



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco



Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Sistemas Biológicos

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Informe de actividades del Servicio Social: Análisis de Mezclas Binarias de Cafeína y AINes Contenidos en Medicamentos Comerciales

Proyecto genérico correspondiente a: Evaluación de productos relacionados con la salud.

Alumno: Pedro Garcia Hernández

Matrícula: 2152031057

Asesores: M. en C. José Raúl Medina López
M. en C. Marcela Hurtado Y De La Peña

Lugar de realización: Laboratorios de farmacocinética y Farmacodinamia N-102 y N-012 de UIDIS, Universidad Autónoma Metropolitana; Unidad Xochimilco.

Fecha de inicio del proyecto: 25 de septiembre de 2019

Fecha de término del proyecto: 25 de marzo de 2020

Índice

Introducción.....	4
Marco teórico.....	5
Aspectos biofarmacéuticos	5
Sistema de Clasificación Biofarmacéutico.....	5
Genéricos intercambiables.....	6
Condiciones para las pruebas de disolución	6
Equipos de disolución.....	6
Aparatos	7
Medios de disolución.	7
Agitación.....	7
Perfil de disolución y equivalencia In Vitro	8
Bioequivalencia.	8
Acetaminofén.....	8
Acetaminofen-Cafeína.....	9
OBJETIVOS.....	11
General	11
Específicos.....	11
DESARROLLO EXPERIMENTAL	12
Productos	12
Material	12
Reactivos	12
Equipo	13
Condiciones espectrofotométricas	13
Curvas de calibración	13
Acetaminofén	13
Cafeína.....	13
Linealidad	14
Precisión	14
Uniformidad de unidades de dosificación y pruebas de ensayo.	14
Perfiles de disolución	14
Aparato 2 USP	14
Aparato USP 4	14

Análisis de datos.....	14
Resultados	16
Método derivado UV.....	16
Linealidad, precisión y exactitud.....	16
Uniformidad de dosis y prueba de ensayo.....	17
Perfiles de disolución	18
Discusión.	20
Conclusión	22
Referencias.....	22

Introducción.

Actualmente en México el acetaminofén (ACE) es uno de los medicamentos mayormente consumidos por la población, es un analgésico y antipirético eficaz para el control leve o moderado causado por afecciones articulares, otalgias, cefaleas y neuralgias. El ACE puede ser utilizado en combinación con cafeína (CAF) que ayuda a potenciar el efecto del acetaminofén. Las tabletas que contienen ACE y CAF son utilizadas como analgésico y antipirético, principalmente utilizado en dolores de cabeza intensos y el alivio de los síntomas producidos por la gripe.

En el mercado actual existen una gran variedad de productos que contienen ACE ya sea solo o en combinación con otros fármacos, en diferentes dosis y formas farmacéuticas. Todos estos medicamentos cuentan con un registro sanitario y se puede asumir, por lo tanto, que han cumplido con los requisitos necesarios en cuanto a seguridad y eficacia.

La FDA contempla en sus “Guías para la industria”, la posibilidad de reemplazar los estudios realizados *in vivo* por ensayos *in vitro* (bioexención), siempre y cuando el fármaco reúna ciertas condiciones y se presente como una forma farmacéutica sólida de liberación inmediata. Esta opción de realizar los estudios *in vitro* propone un camino más sencillo a la hora de efectuar los trámites de registros sanitarios, generando así una contribución en el campo regulatorio que garantice la seguridad, calidad y eficacia del medicamento a un costo menor. Sin embargo, es necesario que el medicamento en cuestión demuestre bajo condiciones claramente especificadas su capacidad de liberación.

En este trabajo se realizó el estudio sobre la evaluación de la velocidad de disolución, así como el grado de liberación del fármaco de medicamentos comerciales de ACE/CAF. Se analizaron las tabletas del medicamento Saridon® siguiendo las específicas de la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 para la validación de la disolución del fármaco. Se realizaron los perfiles de disolución en el aparato 2 y 4 USP con la finalidad de observar y comparar la velocidad de disolución del fármaco en distintas condiciones.

Marco teórico.

