa, y considerar las guías de la SUPAC al momento de establecer procesos de transferencia tecnológica para productos farmacéuticos, cuyos titulares decidan realizar cambios en los sitios de manufactura. Adicionalmente, es difícil extrapolar las diferencias observadas in vitro entre los productos comparadores seleccionados respecto de los resultados de bioequivalencia in vivo. A este respecto, se podría argumentar que la liberación, al menos desde uno de los productos comparadores, cambia en función del pH con algún propósito particular, como podría ser, el permitir la liberación y posterior absorción de metformina en un sitio específico del tubo digestivo, que represente una ventana de absorción para el mismo, dado la dependencia que existe entre la dosis del medicamento y la cuantía de la biodisponibilidad. Estudios anteriores han demostrado sin embargo, que este fenómeno es poco probable que ocurra, dado que no se ha encontrado relación entre la dosis del medicamento y la cuantía de la absorción, medida a través del coeficiente de permeabilidad del fármaco⁵¹.

CONCLUSIONES

- Se adaptó un método analítico para la cuantificación de metformina por HPLC, el cual demostró cumplir con los parámetros de validación que se exigen para este tipo de metodología.
- Se estableció el orden cinético de los procesos de liberación disolución de los productos farmacéuticos analizados, que en todos los casos resultó ser de orden uno.
- Los perfiles de liberación disolución de metformina de los productos comparadores estudiados no permitieron avalar la hipótesis planteada, puesto que ambos productos presentan diferencias marcadas en los patrones de liberación en medios cuyos pH son distintos de 6,8. No cumpliendo con el requisito de liberación muy rápida.
- En concordancia con lo anterior, los productos comparadores en la potencia estudiada, esto es 850 mg de activo, no pueden ser empleados como productos comparadores para estudios biofarmacéuticos con fines de bioexención a los estudios de bioequivalencia in vivo.
- Los resultados no excluyen completamente la posibilidad de que potencias inferiores a los 850 mg de activo puedan optar a bioexención en base a la proporcionalidad de la dosis.

REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. 2003. Como Desarrollar y Aplicar una Política Farmacéutica Nacional. Perspectivas políticas de la OMS sobre medicamentos. Organización Mundial de la Salud Ginebra. p.1-6.
2. Organización Mundial de la Salud. 2002. Como Desarrollar y Aplicar una Política Farmacéutica Nacional. Segunda Edición. Organización Mundial de la Salud Ginebra. p.13.
3. Organización Mundial de la Salud. 2006. Salud Pública, Innovación y Derechos de Propiedad Intelectual. Comisión de Derechos de Propiedad Intelectual y Salud Pública, Organización Mundial de la Salud. p.1-188.
4. Correa C. 2002. Repercusiones de la Declaración de Doha relativa al acuerdo de sobre ADPIC y la Salud Pública. Organización Mundial de la Salud, Departamento de Medicamentos Esenciales y Política Farmacéutica; p.1-54.
5. Organización Mundial de la Salud. 2005. Multisource (Generic) Pharmaceutical Products: Guidelines on Registration Requirements to Establish Interchangeability; p. 1-39.
6. U.S. Food and Drug Administration. 2001. Title 21 Code of Federal Regulation (CFR) Part 320.21. Office of General Register National and Records Administration.
7. Giarcovich SS. 2001. Genéricos, similares y el problema de la intercambiabilidad. SAFYBI, 40 (101), p 3.

8. Saldívar H. 2007. Comparación de perfiles de disolución in Vitro de Metformina. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad de Valparaíso, Valparaíso.
9. ASILFA. 2011. Asociación Industrial de Laboratorios Farmacéuticos. Estadísticas Abril 2011. Mercado Farmacéutico Chileno. http://www.asilfa.cl/graficos-2011_2.asp (página visitada el 17 de Septiembre de 2011).
10. ASILFA. 2011. Asociación Industrial de Laboratorios Farmacéuticos. Asociación de Genéricos de EE.UU. propone modelo para dar incentivos a industria local. http://www.asilfa.cl/contenido_farmaceutico.asp?id=978 (página visitada el 17 de Septiembre de 2011).
11. Ministerio de Salud de Chile. 2004. Resolución Externa N° 515: Política Nacional de Medicamentos en la Reforma de la Salud. Santiago de Chile.
12. Instituto de Salud Pública de Chile. 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, Subdepartamento de Seguridad Departamento de Control Nacional. Santiago de Chile. p. 30.
13. Instituto de Salud Pública de Chile. 2011. Norma que establece fecha de vigencia de estudios de bioequivalencia a productos farmacéuticos de liberación convencional, monodroga que contienen los principios activos que se indican. Resolución Exenta N° 244/11. Santiago de Chile.

