



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

Desarrollo de medios de disolución biorrelevantes para fármacos con problemas de bioequivalencia.

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2015

Autor: Ramón Iriarte Ballesta

Modalidad: Experimental

Tutor/es: Marta González

Índice

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

INTRODUCCION

Absorción intestinal de fármacos.....	8
Clasificación biofarmacéutica.....	10
Solubilidad	10
Permeabilidad	11
Bioequivalencia y Bioexenciones.....	11
Bioequivalencia	11
Bioexenciones.....	12
Ensayo de disolución.....	14
Medios de Disolución.....	15
Fluidos Empleados	17
Fluido intestinal simulado en estado de ayunas (FaSSIF)	17
Medios preparados con tensoactivos sintéticos.....	18
Características del fármaco para seleccionar el mejor medio.....	19
Telmisartán.....	19
Propiedades fisicoquímicas.....	20
Farmacocinética.....	20

OBJETIVO

MATERIALES Y MÉTODOS

Compuestos	24
Ensayo de disgregación.....	24
Perfiles de disolución.....	24
Metodología	24
USP IV: Aparato IV o Celda de Flujo.....	25
Diseño del ensayo.....	25
Prueba de comparación f2	26
Valoración analítica	26
Método analítico.....	27

Elementos y condiciones cromatográficas.....	27
- Curvas de calibrado	28
Ensayos de linealidad	28

RESULTADOS

Validación de la técnica analítica	29
Ensayos de linealidad	29
Ensayos de precisión y exactitud.	29
Límite de detección y cuantificación	29
Ensayo de disgregación.....	30
Perfiles de disolución a pH 1.2, 4.5 y 6.8	30
Perfiles de disolución en medio FaSSIF.....	31
Perfiles de disolución a pH 1.2, 4.5 y 6.8 + Tween 80.....	32
Ensayo de disgregación.....	34
Perfiles de disolución.....	34

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES



AGRADECIMIENTOS

Quizás el mejor día para escribir agradecimientos sea el día que menos ganas tengas de hacerlos. Esto querrá decir que, de quien te acuerdes y seas capaz de escribir cuatro líneas bonitas, es quien se lo merece.

En primer lugar dar las gracias a Sarín, una farmacéutica fantástica que me ha dado una visión maravillosa del laboratorio de la vida.

Felicitar a Mayte, gran compañera y amiga, por haber soportado unos ensayos tan largos, teniendo que llevarme casi de la mano.

A Marta, por la cantidad de emails que me ha contestado y con el cariño que lo ha hecho. A pesar de haber sido un alumno tan malo y tan pesado, parece que ella ha conseguido compensarlo.

A Isabel y a Víctor por el tiempo invertido en mí, para ayudarme a perfeccionar mi trabajo y ser tan agradables conmigo. También daros las “de nada” por todo lo que en el futuro os enseñaré sobre Word. Obviamente adquiriré estos conocimientos fuera de mi horario lectivo.

A todos mis compañeros del laboratorio que tanto me han ayudado cuando lo he necesitado y que tantos buenos momentos hemos compartido.

A mi madre y a mi hermana, por ser las dos mujeres más importantes para mí y quienes más me ayudan en mi día a día.

A mi padre, gracias por mis principios.

A mis amigos, porque sin ellos, posiblemente este año habría cambiado mi forma de ser y no hubiera escrito estos agradecimientos tan poco usuales.

RESUMEN

Los fármacos clase II según el sistema de clasificación biofarmacéutico, se caracterizan por ser poco soluble pero con una elevada permeabilidad. Este sistema indica que el factor limitativo de los niveles en sangre de los fármacos pertenecientes a esta categoría son la solubilidad y la velocidad de disolución. Esto nos lleva a pensar que si imitamos las condiciones de disolución del tracto gastrointestinal, las replicamos y conseguimos datos correlacionables con los resultados que se observan in vivo podríamos hacer innecesario la investigación con sujetos humanos. En este trabajo se ha estudiado formulaciones del fármaco Telmisartán clasificado como un fármaco clase II. Se seleccionó a petición de la Agencia española de medicamento y productos sanitarios por disponer de los datos del estudio de bioequivalencia en humanos (AUC y C_{max} de test superiores a referencia), así como la cooperación de las empresas de genéricos involucradas en el proyecto para aportar sus formulaciones estudiadas. El objetivo es poner a punto una metodología in vitro biopredictiva de lo que ocurre in vivo que permitiera validar un medicamento y así abaratar el coste de producción, consiguiendo así una reducción en el precio del medicamento y que sea asequible a todo el mundo.

Utilizando el aparato de disolución de celda de flujo (USP IV) se realizaron múltiples ensayos tratando de simular las condiciones que sufre un comprimido durante su paso por el circuito enteral. Se midieron las concentraciones de fármaco a diferentes medios de disolución y tiempos.

Por último se analizaron los datos, comparándolos con los datos que se tenían de ensayos *in-vivo* y se comparó con ayuda del parámetro f₂ si eran similares entre ellos.

En el siguiente trabajo, denominado “Desarrollo de medios de disolución biorrelevantes para fármacos con problemas de bioequivalencia.”, se encuentra recogida toda la información obtenida después de meses de trabajo de investigación

INTRODUCCIÓN

Tras el período de desarrollo de un medicamento se encuentra una patente que permite su explotación con exclusividad por parte de la empresa. Una vez terminado el periodo de privilegio, se produce una liberación de la patente dando lugar a la libre explotación de este producto y pueden aparecer los medicamentos genéricos.

Un medicamento genérico puede ser comercializado una vez vencida la patente del medicamento de marca siempre que reúna todas las condiciones de calidad y suficiente bioequivalencia (OMS)¹. Considerando el complejo entorno que es el tracto gastrointestinal y las diferencias que pueden existir en la respuesta terapéutica por el diseño de una formulación y el proceso de manufactura, es necesario que los genéricos sean evaluados con rigurosidad a fin de garantizar la seguridad y eficacia exigida para todos los medicamentos.

El desarrollo de genéricos trae consigo opciones para la administración de una misma sustancia activa, que suelen tener un menor coste que el innovador y por tanto, son de más fácil acceso por parte del paciente. En principio éstos suponen un ahorro dado que, la inversión que tuvo que hacer el innovador, no tiene que realizarla la empresa de genéricos, sino que simplemente tiene que conseguir que su producto sea equivalente al producto de referencia.

Una formulación es intercambiable con el innovador siempre que sea considerada un producto esencialmente similar, que son aquellos que poseen igual principio activo cuali-cuantitativamente, igual forma de dosificación y son bioequivalentes con el producto de referencia.

Dos medicamentos del mismo principio activo que produzcan el mismo perfil de concentración tiempo en la vecindad de la membrana intestinal en cualquier condición luminal tendrán la misma velocidad y magnitud de absorción.

¹ García Arieta A, Hernández García C, Avendaño Solá C; Inf Ter Sist Nac Salud 2010 [24 jul2014]:34;71-82. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/publicaciones/articulo/docs/GarciaArietaRevTerapVol34N32010.pdf>

Para que esta premisa se cumpla ninguno de los componentes de las formulaciones puede afectar la permeabilidad de la membrana o el tiempo de tránsito intestinal y ambas formulaciones deben tener el mismo perfil de disolución en todas las condiciones luminales. Esta es la hipótesis de trabajo de Amidon y col. por las cuales estableció el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB), en el cual agrupa los fármacos según su solubilidad y permeabilidad. Estos dos parámetros, junto a la velocidad de disolución de la formulación en el lumen intestinal, son los que rigen el proceso de absorción por vía oral. Este marco científico es útil en todas las etapas de vida de un medicamento y tienen un gran impacto a nivel regulatorio, ya que permite establecer las bioexenciones (sustituir los ensayos de bioequivalencia *in vivo* por ensayos de bioequivalencia *in vitro*) como procedimiento para demostrar la bioequivalencia de genéricos que contienen fármacos de alta solubilidad. En los fármacos de baja solubilidad, la bioequivalencia debe demostrarse en estudios con humanos. Para evitar reiterados ensayos fallidos en humanos, una vez se cuenta con una cierta cantidad de datos *in vivo* se intenta conseguir una metodología *in vitro* que permita predecir lo que ocurrirá *in vivo* para hacer el ensayo de bioequivalencia con mayor garantía de éxito. Muchos grupos de investigación dirigen sus esfuerzos a desarrollar metodologías o encontrar medios capaces de predecir el comportamiento *in vivo* de los distintos principios activos.

El grupo de investigación del departamento de Ingeniería, Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la UMH colabora con la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) para dar respuesta a los motivos por los que un estudio de bioequivalencia *in vivo* falla y tratar de encontrar ensayos preclínicos que predigan este comportamiento en humanos.

En el presente trabajo el fármaco Telmisartan se seleccionó a petición de la AEMPS por disponer de los datos del estudio de bioequivalencia en humanos (AUC y C_{max} de test superiores a referencia), así como la cooperación de las empresas de genéricos involucradas en el proyecto para aportar sus formulaciones estudiadas.