Aspectos biofarmacéuticos

Para el desarrollo de nuevas formulaciones genéricas de medicamentos, se requiere la realización de estudios *in vitro* e *in vivo* que pongan en manifiesto que estos nuevos medicamentos genéricos sean capaces de tener la misma biodisponibilidad que el producto de referencia.

La disolución de un fármaco es prerrequisito para la absorción y respuesta clínica de la mayoría de los fármacos administrados por vía oral (*Amidon et al., 1995*).

Debido a la naturaleza crítica de la liberación, la disolución se considera una prueba importante para predecir el comportamiento del fármaco *in vivo*. Con base en esta consideración general se utilizan las pruebas de disolución *in vitro* para las formas de dosificación oral, evaluar la calidad de un producto medicinal lote a lote, guiar el desarrollo de nuevas formulaciones, asegurar la calidad y rendimiento adecuados del producto después de ciertos cambios tales como cambios en la formulación, proceso y sitio de fabricación y el aumento en escala del proceso de fabricación (*FDA, 1995*).

Se deberá considerar el conocimiento actual acerca de la solubilidad, permeabilidad, disolución y farmacocinética de un producto medicinal al definir las especificaciones de las pruebas de disolución para el proceso de aprobación del medicamento.

La velocidad de disolución es un parámetro que expresa la rapidez con la que un soluto se disuelve en un disolvente en condiciones determinadas de agitación y temperatura, entre otros factores. La velocidad de disolución está íntimamente relacionada con la solubilidad, pero responde a una noción completamente diferente: mientras que la solubilidad es un concepto estático, que se refiere a un estado de equilibrio termodinámico, la velocidad de disolución responde a un concepto dinámico del proceso: qué cantidad o concentración de fármaco se disuelve por unidad de tiempo (*FDA, 1995*).

Los estudios de disolución *in vitro* son de gran importancia ya que permiten establecer una cuantificación de fármaco disuelto en función del tiempo (perfiles de disolución) es decir evalúan la cinética de la disolución.

Sistema de Clasificación Biofarmacéutico

Con base en la solubilidad y permeabilidad de los fármacos, se recomienda el siguiente Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (BCS) en la literatura (*Amidon et al., 1995*). En la Tabla 1 se presentan las características principales de las cuatro clases de este sistema.

Tabla 1. Criterios del Sistema de clasificación biofarmacéutico.

Clase	Solubilidad	Permeabilidad
I	Alta	Alta
II	Baja	Alta
III	Alta	Baja
IV	Baja	Baja

Se puede utilizar esta clasificación como base para establecer las especificaciones de disolución in vitro y también puede proveer una base para predecir la probabilidad de lograr una correlación in vitro- in vivo (IVIVC) significativa.

Genéricos intercambiables

Los medicamentos genéricos intercambiables se caracterizan precisamente por ser sustituibles del medicamento de referencia, se sujetan a una denominación internacional y están incluidos en el cuadro básico de medicamentos del sector salud. Un tercero autorizado tiene que validar o certificar la calidad antes de ser incluido en el cuadro básico para llevar la denominación de genérico intercambiable. De esta manera se puede caracterizar al genérico intercambiable como el medicamento que contiene el mismo principio activo que tiene igual forma farmacéutica, concentración o potencia. Se aplica por la misma vía de administración, tiene iguales especificaciones farmacopeicas y perfiles de disolución o biodisponibilidad a las del medicamento innovador. Claramente es un producto idéntico en todas sus propiedades.

Condiciones para las pruebas de disolución

La prueba de disolución constituye quizás el método más importante para el desarrollo y evaluación de una forma farmacéutica sólida oral, por lo que la mayor parte de los equipos y técnicas que han sido utilizados en estudios de disolución están dirigidos a las formas sólidas.

Todas las variantes tanto en el equipo como en la técnica de disolución influyen en el proceso de mezcla que tiene lugar en cada método, lo cual se debe tomar en cuenta para establecer los métodos de disolución oficiales para cada medicamento (*Aulton, 2004*).

Equipos de disolución

Existe a la fecha una gran diversidad de equipos y de técnicas reportadas para el estudio de la disolución aparente de fármacos contenidos en diversas formas farmacéuticas, aunque la mayoría han sido diseñados originalmente para formas sólidas.