14. Instituto de Salud Pública de Chile. 2008. Norma que establece fecha de vigencia para la exigencia de estudios de bioequivalencia de productos farmacéuticos monodroga que contienen Clorfenamina maleato y Carbamazepina. Resolución exenta N° 3225/08. Santiago de Chile.
15. Instituto de Salud Pública de Chile. 2009. Norma que establece fecha de vigencia para la exigencia de estudios de bioequivalencia a productos farmacéuticos monodroga que contienen Ciclosporina, Diclofenaco (sódico y potásico), Cloxacilina (sódica) y Zidovudina. Resolución exenta N°728/09. Santiago de Chile.
16. Instituto de Salud Pública de Chile. 2009. Norma que establece fecha de vigencia para la exigencia de estudios de bioequivalencia de productos farmacéuticos monodroga que contienen Imatinib Mesilato, Fenitoína sódica, Biperideno clorhidrato, Levotiroxina sódica, Doxiciclina Hiclato-Monohidrato, Abacavir Sulfato, Efavirenz, Didanosina, Fosemprenavir cálcico y Prednisona. Resolución exenta N°2920/09. Santiago de Chile.
17. Ministerio de Salud de Chile. 2005. Resolución Externa N° 727. Norma que define los criterios destinados a establecer equivalencia terapéutica a productos farmacéuticos en Chile. Santiago de Chile.
18. WHO, 2006. Expert committee on Specifications for Pharmaceutical preparations, 40th Report, WHO technical Report Series N° 937, Annex 7: Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability, Geneva.

19. FDA. 2000. Guidance for Industry: Waiver of in Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms based on Biopharmaceutic Classification System. US Food and Drug Administration, Center of Drug Evaluation and Research. USA.
20. FDA, 2003. Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products – General Considerations, US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, USA.
21. Zhu H, Zhou H y Seitz K. 2009. Bioavailability and Bioequivalence. En: Qiu Y, Chen Y, Zhang G, editores. Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice; Reino Unido, p. 343-367.
22. Lobenger R. y Amidon GL. Modern bioavailability. 2000. Bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. Eur J Pharm Biopharm 50(1): p. 3-12.
23. EMEA, 1998. Note for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence (CPMP/EWP/QWP/1401/98). European Agency for Evaluation of Medicinal Products, Committee for Proprietary Medicinal Products.
24. Aulton ME. 2004. Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design. 2ª Edition. Editorial Churchill Livingstone. País Reino Unido. p. 216-219.
25. Martín A, Molina E. 2006. Polimorfismo Farmacéutico. Repercusiones Industriales y Farmacocinéticas. Ámbito Farmacéutico. Vol 25. N°8, p. 94-100.

26. Vega D. 2008. *Cristalografía en Fármacos. Curso Polimorfismo aplicado a medicamentos*. ISP-Universidad de Chile.
27. NIHS. 2006. *Guideline for bioequivalence Studies of Generic Products*. National Institute of Health Sciences, Japón.
28. EMEA, 2001. *Note for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence*. European Agency for Evaluation of Medicinal Products, Committee for Proprietary Medicinal Products.
29. Yu LX, Amidon GL, Polli JE, Zhao H, Mehta MU, Conner DP, Dhah VP, Lesko LJ, Chen M, Lee VHL y Hussain AS. 2002. "Biopharmaceutics Classification System: The Scientific Basis for Biowaiver Extensions". *Pharm Res.* 19 (7): p. 921-925.
30. Gupta E, Barends DM, Yamashita E, Lentz KA, Harmsze AM, Shah VP, Dressman JB, Lipper RA. 2006. Review of global regulations concerning biowaivers for immediate release solid oral dosage forms. *Eur. J. Pharm Sci.* 29 (3 – 4), p. 315 – 324.
31. Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. 1995. A theoretical basis for a pharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.* 12, p. 413 – 420.
32. Chow S, Liu J. 2008. *Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies*. Chapman & Hall, Third Edition; 4(14): p.451-482, (15): p.483-503.