Absorción intestinal de fármacos.

La vía oral es la más utilizada para la administración de fármacos ya que es la más fisiológica y cómoda para el paciente. Alrededor del 90% de las preparaciones de los medicamentos se administran por vía oral². Los fármacos administrados por esta vía deben absorberse a lo largo del tracto gastrointestinal.

En el caso de uso de la vía oral, los fármacos llegan al estómago donde permanecen 20-30 minutos al pH propio de esta cavidad (tabla 1) sin que se degrade el principio activo. Una vez superado el tiempo de retención en el estómago el comprimido accede al intestino delgado atravesando el píloro. Éste está dividido a su vez en tres segmentos: duodeno, yeyuno e íleon.

Al final del intestino delgado aparece el intestino grueso dividido nuevamente en tres secciones: ciego, colon y recto. La duración de tránsito en esta porción de intestino es más variable: puede llegar incluso a tres días. También cabe destacar que en el intestino grueso, hay una gran población de bacterias existentes que pueden ser capaces de degradar el fármaco.

Una cualidad del tracto gastrointestinal y que se debe tener en cuenta cuando se realiza una formulación y/o cuando se diseña un ensayo *in vitro* es la variación de pH en función de sus tramos³. La tabla 1 recoge los rangos de pH de los distintos tramos del tracto gastrointestinal

	En ayunas	En presencia de alimentos
Estómago	1.4-2.1	3.0-7.0
Duodeno	4.9-6.4	5.1-5.2
Yeyuno	4.4-6.5	5.2-6.2
Íleon	6.5-8.0	6.8-8.0

Tabla 1: Valores de pH según la presencia o ausencia de alimentos en los distintos tramos del tracto gastrointestinal

² Ganta, S.; Sharma, P.; Garg, S., Permeability Assessment. In Preclinical Development Handbook, Cox, S., Ed. John Wiley & Sons: New Jersey, 2008.

³ Bermejo Sanz, M.; Gonzalez-Alvarez, I., Absorption of drugs. In Pharmacokinetics in drug development, Ruiz-Garcia, A.; Casabo, V. G., Eds. San Diego, 2013; p in press.

La concentración de principio activo que hay disuelta en el fluido intestinal va a depender directamente de la velocidad de disolución y el volumen de secreciones del tracto gastrointestinal. Este volumen varía en función del tramo en el que se analice y en función del alimento que haya disgregado en la luz del tubo intestinal. En cuanto a la **solubilidad**, es un parámetro relacionado con la velocidad de absorción, dado que para que un fármaco llegue a absorberse debe estar disuelto. La solubilidad viene descrita principalmente por las características fisicoquímicas intrínsecas el compuesto: polaridad, carácter ionizable. También es posible destacar las características del medio en que se debe disolver el fármaco, puesto que las características básicas o ácidas del medio afecta al grado de ionización del principio activo.⁴

Por otro lado en cuanto a **la velocidad de disolución**, parámetro trascendental en los estudios dado que se relaciona directamente con la solubilidad. Destaca que un compuesto con baja solubilidad podría tener una disponibilidad aceptable en el caso de que la velocidad de disolución fuera rápida.

Estos parámetros quedan reflejados en la ecuación de Noyes Whitney.

$$\frac{dW}{dt} = \frac{DA(C_s - C)}{L}$$

Donde dW/dt es la velocidad de disolución, A =área superficial disponible de disolución (área del sólido), D = coeficiente de difusión, y L = espesor de la capa (adyacente) de difusión. C_s es la solubilidad del fármaco en la capa de difusión y C es la concentración de fármaco en el medio de disolución.⁵

Por lo tanto, la velocidad de disolución es directamente proporcional al área superficial disponible y al coeficiente de difusión (por lo que si estos aumentan, aumentará la velocidad de absorción). Por otro lado se observa que si aumenta el espesor de la capa disminuirá la velocidad de disolución de telmisartán libre.

El término permeabilidad describe la velocidad de transporte de la membrana intestinal y se puede aplicar independientemente del mecanismo de transporte.

⁴ Granero, L.; Polache, A., Absorption of drugs after oral administration. In Preclinical Development Handbook, Cox, S., Ed. John Wiley & Sons: New Jersey, 2008.

⁵ Gonzalez-Alvarez, I.; Fernandez-Teruel, C.; Ruiz-García, A.; Bermejo, M. Ensayos de Disolución y Correlaciones in vitro-in vivo. Farmacia SudAmericana 2002, 10, 3-21

Este parámetro depende de las propiedades fisicoquímicas. Las características que influyen en este parámetro son el pKa de la molécula, la lipofilia, el peso molecular, la superficie polar y no polar, y la capacidad de formar enlaces de hidrógeno.

Clasificación biofarmacéutica.

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, es un marco científico que permite clasificar los fármacos en cuatro grandes grupos atendiendo a las propiedades de solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal. El BCS (Sistema de Clasificación Biofarmacéutica) fue propuesto por Gordon Amidon et al⁶. Se resume en la tabla 2.

SISTEMA CLASIFICACIÓN BIOFARMACEUTICA	
CLASE I Alta Solubilidad Alta Permeabilidad	CLASE II Baja Solubilidad Alta Permeabilidad
CLASE III Alta Solubilidad Baja Permeabilidad	CLASE IV Baja Solubilidad Baja Permeabilidad

Tabla 2: Sistema de clasificación biofarmacéutica⁷

Solubilidad

La Agencia Europea de Medicamentos EMA describe como fármaco altamente soluble aquel que a su dosis más alta administrada, en formulación de liberación inmediata, se disuelve completamente en 250 ml de tampón de rango de pH de 1 a 6.8 a 37 ± 1 °C. Normalmente se utiliza tres tampones de este rango: 1.2, 4.5, 6.8 y también a $\text{pH}=\text{pKa}$ si está dentro del rango especificado anteriormente. La EMA exige que se compruebe el pH del medio antes y después de incorporar el fármaco al tampón.⁸

La *Food and Drug Administration* (FDA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) tienen definiciones parecidas para la solubilidad a las de la EMA. La

⁶ Amidon, G. L.; Lennernas, H.; Shah, V. P.; Crison, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res* 1995, 12, (3), 413-20.

⁷ Amidon, G. L.; Lennernas, H.; Shah, V. P.; Crison, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res* 1995, 12, (3), 413-20.

⁸ EMA Guidelines on the investigation of Bioequivalence; London, 2010.

única diferencia la tiene la FDA dado que establece los valores de pH en un rango entre 1 y 7.5 para realizar los estudios de solubilidad.⁹

Permeabilidad

La EMA advierte de que un fármaco tiene absorción completa si el grado de absorción es mayor del 85%. Una absorción completa del fármaco se asocia a una alta permeabilidad⁷ y la completa absorción se debe justificar con ensayos en humanos usando estudios de biodisponibilidad o balance de masas. La OMS tiene el mismo criterio que la EMA en cuanto a la alta permeabilidad, mientras que la FDA indica que la alta permeabilidad se alcanza solo con una absorción intestinal de al menos 90%^{9,10}.

Según la clasificación que el BCS le dé a cada medicamento se puede predecir cuál será su paso limitante en la absorción.

Clase I (con permeabilidad alta y solubilidad baja) el vaciado gástrico es el paso limitante en la absorción del fármaco.

Clase II (baja solubilidad y alta permeabilidad) la solubilidad y la velocidad de disolución son los procesos limitantes de la absorción.

Clase III (baja permeabilidad y alta solubilidad) el paso limitante es la permeabilidad.

Clase IV (baja solubilidad y baja permeabilidad) Ambos son procesos limitantes en la absorción de telmisartán.

Bioequivalencia y Bioexenciones

Bioequivalencia

Bioequivalencia es un término utilizado para evaluar comparativamente la equivalencia terapéutica *in vivo* entre dos formulaciones de un medicamento que contiene el mismo principio activo. Dos medicamentos son bioequivalentes si presentan la misma forma farmacéutica y no difieren de forma estadísticamente significativa en su dosis biodisponible, así como en su

⁹ FDA Exención de los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia *in vivo* para formas posológicas orales sólidas de liberación inmediata en base a un sistema de clasificación de biofarmacéutica. (15 May)

¹⁰ WHO Proposal to waive *in vivo* bioequivalence requirements for the who model list of essential medicines immediate release, solid oral dosage forms.; 2005

velocidad de cesión¹¹, lo cual garantiza que su actividad, en términos de eficacia y seguridad, será esencialmente la misma. La definición hace referencia a la velocidad y el grado de disolución que posee un principio activo desde una forma farmacéutica determinada al lugar de acción. Es difícil medir la concentración de fármaco en el lugar de acción así que se asume que esta concentración de fármaco se encuentra en equilibrio con la concentración presente en la circulación general. De ahí que la definición definitiva de biodisponibilidad es la velocidad y el grado de principio activo que se absorbe desde la forma farmacéutica hasta la circulación sistémica.¹²

La bioequivalencia se puede demostrar tanto con estudios *in vivo* como *in vitro*. La mayor diferencia entre ellos reside en que el primero engloba estudios farmacocinéticos/farmacodinámicos en humanos, ensayos clínicos de eficacia y seguridad además de requerir una mayor inversión económica y mayores limitaciones éticas (ensayos con fármacos que puedan conllevar unos efectos adversos graves,...)^{13, 8}. Por estas razones se está prestando una gran atención al desarrollo de metodologías *in vitro* que estos permitan establecer equivalencia terapéutica entre los dos fármacos con una menor inversión. Estos estudios *in vitro* se aplican a formas farmacéuticas sólidas de liberación inmediata y se recopilan con los perfiles de disolución para su posterior comparación (estos perfiles hacen referencia a las curvas de porcentaje de fármaco disuelto por unidad de tiempo). Se ensayan las formulaciones test con la referencia y diferentes medios (pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8). La solicitud de bioequivalencia por esta vía se le denomina Bioexención y está basado en el BCS¹⁴.

Bioexenciones

La definición de bioexención como un proceso regulatorio de aprobación de fármacos que permite demostrar la bioequivalencia *in vitro* como sustituto de la

¹¹ Bermejo Sanz, M.; Amidon, G. L., Modern Biopharmaceutics v6.02. Price, J., Ed. 2008.

¹² WHO Who expert committee on specifications for pharmaceutical preparations; Genova, 2006

¹³ Amidon, K. S.; Langguth, P.; Lennernas, H.; Yu, L.; Amidon, G. L. Bioequivalence of oral products and the biopharmaceutics classification system: science, regulation, and public policy. Clin Pharmacol Ther 2011, 90, (3), 467-70.

¹⁴ U.S. Department of Health & Human Services U.S (FDA) Food and Drug Administration [sede web] New Hampshire FDA: [24 feb 2010; 20 may 2015] Disponible en: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm201453.htm>

bioequivalencia *in vivo*, en formulaciones de liberación inmediata con acción sistémica que tengan la misma forma farmacéutica.

La primera aplicación de las bioexenciones fue para cambios post-registro y cambios de escala dentro de un mismo fármaco. Posteriormente, se aceptaron para la aprobación de productos genéricos de las formas farmacéuticas sólidas de liberación inmediata en los casos que los principios activos cumplan una serie de características. Esta situación redujo el coste de investigación en genéricos.

Hoy en día, tanto la EMA, como la FDA y la OMS admiten las bioexenciones como sustitutos de los ensayos de bioequivalencia *in vivo*, aunque los requisitos que exigen para aceptar la bioexención en cada una difieren ligeramente.

Según la EMA, las bioexenciones están aceptadas para las formas farmacéuticas de liberación inmediata que engloban los fármacos de clase I y clase III que cumplan estos requisitos:

- Clase I
 - Velocidad de disolución “rápida” o “muy rápida” para la formulación test y referencia.
 - Excipientes que afectan a la biodisponibilidad: deben ser equivalentes cualitativa y cuantitativamente entre el test y la referencia.
 - Otros excipientes: se prefiere el uso de los mismos excipientes en cantidades similares.
- Clase III
 - Velocidad de disolución “muy rápida” para la formulación test y referencia.
 - Excipientes que afectan a la biodisponibilidad: deben ser equivalentes cualitativa y cuantitativamente entre el test y la referencia.
 - Otros excipientes deben ser cualitativamente los mismos y cuantitativamente muy similares.

Además, se debe asegurar una liberación inmediata y probar que existe similitud entre las formulaciones test y referencia. Las disoluciones *in vitro* deben estudiarse en un rango de pH de 1 a 6.8 (al menos pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8). También suele ser necesario que el fármaco a los valores de pH tenga una mínima solubilidad.

Amidon y col.^{8, 13} defienden que una prueba de disolución que demuestre bioequivalencia de forma científicamente sólida podría ser aplicada a diario para la fabricación de nuevos productos farmacéuticos o cuando se requieren cambios de manufactura fuera de las especificaciones aprobadas. Por otro lado, argumentan que una vez terminadas las patentes de los productos innovadores, se hagan públicos los ensayos de disolución utilizados para así poder establecer estándares científicos que reduzcan la necesidad de estudios en humanos, favoreciendo así a la ética y a la economía que envuelve este campo.

Ensayo de disolución

El ensayo de disolución es un tipo de ensayo oficial recogido en las diferentes farmacopeas (EMA, USP)^{15, 16} que se utiliza para estudiar el perfil de velocidad de disolución *in vitro* de un principio activo desde una determinada forma farmacéutica. Los perfiles de disolución son gráficos en los que se representa el porcentaje acumulado de fármaco disuelto en función del tiempo. El ensayo de disolución se realiza en aparatos homologados.

En cuanto a estos aparatos homologados los empleados en este tipo de estudio, se analizan dos, concretamente el aparato 2 y el aparato 4. También son conocidos como aparato de “paletas” y “celda de flujo”.

En lo que respecta al **aparato 2** (figura 1), se trata de un aparato que dispone

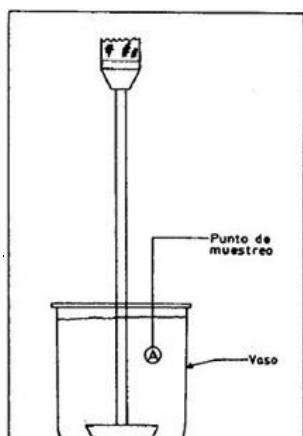


Figura 1. Aparato 2 (paletas)

de unos vasos en su interior donde se introduce el comprimido con el medio a ensayar y se encuentran atemperados por un baño termo regulado. Consta de un eje con unas paletas que simulan los movimientos

for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe. European
17. Disponible en: <https://www.edqm.eu/en/edqm-homepage-628.html>
5 NF 30. 2012, 1. <http://www.usp.org/es>

intestinales. Posee un “tomador de muestras” que extrae un determinado volumen con el objetivo de determinarlo analíticamente y observar la cantidad disuelta en el medio. Únicamente permite el uso de un medio de disolución por ensayo.

El otro aparato homologado es el conocido como **celda de flujo** (figura 2). Éste se fundamenta en el uso de una celda en la que se coloca el comprimido y por la cual circula el medio empleado para el ensayo. Se recoge el medio que atraviesa la celda en fracciones para su posterior procesamiento y análisis. Posee un funcionamiento más parecido al funcionamiento del tracto gastrointestinal y posee la ventaja de que tiene una menor implicación el factor mecánico. También posee la ventaja de que permite el cambio de medio de disolución durante el curso de la disolución.

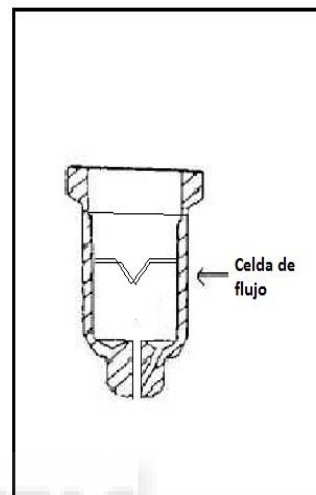


Figura 2 Aparato 4 (celda de flujo)

Medios de Disolución

Como ya se ha comentado, la absorción del fármaco depende directamente de la solubilidad del fármaco y de la velocidad de disolución, parámetros que determinarán su comportamiento *in vivo*. Estos parámetros no tienen valores fijos a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, sino que pueden variar en función de las características propias de los fluidos de cada tramo. Por esa razón, en la Farmacopea vienen recogidos diferentes medios de ensayo a diferentes pHs (pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8) cuyos tampones son concretamente: cloruro, acetato y fosfato. Éstos medios se utilizan para representar las condiciones de pH que existen en el intestino, pero no representan otros aspectos como la osmolaridad, la fuerza iónica, la viscosidad, la tensión superficial. Estos aspectos pueden llegar a tener relevancia en la absorción de los fármacos, dependiendo de las características particulares de cada principio activo.

pH: El pH del tracto gastrointestinal tiene un importante efecto sobre la disolución de medicamentos administrados por vía oral, especialmente en

aquellos que contienen fármacos con valores pKa dentro del rango fisiológico de pH. El pH del lumen intestinal depende de muchas variables como el tiempo después de administración de alimentos, volumen y contenido de los alimentos, así como del volumen de las secreciones. El valor del pH varía gradualmente a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, desde valores muy bajos en el estómago hasta un pH básico en la última sección del intestino.

Poder amortiguador: La capacidad tamponadora puede definirse como “la cantidad de ácido o base fuerte que deben añadirse a un litro de solución tampón para producir un cambio de pH de una unidad” y se expresa en $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{pH}^{-1}$. Esta capacidad tamponadora de los fluidos intestinales puede afectar la velocidad de disolución, especialmente de fármacos ionizables. La capacidad amortiguadora depende del pH del medio, de la concentración del tampón y del pKa del mismo.

Osmolaridad: La osmolaridad puede afectar la liberación del fármaco y el comportamiento de los excipientes.