33. Saavedra I, Iturriaga V, Ávila L, Quiñones L. 2011. Estudios de bioexención (in vitro) para establecer equivalencia terapéutica. Cuad Méd Soc (Chile). 51 (2): 66-79.
34. Rinaki E, Valsami G y Macheras P. 2003. Quantitative Biopharmaceutics Classification System: The Central Role of Dose/Solubility Ratio. Pharm Res 20 (12): p. 1917- 1925.
35. Cheng CL, Yu LX, Yang CY, Lue CS y Chou CH. 2004. "Biowaiver extension potencial to BCS Class III high solubility-low permeability drugs: bridging evidence for metformin immediate-release tablet". Eur J Pharm Sci. 22:297-304.
36. Bretnall, A. A. & Clarke, G. S., 1998. Metformin hydrochloride. In: Brittain, H. G. (Ed.), Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients, vol. 25. Academic Press. California.
37. Chou, C. H., 2000. Uptake and dispersion of metformin in the isolated perfused rat liver. J. Pharm. Pharmacol. 52, p. 1011 – 1016.
38. Blume, H. H. Schug, B. S., 1999. The biopharmaceutics classification system (BCS): class III drugs – better candidates for BA/BE waiver? Eur. J. Pharm. Sci., 9, p. 117 – 121.
39. Jantratid, E., Prakongpan, S., Amidon, G. L., Dressman, J. B., 2006. Feasibility of Biowaiver Extension to Biopharmaceutics Classification System Class III Drugs Products Cimetidine. Clin. Pharmacokinet. 45 (4), p. 385 – 399.

40. Koseki N, Kawashita H, Niina M, Nagae Y y Masuda N. 2005. "Development and validation of high selective quantitative determination of metformin in human plasma by cation exchanging with normal-phase LC/MS/MS" J Pharm Biomed Anal. 36: p. 1063-1072.
41. Gennaro A. (ed). 2003. Remington Farmacia 20^a ed. Panamericana Argentina. p. 1628-1629.
42. Huang WX, Desai M, Tang Q, Yang R, Vivilecchia R y Yoshi Y. 2006. "Elimination of metformin – croscarmellose sodium interaction by completion". Int J Pharm 311: p. 33-39.
43. Roche Pharmaceuticals. 2008. Folleto de Información al Profesional. http://www.roche.cl/fmfiles/re7220013/Folletos_Medicos/Glucophage.pdf
Página visistada el 15 de Septiembre de 2011.
44. Clifford JB. 2008. Metformin: Effects on Micro and Macrovascular Complications in Type Diabetes 2. Cardiovasc Drugs Ther. 22: p. 215-224.
45. Sin HY, Kim JY, Jung KH. 2010. Total Cholesterol, High Density Lipoprotein and Triglyceride for Cardiovascular Disease in Elderly Patients Treated with Metformin. Arch Pharm Res. 34 (1): p. 99-107.
46. Sambol NC, Chiang J, O'Conner M, Liu CY, Lin ET, Goodman AM, Benet LZ y Karam JH. 1996. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of metformin in healthy subjects and patients with noninsulin - dependent diabetes mellitus. J Clin Pharmacol 36: p. 1012 – 1021.