Viscosidad: El aumento de la viscosidad generalmente provoca una disminución del vaciamiento gástrico y prolonga el tránsito gastrointestinal.

Tensión superficial: la tensión superficial puede influir en la humectación de las formas de dosificación y por tanto afectar la disolución. Así, una alta tensión superficial disminuye la capacidad de humectación de sólidos.

La elección del medio dependerá del lugar de absorción del fármaco y del parámetro del que dependa principalmente la velocidad de absorción: si es de disolución o de permeabilidad.

Si un fármaco se disuelve rápidamente en el estómago y es altamente permeable el tiempo de vaciado gástrico es el paso limitante, dado que su absorción se verá disminuida considerablemente. El pH del medio debe permitir la liberación completa del principio activo y su disolución. El objetivo principal para el desarrollo de ensayos *in vitro* que permitan ser predictivos *in vivo* es encontrar un medio biorrelevante que permita predecir su comportamiento.

Fluidos Empleados

En el desarrollo y la selección de un medio biopredictivo que resulte útil para predecir el comportamiento de una formulación *in vivo*, se debe considerar en igual medida las propiedades fisicoquímicas del fármaco, las características de la formulación y las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal¹⁷.

Los medios descritos en la Farmacopea Europea consisten en soluciones tampón con valores de pH comprendidos entre 1,2 y 7,5. Los tampones descritos para obtener medios con pH 1,2-1,5 contienen cloruro de sodio y ácido clorhídrico con concentración de la sal de 50 mM. Las soluciones de pH 4,5 se preparan con acetato de sodio y ácido acético y la concentración de la sal es de 36,5 mM y las que tienen un pH entre 5,8 y 6,8 contienen fosfato monobásico de potasio e hidróxido de sodio con concentración de 50 mM para la sal¹⁵. Los sistemas tampón usados en cada rango de pH, corresponden a sus valores de pKa, ya que la capacidad tamponadora de un par conjugado se ve favorecida por la cercanía del pKa al valor del pH de la solución preparada. La alta concentración iónica utilizada persigue mantener constante el pH, que puede verse modificado por la disolución del fármaco estudiado o por efecto de los excipientes de la formulación.

Sin embargo, estos medios estándar no siempre son capaces de predecir el comportamiento *in vivo* de las formulaciones obtenidas. Muchos grupos de investigación tratan de buscar actualmente medios predictivos del comportamiento *in vivo* de los diferentes principios activos¹⁸. Son los llamados medios biorrelevantes o biopredictivos. A continuación se comentan los más conocidos:

Fluido intestinal simulado en estado de ayunas (FaSSIF)

Este medio simula las condiciones del intestino delgado en ayunas. Tiene un pH representativo de los valores que se pueden encontrar entre la mitad del duodeno hasta el íleon proximal; contiene sales biliares (taurocolato sódico) y fosfolípidos (lecitina) que facilitan la humectación del sólido y la solubilización

¹⁷ S. Klein. The use of biorelevant dissolution media to forecast the *in vivo* performance of a drug. The AAPS journal. 12:397-406 (2010)

¹⁸ Dressman, J. B.; Vertzoni, M.; Goumas, K.; Reppas, C. Estimating drug solubility in the gastrointestinal tract. Adv Drug Deliv Rev 2007, 59, (7), 591-602.

de compuestos lipófilos¹⁹. La composición de este medio se detalla en la tabla 3.

FaSSIF pH 6,5	
Composición	
Taurocolato sódico (mM)	3
Lecitina (mM)	0,75
Dihidrógeno fosfato de sodio (g)	3,438
Cloruro de sodio (g)	6,186
Hidróxido de sodio c.s	pH 6,5
Agua desionizada c.s.	1L
Propiedades	
pH	6,5
Osmolaridad (mOsm/kg)	~270
Capacidad tampón (mEq/L/pH)	~12
Tensión superficial (mN/m)	54

Tabla 3: Composición del medio FaSSIF¹⁹

Medios preparados con tensoactivos sintéticos

Los medios FaSSIF y FeSSIF han resultado muy útiles para predecir el comportamiento de fármacos poco solubles, sin embargo, debido a su composición compleja, estos medios son costosos y actualmente requieren ser preparados el mismo día del ensayo porque son inestables²⁰. Por esta razón, en la actualidad se están desarrollando investigaciones encaminadas a sustituir los componentes biliares por tensoactivos sintéticos.

Taupitz y Klein, desarrollaron medios que contenían entre 0,1 y 0,5% de laurilsulfato sódico (LSS) y concentraciones entre 0,1 y 0,25% de tween 80. En el estudio realizado, utilizaron tamoxifeno como fármaco modelo clase II y obtuvieron perfiles de disolución de dicho fármaco con FaSSIF/FeSSIF que fueron comparados con los medios desarrollados utilizando tensoactivos sintéticos. Las concentraciones más bajas con gran capacidad discriminatoria fueron 0,175% y 0,1% para LSS y tween 80, respectivamente. Los autores señalan que los surfactantes sintéticos permiten el diseño de medios con capacidad discriminatoria para formulaciones que contienen fármacos poco

¹⁹ S. Klein. The use of biorelevant dissolution media to forecast the in vivo performance of a drug. The AAPS journal. 12:397-406 (2010).

²⁰ Zoeller, T and Klein, S. Simplified Biorelevant Media for Screening Dissolution Performance of Poorly Soluble Drugs. Dissolution Technol:8-13 (2007).

solubles, pero aclaran que es necesario hacer un uso crítico de la cantidad de surfactante que se usa a fin de tener medios realmente predictivos²¹.

Características del fármaco para seleccionar el mejor medio.

Para fármacos altamente solubles (Clase I y III del SCB) no se requiere del diseño de medios muy sofisticados. Los medios que se proponen en las guías de bioexenciones pueden resultar útiles y predictivos. Para los fármacos de la clase II del SCB, en los que la velocidad de disolución es el parámetro que limita su absorción, se requiere de ensayos de disolución diseñados de tal forma que permitan predecir su comportamiento *in vivo*, lo que generalmente se consigue con un medio biopredictivo¹⁹.

Telmisartán

Este fármaco (figura 3) se describe como un antagonista de receptor de

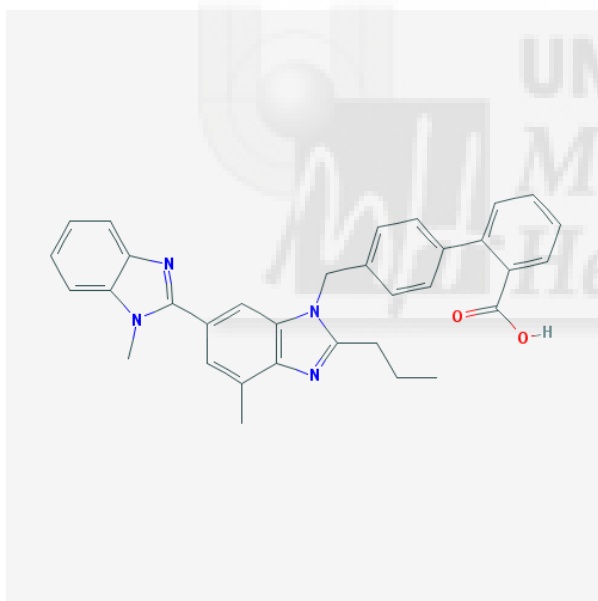


Figura 3 Estructura del Telmisartán

angiotensina II (ARA II), se utiliza en el tratamiento de la hipertensión arterial, nefropatía diabética e insuficiencia cardíaca congestiva. Generalmente su acción se basa en el bloqueo del receptor de angiotensina, su acción se basa en la modulación del sistema renina angiotensina aldosterona. Produce un bloqueo en los receptores AT1, consiguiendo así una inhibición de la acción de la angiotensina II sobre el músculo liso vascular y así, de

manera directa, causa la vasodilatación. Además reduce la secreción de vasopresina y reduce la producción y secreción de aldosterona consiguiendo incrementar el efecto sobre la reducción de la presión arterial²².

²¹ Taupitz, T. and Klein, S. Can Biorelevant Media be Simplified by using SLS and Tween 80 to Replace Bile Compounds? The Open Drug Delivery Journal. 4:30-37 (2010).

²² National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=65999, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/65999> (accessed May 25, 2015).

Telmisartán cuyo nombre IUPAC es : (2-[4-[[4-methyl-6-(1-methylbenzimidazol-2-yl)-2-propylbenzimidazol-1-yl]methyl]phenyl]benzoic acid)

Propiedades fisicoquímicas

El Telmisartán es un polvo cristalino blanco o ligeramente amarillento prácticamente insoluble en agua, poco soluble en metanol y soluble en bases fuertes como el hidróxido de sodio 1 M^{15, 16} (EMA, USP). Su peso molecular es de 514.6169 g/mol y su fórmula molecular es C₃₃H₃₀N₄O₂²³. El Telmisartán está clasificado en el BCS como un fármaco de Clase II debido a su baja solubilidad y su alta permeabilidad.

Farmacocinética

La absorción de Telmisartán es rápida aunque la cantidad absorbida varía. La biodisponibilidad absoluta media es de aproximadamente el 50 %. Por otro lado no existe una relación lineal entre dosis y niveles plasmáticos. Cuando Telmisartán se toma con alimento, la reducción del área bajo la curva de Telmisartán varía de aproximadamente el 6 % (dosis de 40 mg) a aproximadamente el 19 % (dosis de 160 mg). A las 3 horas de la administración, las concentraciones plasmáticas son similares tanto si se toma en ayunas o con alimento. Su volumen de distribución es aproximadamente 500L y su unión a proteínas plasmáticas es elevada (99,5%) siendo la albúmina y la glucoproteína alfa-I ácida.²⁴

Después de su administración, este fármaco se excreta mayoritariamente en heces. El aclaramiento plasmático total es aproximadamente de 1000 ml/min y su vida media es de 24 horas.²⁴

Por último se ha determinado que el modelo que describe el perfil farmacocinético del Telmisartán se asemeja a un modelo bicompartimental con absorción de primer orden.^{25, 26}

²³ <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/65999#section=Top>

²⁴ Ficha técnica Micardis.

http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR__Product_Information/human/000209/WC500027641.pdf

²⁵ Tatami, S.; Sarashina, A.; Yamamura, N.; Igarashi, T.; Tanigawara, Y. Population pharmacokinetics of an angiotensin II receptor antagonist, telmisartan, in healthy volunteers and hypertensive patients. *Drug Metab Pharmacokinet* 2003, 18, (3), 203-11.

²⁶ Tatami, S.; Yamamura, N.; Sarashina, A.; Yong, C. L.; Igarashi, T.; Tanigawara, Y. Pharmacokinetic comparison of an angiotensin II receptor antagonist, telmisartan, in Japanese and western hypertensive patients using population pharmacokinetic method. *Drug Metab Pharmacokinet* 2004, 19, (1), 1523.

En lo que respecta a la patente de telmisartán. Boehringer-Ingelheim²⁷ lo patentó bajo el nombre de Micardis®. Su monopolio espiró en enero de 2014 en E.E.U.U. después de 17 años de patente. En Europa, la patente finalizó en diciembre de 2013. Desde su finalización, las empresas de genéricos tratan de confeccionar un comprimido con el principio activo para poder surtir al mercado²⁸.



²⁷ Ficha técnica Micardis http://www.boehringer-ingelheim.com/content/dam/internet/opu/com_EN/document/01_news/02_Press_and_Informationpacks/micardis.pdf

²⁸ GenericsWeb [sede web] [Agosto 2013; mayo 2015] Disponible en: http://www.genericsweb.com/index.php?object_id=1167

OBJETIVO

Una vez expuestos los beneficios de los ensayos *in vitro*, su utilidad a la hora de generar genéricos para garantizar su eficacia y seguridad, además de reducir los ensayos en humanos. El objetivo es encontrar estos medios para desarrollar correlaciones *in vitro-in vivo* validadas que garanticen la bioequivalencia *in vivo* del medicamento.

En este trabajo concreto el objetivo consiste en encontrar una metodología *in vitro* que permita predecir el comportamiento *in vivo* observado en ensayos de bioequivalencia en voluntarios sanos de formulaciones test de Telmisartán respecto al medicamento de referencia Micardis®. En concreto, se trata de encontrar un ensayo o un medio de disolución que permitan obtener *in vitro* un perfil de disolución del fármaco que prediga su comportamiento *in vivo*. Este medio deberá generar perfiles de disolución *in vitro* que permita correlacionarlos con los parámetros de las distintas formulaciones obtenidos *in vivo*.

La Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, a través de un acuerdo de colaboración y con el consentimiento y colaboración de las empresas farmacéuticas promotoras de los ensayos, suministró datos y comprimidos de 3 formulaciones de Telmisartán sometidas a ensayos de bioequivalencia frente al medicamento referencia Micardis®.

Este objetivo general se ha concretado en varios objetivos concretos:

- 1) Determinar los tiempos de disgregación de Micardis (referencia) y de las tres formulaciones ensayadas para ver si hay diferencias en estos tiempos que permitan explicar los datos *in vivo* proporcionados por la Agencia del Medicamento.
- 2) Realizar los perfiles de disolución en los tampones estándar que indica la farmacopea en el aparato de celda de flujo de la formulación de referencia Micardis y de las tres formulaciones ensayadas para ver si estos medios son capaces de predecir lo que se observa *in vivo*.

- 3) Realizar los perfiles de disolución en con el medio biopredictiva FaSSIF en el aparato de celda de flujo de la formulación de referencia Micardis y de las tres formulaciones ensayadas para ver si estos medios son capaces de predecir lo que se observa *in vivo*.
- 4) Realizar los perfiles de disolución en los tampones estándar que indica la farmacopea adicionados de tensiactivo en el aparato de celda de flujo de la formulación de referencia Micardis y de las tres formulaciones ensayadas para ver si estos medios son capaces de predecir lo que se observa *in vivo*.



MATERIALES Y MÉTODOS.

Compuestos

El principio activo que se ha estudiado ha sido el telmisartán. Como patrón se usó el fármaco puro. Para la realización de este trabajo de investigación dos laboratorios farmacéuticos facilitaron muestras de distintos lotes de formulaciones de telmisartán, previamente ensayadas *in vitro* y en humanos. Sólo uno de los lotes resultó ser bioequivalente en los ensayos en humanos. En la tabla 4 se muestran dichos lotes, los ratios (test/referencia) de las concentraciones máximas alcanzadas en plasma (C_{max}) y las áreas bajo la curva (AUC) y sus respectivos intervalos de confianza al 90% (IC). Para aceptar bioequivalencia los ratios de C_{max} y AUC deben ser mayores del 85% en ambos casos y los IC deben estar comprendidos entre 80 y 125%.

LAB	LOTE	BE (HUMANOS)	C _{MAX}		AUC	
			Ratio (%)	IC90% (%)	Ratio (%)	IC90% (%)
X	X1	NO	86.31	(78.11;95.37)	93.99	(89.27;98.97)
	X2	SI	93.80	(82.77;106.33)	93.50	(89.30;97.94)
Y	Y1	NO	81.34	(72.31;91.51)	97,04	(92.43;101.97)

Tabla 4. Resultados de bioequivalencia *in vivo* de las formulaciones test IC: interval de confianza. BE (formulación bioequivalente), NBE (formulación no bioequivalente).

Ensayo de disgregación

Para medir el tiempo de desintegración de un comprimido se utilizó un aparato de test USP sin discos. En el trabajo se empleó un tomador de muestras (PharmaTest). Todos los experimentos fueron llevados a cabo en un volumen de 900ml de agua a 37°C usando seis comprimidos por cada ensayo (Ph. Eur. Method 2.9.1). Los tiempos de desintegración se determinaron de manera individual y posteriormente se calculó la media y la desviación estándar.

Perfiles de disolución

Metodología

Se procede a la preparación del medio de disolución tamponado correspondiente al pH que se desea analizar¹⁵. El medio se desgasifica

mediante filtración al vacío a través de un filtro Millipore tipo HNWP de nylon de 0,45 μm durante 10 minutos con agitación magnética^{18, 29}. Se utiliza este sistema para conseguir un completo contacto entre la superficie del comprimido y el medio dado que si existen que burbujas de aire se sitúan en esta interfaz, no se dispondría de una completa disolución, dado que no sería uniforme. Se estaría cometiendo un error al introducir una fuente de variabilidad en el ensayo.

Se coloca cada comprimido a ensayar encima del retenedor, se comprobaría que el sistema estuviera completamente hermético y se procedería al comienzo del ensayo.

USP IV: Aparato IV o Celda de Flujo

Los perfiles de disolución de telmisartán fueron ensayados utilizando el aparato IV descrito en la USP. Estos perfiles de disolución fueron obtenidos con un sistema de celda de flujo automático, USP Apparatus 4(Erweka, Germany) con 22.6 mm de celda (i.d.) y una bomba de pistón (Erweka, Germany). En todos los experimentos se empleó un flujo laminar (conseguido gracias a una cama de 6g de perlas de vidrio). El medio de disolución se desgasifica y se aumenta la temperatura a $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$, bombeando un caudal de 8mL/min. En cuanto al Sistema, era abierto, sin reciclar el medio empleado en el ensayo; además el muestreo fue secuencial, utilizando unas membranas de celulosa de 0.45 μm (Millipore) y diferentes intervalos de tiempo para la muestra además de seis repeticiones. La cantidad de telmisartán disuelto fue determinada con el HPLC. Es importante comprobar que el filtro de celulosa no cede compuestos al medio de disolución que puedan interferir en el análisis.

Durante el ensayo se procede a la toma de muestra secuencial a los tiempos prefijados (5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90 y 120 minutos) asegurando que se ha alcanzado la asíntota de la curva de fracción disuelta frente al tiempo. Se mantuvieron estos tiempos para todos los medios, puesto que el objetivo era utilizar una metodología sistemáticamente idéntica en cada ensayo.