47. Marathe PH, Wen Y, Norton J, Greene DS, Barbhaiya RH, Wilding IR. 2000. Effect of altered gastric emptying and gastrointestinal motility on metformin absorption. *Br J Clin Pharmacol*. 50: p. 325-332.
48. Scheen, AJ. 1996. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet* 30: p. 359 – 371.
49. Florez J. 2003. *Farmacología Humana*. 4° Edición. Ed. Masson S.A. Barcelona, p. 47-60: 949 – 967.
50. Setter SM, Iltz JL, Thams J y Campbell RK. 2003. Metformin hydrochloride: In the treatment of type 2 diabetes mellitus: A clinical review with focus on dual therapy. *Clin Ther* 25 (12): p. 2991-3026.
51. Dibsí A y Gajardo, A. Determinación de la permeabilidad intestinal de metformina y del efecto del excipiente croscarmelosa medido bajo una técnica de perfusión in situ, Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, 2008.
52. Homsek I, Parojcic J, Dacevic M, Petrovic L, Jovanovic D. 2010. Justification of metformina hydrochloride biowaiver criteria based on bioequivalence study. *Arzneimittelforschung*. 60 (9): p. 553-559.
53. Ministerio de Salud. Instituto de Salud Pública de Chile. Sistema de consulta de productos registrados. <http://200.68.11.21/RegistrosISP/fimenu.asp>. Página visitada el 15 de Septiembre de 2011.

54. The United States Pharmacopeial Convention. 2011. The United States Pharmacopeia (USP) . National Formulary USP 34/ NF 29. p. 278-284; 624-630; 4806-4807.
55. Eaton J, Deng G, et al. 2007. Perturbation study of dissolution apparatus variables – a design of experiment approach. Dissolution Technology. 14: p. 20-26.
56. DeStefano AJ, Hauck WW, et al. 2010. Establishing new acceptance limits for dissolution performance verification of USPC Apparatus 1 and 2 using USPC Prednisone tablets reference standard. Pharm Res. 28 (3): p. 505-516.
57. Erweka. 2010. Instruction Manual MediPrep 120. Alemania.
58. Shimadzu Corporation. 2007. User's manual Shimadzu High Performance Liquid Chromatograph. Japón.
59. LoBrutto R y Patel T. 2007. Method Validation. En: Yuri Kazakevich, editor. HPLC for pharmaceutical scientists. Seton Hall University South Orange, New Jersey, Estados Unidos.
60. Quattrocchi O, De Andrizzi S y Laba R. 1992. Validación de métodos. En Su: Introducción a la HPLC, Aplicación y práctica. Artes Gráficas Farro S.A., Buenos Aires, Argentina.
61. Garcia GJ. 2001. Validación de Métodos Analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria A.E.F.I. Barcelona, España. p. 46-105.

62. Carmona BM. 2007. Procedimiento de Validación de Métodos Analíticos en HPLC y UV-Vis. Subdepartamento Laboratorio Nacional de Control, Instituto de Salud Pública de Chile.
63. Épshtein NA. 2004. Validation of HPLC techniques for pharmaceutical analysis, Pharm Chem J. (traducción de Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal) 38 (4): p. 212-218.
64. Vander Heyden Y, Nijhuis A, Smeyers-Verbeke J, Vandeginste BGM y Massart DL. 2001. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. J Pharm Biomed Anal. 24: p. 723-753.
65. FDA, 1997. Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms, US Center for Drug Evaluation and Research, Estados Unidos.
66. Edison Cid C. Control de Calidad Biofarmacéutico de Medicamentos. 1992. Cinética de Disolución, Farmacocinética, Biodisponibilidad. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas Universidad de Chile.
67. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 1995. Scale-Up and Postapproval Changes (SUPAC): Chemistry, Manufacturing, and Controls, In vitro Dissolution Testing, and In Vivo Bioequivalence Documentation.
68. Costa P y Sousa Lobo JM. 2001. Modeling comparison of dissolution profiles. Eur J Pharm Sci. 13 (2): p. 123-33.

ANEXOS

ANEXO I

1) RESULTADOS CALIBRACION QUIMICA EQUIPO DISOLUTOR

ANEXO I

2) RESULTADOS CALIBRACION MECANICA EQUIPO DISOLUTOR

ANEXO II

**CERTIFICADOS DE ANALISIS DE ESTANDAR Y PRODUCTOS
FARMACEUTICOS UTILIZADOS EN EL ANALISIS.**