Diseño del ensayo

El ensayo ha consistido en obtener los perfiles de disolución de las tres formulaciones test y de la referencia. En este trabajo se tratará de obtener

perfiles de disolución de todas estas formulaciones facilitadas por los laboratorios y sus perfiles en los diferentes medios de disolución. Se utilizarán métodos estadísticos para determinar la similitud. El objetivo es la búsqueda del medio de disolución ideal que permita predecir y reproducir los resultados obtenidos *in vivo*.

Prueba de comparación f2

Para comprobar si los perfiles de velocidad de disolución entre el fármaco test y la referencia se utiliza un factor de similitud.

Dicho factor es el “factor de similitud: f2” aceptado por la EMA y la FDA. Se trata de un parámetro independiente del modelo cinético de disolución y se basa en la similitud en porcentaje de disolución entre las dos curvas.

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \cdot 100 \right\}$$

- n= número de puntos que se comparan
- Rt= % de fármaco referencia
- Tt= % de fármaco test

El cálculo del factor de similitud tiene como requisito de incluir solo el primer valor que se encuentre mayor del 85%. Si el valor que adquiere f2 es mayor o igual a 50 se determina que las curvas son iguales.

Valoración analítica

Se tomaron las muestras a los tiempos de terminados en un tubo de ensayo. Se tomó un volumen de 750 µL de muestra y se le añadieron otros 750 µL de medio, quedando así la disolución a razón de 1:1. Se utiliza este procedimiento dado que este fármaco, como se ha hablado anteriormente, posee una solubilidad muy baja. Al aumentar la cantidad de medio en el vial, cuando baje la temperatura de los 37,5°C que tenía en el baño consigue que no precipite.

Para la determinación cuantitativa de fármaco disuelto, se emplea el HPLC. La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica. El HPLC

es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.²⁹

Método analítico

Para aceptar las muestras se parte de la premisa de que, el área que refleja el cromatograma es proporcional a la concentración de fármaco disuelto presente en la muestra.

Con el fin de conseguir un método de comparación con el que obtener la concentración de principio activo, se emplearon curvas de calibración. De este modo conseguimos establecer una linealidad del modelo, una exactitud ligada a una precisión del método analítico. También se tuvo en cuenta la cuantificación del compuesto y los límites de detección.

El método analítico empleado para este trabajo ha sido validado. La funcionalidad del método analítico se comprobó diariamente a través de una curva de calibración con patrones de concentración conocida, determinando el coeficiente de linealidad, precisión, exactitud y límites de detección y cuantificación de la técnica analítica.

Elementos y condiciones cromatográficas

Elementos

Se ha utilizado un sistema cromatográfico compuesto por los siguientes módulos:

- Sistema Alliance (Waters) 2695 compuesto por una bomba cuaternaria y un inyector automático.
- Detector programable de fluorescencia Waters 2475.
- Integrador: programa Empower.

Condiciones:

La fase estacionaria seleccionada ha sido un sistema de fase reversa compuesto por:

- Precolumna Teknocroma TCR-C130-B, con dos filtros de 2 μm y relleno con micropartículas C-18 de 40 μm de tamaño.

²⁹Skoog, D., Holler, F., Nieman, T. and Martín Gómez, M. (2001). Principios de análisis instrumental. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.

- Columna de acero inoxidable Waters modelo Nova Pak C-18 de 150 mm de longitud, 3,9 mm de diámetro y tamaño de partícula de 4µm.

La fase móvil que se emplea es una mezcla en proporción volumétrica 55:45 de solución acuosa de ácido trifluoroacético 13 mM a pH 1,84 y acetonitrilo. La fase móvil se hace pasar a través de un filtro de 0,45 µm Millipore tipo HNWP de nylon de diámetro de poro para eliminar partículas en suspensión y desgasifica, evitando así que el aire interfiera. La velocidad de flujo a través de la columna cromatográfica es de 1 ml/min. En estas condiciones el tiempo de retención del compuesto ensayado ha sido de 2 minutos. La longitud de onda de excitación es de 305 nm y la de emisión es de 365 nm.

- **Curvas de calibrado**

Las curvas de calibrado se preparan diariamente diluyendo una solución stock de telmisartán (890 µg/mL en agua bidestilada, acetonitrilo y ácido trifluoroacético [500:500:1]) con tampón fosfato 50 mM a pH 6,8 para obtener las siguientes concentraciones: 4,45 µg/mL, 8,9 µg/mL, 14,24 µg/mL, 17,8 µg/mL, 24,03 µg/mL, 30,26 µg/mL, 36,5 µg/mL.

Ensayos de linealidad

Linealidad de la curva de calibrado abarcaba el espectro de concentraciones que era posible obtener acorde con los ensayos para así conseguir una interpolación de los resultados obtenidos.

$$y = m \times X + b$$

Y=área recogida por el cromatograma (cantidad de compuesto en la muestra)

X= concentración teórica

Resultados

Validación de la técnica analítica

Ensayos de linealidad

Se realizaron estudios de linealidad de las curvas de calibración utilizadas con el fin de validar las concentraciones que se obtuvieron durante el proceso de valoración. Se observa que la tabla 5 refleja un coeficiente r^2 (de determinación) muy cercano a 1.

Telmisartán ($\mu\text{g/mL}$)	R^2
4,45-36,03	0.998

Tabla 5 Ensayo de linealidad de la curva de calibración que más tarde se emplea en la valoración de las muestras.

Ensayos de precisión y exactitud.

Los estudios de precisión reflejan que los coeficientes de variación de todos los puntos de la recta son inferiores al 5%.

En la tabla 6 aparecen los datos de exactitud realizados sobre la escala de patrones conocida, se observa el error absoluto (E_a) y el relativo ($E_r\%$).

Telmisartán ($\mu\text{g/mL}$)	$P_{8,9}$	E_a	$E_r\%$	$P_{17,8}$	E_a	$E_r\%$	$P_{30,26}$	E_a	$E_r\%$
4,45-36,03	8,14	-0,76	-9,33	17,89	0,09	0,48	29,48	-0,78	-2,66

Tabla 6 Refleja el ensayo de exactitud de la curva de calibración.

Límite de detección y cuantificación

Los datos de la tabla 7, que aparece a continuación, indican que los métodos analíticos empleados han demostrado ser selectivos y sensibles para la correcta cuantificación de las muestras de telmisartán.

Telmisartán ($\mu\text{g/mL}$)	Límite de detección	Límite de cuantificación
4,45-36,03	1,29	3,89

Tabla 7 Concentraciones para la que se es sensible la cuantificación de telmisartán.

Ensayo de disgregación

Los resultados del ensayo de disgregación realizado en las condiciones que se describen en el apartado de Materiales y Métodos se muestran en la tabla 8.

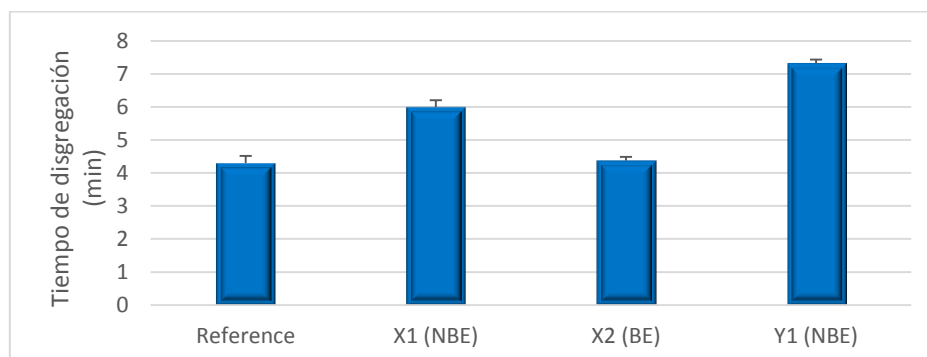


Figura 4. Tiempo de disgregación en minutos de la formulación de referencia Micardis y de las formulaciones ensayadas X1, X2 e Y1

Perfiles de disolución a pH 1.2, 4.5 y 6.8

En la tabla 9 se presentan los valores medios de porcentaje disuelto de Telmisartán en función del tiempo de la formulación de referencia Micardis y de las formulaciones test, bioequivalentes y no bioequivalentes. Se utilizan los medios standard descritos en la Farmacopea Europea durante los tiempos establecidos (pH 1.2 tampón cloruro sódico, t=0-15min; pH 4.5 tampón acetato, t=15-45min; pH 6.8 tampón fosfato, t=45-120min). La figura 5 muestra la representación gráfica de estos perfiles.

Tiempo (min)	Micardis		Y1		X1		X2	
	%disuelto	SD	%disuelto	SD	%disuelto	SD	%disuelto	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	2,68	2,04	7,41	3,42	10,33	1,47	2,30	14,33
10	6,82	1,66	12,63	4,03	18,12	1,80	7,83	13,88
15	12,95	2,20	15,81	4,10	22,12	1,97	13,58	18,22
20	19,45	5,33	18,56	4,53	27,56	2,76	18,04	15,56
30	21,42	6,36	19,94	5,01	29,77	2,74	19,79	14,36
45	29,93	6,11	27,63	4,82	38,40	1,63	32,07	4,74
60	43,42	5,20	41,74	0,84	49,29	0,58	43,06	15,92
90	63,22	4,54	63,91	5,34	53,83	0,94	52,08	8,05
120	65,04	4,19	64,43	5,66	54,92	1,03	53,89	8,95

Tabla 8 Porcentajes disueltos de Telmisartan de Micardis y de las tres formulaciones test ensayadas (X1, X2, Y1) a los distintos tiempos de toma de muestra utilizando los tampones standard a pH=1,2; 4,5 y 6,8 sucesivamente con un aparato de disolución IV.

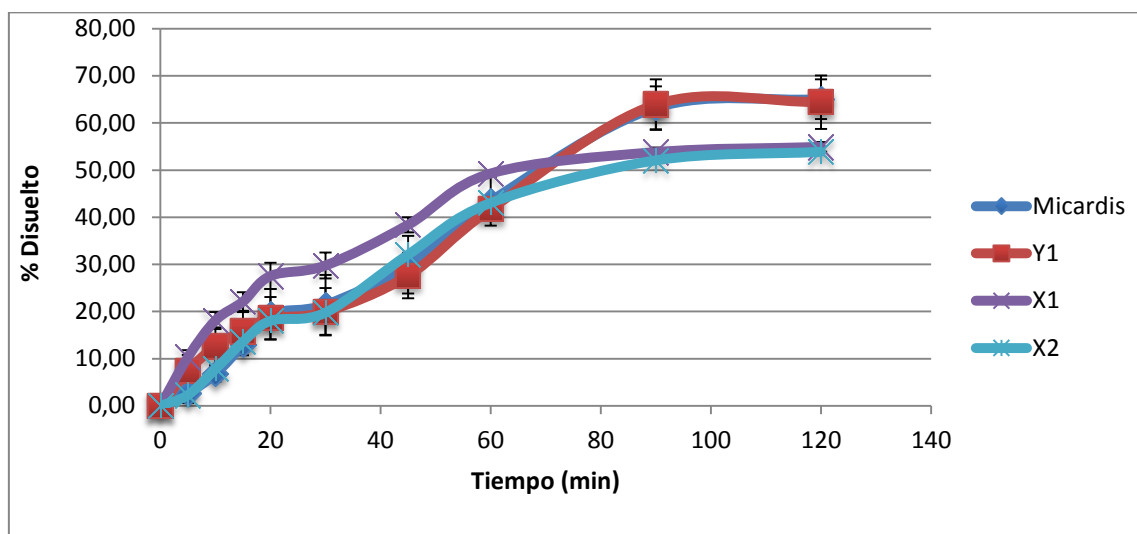


Figura 5. Perfiles de disolución de Telmisartan obtenidos a partir Micardis y de las tres formulaciones test ensayadas (X1, X2, Y1) utilizando los tampones standard a pH=1,2; 4,5 y 6,8 sucesivamente con un aparato de disolución IV

Perfiles de disolución en medio FaSSIF

En la tabla 10 se presentan los valores medios de porcentaje disuelto de Telmisartan en función del tiempo de la formulación de referencia Micardis y de las formulaciones test X1, X2, Y1 e Y2 utilizando el medio biorrelevante FaSSIF descrito previamente. La figura 6 muestra la representación gráfica de estos perfiles.

Tiempo (min)	Micardis		Y1		X1		X2	
	%disuelto	SD	%disuelto	SD	%disuelto	SD	%disuelto	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	7,63	0,37	4,94	2,21	5,14	1,19	3,63	9,75
10	15,00	0,71	12,23	3,16	9,98	0,88	7,31	9,11
15	21,63	0,80	19,01	4,29	14,11	0,87	10,89	13,13
20	28,17	0,80	25,21	5,08	18,79	0,98	14,56	8,88
30	41,10	0,80	37,04	5,82	31,59	0,89	21,11	6,76
45	58,62	2,17	51,54	6,37	38,77	2,94	22,20	6,75
60	68,74	1,74	55,83	4,69	39,06	2,93	22,38	7,00
90	70,33	1,91	56,72	4,83	39,24	2,93	22,53	7,11
120	70,89	2,10	57,16	4,90	39,37	2,92	22,64	7,17

Tabla 9 Porcentajes disueltos de Telmisartan a partir de la formulación de referencia Micardis y de las tres formulaciones test ensayadas (X1, X2, Y1) a los distintos tiempos de toma de muestra en medio FaSSIF utilizando un aparato de disolución IV.

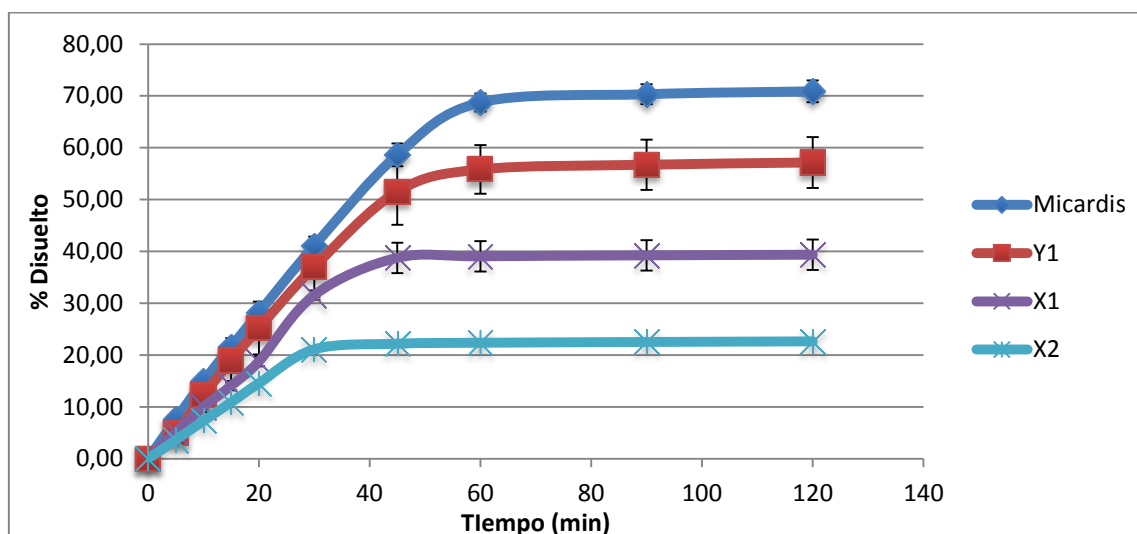


Figura 6. Perfiles de disolución de Telmisartan obtenidos a partir Micardis y de las tres formulaciones test ensayadas (X1, X2, Y1) en medio FaSSIF utilizando un aparato de disolución IV

Perfiles de disolución a pH 1.2, 4.5 y 6.8 + Tween 80

En la tabla 11 se presentan los valores medios de porcentaje disuelto de Telmisartán en función del tiempo de la formulación de referencia Micardis y de las formulaciones test, bioequivalentes y no bioequivalentes. Se utilizan los medios standard descritos en la Farmacopea Europea adicionados de 0,05% Tween 80 durante los tiempos establecidos (pH 1.2 tampón cloruro sódico, t=0-15min; pH 4.5 tampón acetato, t=15-45min; pH 6.8 tampón fosfato, t=45-120). La figura 7 muestra la representación gráfica de estos perfiles

Tiempo (min)	Micardis		Y1		X1		X2	
	%disuelto	SD	%disuelto	SD	%disuelto	SD	%disuelto	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	4,04	0,25	4,30	0,04	3,43	0,20	4,12	9,10
10	11,24	0,54	8,52	0,38	9,13	0,11	11,18	3,54
15	18,18	0,95	11,61	0,74	15,03	0,66	17,92	3,61
20	23,85	1,14	14,12	1,04	19,77	0,29	23,69	2,74
30	25,38	1,42	15,27	1,18	21,12	0,62	25,42	2,86
45	35,78	1,60	20,68	3,00	32,53	3,03	35,78	6,96
60	45,78	2,67	31,62	5,48	41,66	6,12	44,74	5,36
90	54,45	0,43	44,11	6,98	45,53	3,44	47,56	4,81

120	55,96	0,43	49,23	4,60	46,47	3,15	48,22	4,66
-----	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------

Tabla 10 Porcentajes disueltos de Telmisartan de Micardis y de las tres formulaciones test ensayadas (X1, X2, Y1) a los distintos tiempos de toma de muestra utilizando los tampones standard a pH=1,2; 4,5 y 6,8 adicionados de tensioactivo Tween 0,05% sucesivamente

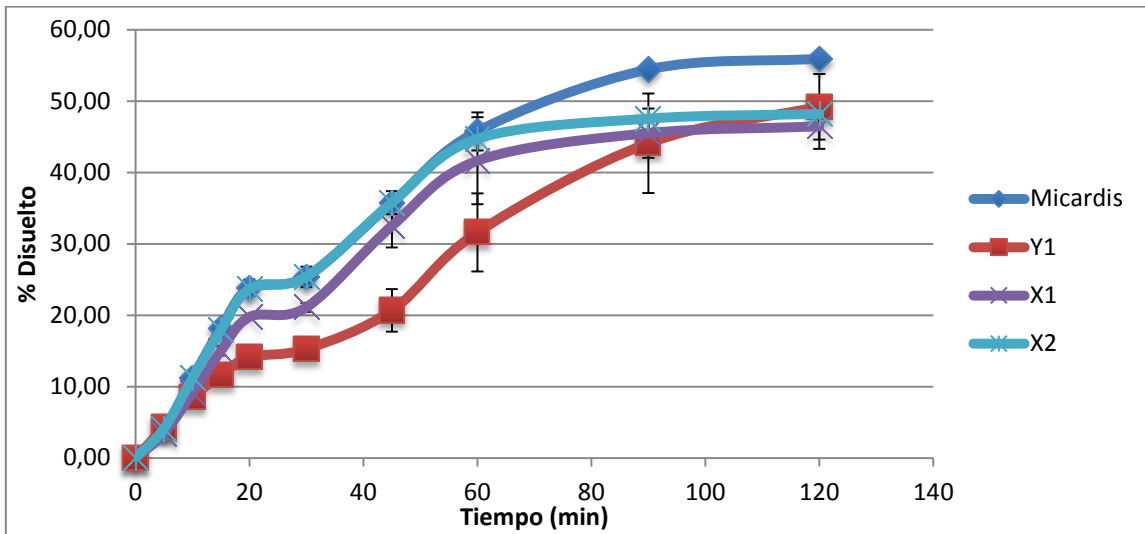


Figura 7. Perfiles de disolución de Telmisartan obtenidos a partir Micardis y de las tres formulaciones test ensayadas (X1, X2, Y1) utilizando los tampones a pH=1,2; 4,5 y 6,8 adicionados de Tween 0,05 sucesivamente con un aparato de disolución IV

Por último, encontramos la tabla 12. Muestra los valores que adopta el factor de similitud para cada presentación test estudiada comparados con la curva de disolución de Micardis.

	X1	X2	Y1
Micardis	59,08	73,99	43,04

Tabla 11 Valores del factor de similitud f_2 para cada formulación comparados con la formulación de referencia Micardis

DISCUSIÓN

Ensayo de disgregación

Los tiempos de disgregación se han determinado como se indica en el apartado correspondiente. La formulación de referencia Micardis presenta un tiempo de disgregación de 4,3 minutos. Este tiempo es muy similar al observado para la formulación X2 ($t = 4,37$) que es la que resultó bioequivalente en los ensayos *in vivo*.

La formulación X1, no bioequivalente, obtuvo tiempo de disgregación de unos 6 minutos lo cual indica que este proceso inicial fue claramente más lento que en las formulaciones anteriores y la formulación Y1, que presentaba valores *in vivo* bastante más alejados de los obtenidos con la formulación de referencia, presentó valores de tiempo de disgregación de 7,3 minutos. Estos resultados indican que, en este caso, el ensayo de disgregación ha resultado ser predictivo de los resultados obtenidos *in vivo*. Aunque las guías regulatorias no contemplan este ensayo es necesario realizar muchos más estudios para evaluar las posibilidades de este ensayo y determinar su grado de fiabilidad como herramienta biopredictiva.

Perfiles de disolución

Los perfiles de disolución realizados en el presente trabajo se realizaron utilizando el aparato IV descrito en la Farmacopea Europea ya que el grupo había realizado previamente ensayos con el aparato tipo II sin llegar a encontrar el medio adecuado que permitiera predecir los resultados obtenidos *in vivo*. El estudio se diseñó con el fin de encontrar un medio de disolución que permitiera predecir los resultados obtenidos a partir de los estudios de bioequivalencia *in vivo* llevado a cabo con voluntarios sanos. Para ello se ensayaron los medios standard que indica la farmacopea y que ya se habían ensayado previamente en el grupo de investigación utilizando el aparato II. La diferencia principal es que con el aparato II se realizan ensayos de disolución concretos para cada pH mientras que el aparato de celda de flujo o aparato IV permite realizar un proceso de disolución en continuo cambiando de pH a los

tiempos prefijados. Esto permite que el comprimido esté sometido un proceso similar al que sufre cuando es ingerido en condiciones *in vivo*, ya que los diferentes tampones imitan las condiciones de los fluidos gástrico, de transición e intestinal respectivamente. Además de los tampones estándar se ensayó el medio FaSSIF descrito como medio biopredictivo en algunas publicaciones y que simula las condiciones del intestino delgado en ayunas. Este medio tiene un pH similar al valor que se encuentra desde la mitad del duodeno hasta la porción proximal del Íleon y contiene otros componentes que hacen que imite de manera más real el fluido intestinal tales como sales biliares y fosfolípidos.

Por último se realizaron los perfiles de disolución con los tampones descritos en la farmacopea, pero adicionados del emulgente Tween 80 0,05%. Estos medios han sido descritos también como biopredictivos en distintas publicaciones para fármacos poco solubles siempre que se ajuste la proporción de emulgente en cada caso. Con este medio se consigue imitar los cambios de pH que sufre un comprimido cuando se ingiere en ayunas y además el efecto solubilizante de las sales biliares en el tracto gastrointestinal

En los estudios de disolución de los comprimidos de Telmisartan, como se puede observar en las tablas y en las gráficas, no se disuelve el 85% del principio activo a los 10 minutos de ensayos, tal como cabía esperar debido a que es un compuesto de baja solubilidad. En estos casos, es necesario calcular el factor de similitud f_2 para comparar los perfiles. El medio capaz de predecir los resultados *in vivo* daría lugar a perfiles que se ordenarían así: Micardis, X2, X1, Y1 y el valor de f_2 debería ser igual o mayor de 50 para la formulación X2 y menor de 50 para las otras en relación con el Micardis.

Los resultados indican que los perfiles obtenidos con el aparato 4 o celda de flujo utilizando de manera consecutiva los tampones standard recomendados en la farmacopea pH=1,2, pH= 4,5 y pH= 6,8 no consiguen reproducir los resultados *in vivo*. De hecho, con Micardis que es la formulación que obtiene resultados más elevados de C_{max} y AUC *in vivo*, es con la formulación que se obtiene un porcentaje disuelto más bajo por lo que este medio quedaría descartado como medio biopredictivo del comportamiento de telmisartán.

En FaSSIF tampoco se reproducen los resultados *in vivo*. Aunque en este caso el perfil de Micardis está claramente por encima de los demás, el perfil que le sigue es el de Y1 que no es bioequivalente según los resultados *in vivo*, le sigue X1 y finalmente X2 que, aunque sale en último lugar es el que debería ser similar a Micardis.

El tercer medio que se ha probado ha consistido en el set de tampones a distintos pHs (1,2; 4,5 y 6,8) adicionados de 0,05% de tween 80. Este medio ha resultado ser biopredictivo y permite que las formulaciones se ordenen de manera acorde a como se había estimado teniendo en cuenta los resultados *in vivo*. Los resultados del factor de similitud f_2 indican que la formulación X2 es bioequivalente con Micardis, lo cual concuerda con los resultados obtenidos *in vivo* y que la formulación Y1 ($f_2 = 43,06$) es no bioequivalente, lo cual confirma que este medio puede predecir la no bioequivalencia observada *in vivo*. Para la formulación X1 se obtiene un valor de F_2 de 59,08 lo cual sería indicativo de bioequivalente. Realmente esta formulación se considera no bioequivalente pero los parámetros *in vivo* están en el límite del rango aceptado por lo que pequeñas variaciones en el procedimiento experimental pueden dar lugar a observar tanto *in vitro* como *in vivo* bioequivalencia o no bioequivalencia pero lo que consideramos que este medio de disolución es biopredictivo de lo que ocurre *in vivo*.

CONCLUSIONES

1. El ensayo de disgregación ha aportado resultados concordantes con el comportamiento *in vivo* de las distintas formulaciones ensayadas. Aunque es prematuro otorgarle a este tipo de ensayos la categoría de biopredictivos, los resultados obtenidos son prometedores y abren la posibilidad considerar estos sencillos ensayos como herramienta de trabajo previo que permita abordar los ensayos de bioequivalencia en humanos con mayor garantía de éxito.
2. Los medios standard descritos en la farmacopea y utilizados de manera secuencial en un aparato de disolución tipo IV no han reflejado el comportamiento *in vivo* de las distintas formulaciones de Telmisartán
3. El medio descrito como biorrelevante FaSSIF utilizado con una metodología de celda de flujo no ha sido capaz de dar respuesta a los parámetros observados en el ensayo *in vivo* con voluntarios sanos.
4. Los medios a pH= 1,2; 4,5 y 6,8 adicionados de Tween 80 utilizados secuencialmente han permitido reproducir los resultados observados *in vivo* y se puede considerar biopredictivo para el telmisartán.