Dado que este amplio espectro de equipo y metodologías influyen de distinto modo en el perfil de disolución y, por consiguiente, en su posible correlación con

resultados de biodisponibilidad, se debe decidir cuáles de ellos serán establecidos como métodos de disolución oficiales (*Cárdenas et al., 1996*).

Aparatos

Los Aparatos de prueba de disolución utilizados más comúnmente son el Aparato 1 USP (canastillas/cestas giratorias) y el Aparato 2 USP (paletas). Los Aparatos de canastillas y paletas son sencillos, robustos, están bien normalizados y se utilizan en todo el mundo. Estos métodos son lo suficientemente flexibles como para permitir a realización de pruebas de disolución para una variedad de productos medicinales. Estos métodos de disolución están ampliamente descritos en la Farmacopea Estadounidense (USP).

Se pueden considerar otros métodos de disolución si los dos anteriores no cumplen con las características y procedimientos de disolución in vitro para un fármaco en particular. Entre ellos se encuentran el Aparato 3 USP (cilindro de doble acción) y el sistema de celda de flujo continuo Aparato 4 USP. Ambos descritos en la USP.

Debido a la diversidad de variables biológicas y de formulación, y la naturaleza evolutiva del conocimiento de esta área, en ocasiones es necesario realizar diversas modificaciones a las condiciones experimentales de disolución, para lograr obtener una correlación in vivo apropiada con los datos de liberación in vitro. Por lo general se pueden utilizar las metodologías y los aparatos de disolución descritos en la USP con muestreos manuales o procedimientos automatizados (*FDA, 1995*).

Medios de disolución.

En lo posible, las pruebas de disolución se deberán realizar bajo condiciones fisiológicas. Esto permitirá la interpretación de los datos de disolución en relación con el comportamiento in vivo del producto. Las condiciones de prueba deberán basarse en las características fisicoquímicas del principio activo y las condiciones ambientales a las cuales podría estar expuesta la forma de dosificación tras la administración oral.

Todas las pruebas de disolución deberán realizarse a una temperatura de $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, es necesario considerar que el aire disuelto influye en la disolución del fármaco, por lo que el medio de disolución deberá desgasificarse previamente (*Gennaro., 2003*).

Agitación

Por lo general se deberán mantener condiciones de agitación suave durante las pruebas de disolución para permitir un poder de discriminación máximo y para detectar productos con un pobre rendimiento in vivo.

Para el método de canastilla, la velocidad de agitación común es de 50-100 rpm. Para el método de paleta, es de 50-75 rpm (*Shah et al., 1992*).

En el caso del Aparato 4 USP, la velocidad de flujo del medio de disolución se encuentra entre los valores de 8-32 mL/min. La información sobre su aplicación en la evaluación de medicamentos es limitada.

En la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 8ª edición, se indican las condiciones para realizar el estudio de los perfiles de disolución de comprimidos de trimetoprima y sulfametoxazol. El método utiliza el Aparato 2 USP (paletas) a 75 rpm con 900 mL de HCl 0.1 N a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ como medio de disolución, con tiempos de muestreo de 15, 20, 30, 45 y 60 min y determinación espectrofotométrica con un barrido de 320 a 240 nm (Q=75% a 60 min).

Perfil de disolución y equivalencia In Vitro

La prueba de disolución de un solo punto ha sido utilizada para evaluar cambios luego de su aprobación, como un aumento del tamaño de lote cambios en el sitio de fabricación, cambios en los componentes o en la composición. Un cambio del producto también aplica a disminuir la dosis de un producto previamente aprobado.

En la presencia de cambios menores, la disolución de un solo punto puede ser adecuada para asegurar que no existen cambios en la calidad y en las características del producto. Para mayores cambios, la comparación de perfiles de disolución bajo condiciones idénticas para el producto antes y después del cambio es recomendable.

Los perfiles de disolución son considerados iguales en virtud de la totalidad de los perfiles y la similitud de cada punto muestreado en el tiempo de disolución. La comparación de los perfiles de disolución puede llevarse a cabo utilizando un modelo independiente (*Vecina. F., 2002*).

Bioequivalencia.

En 21 CFR 320.1 se define la bioequivalencia como "la ausencia de una diferencia significativa en la velocidad y la medida en que el ingrediente o la fracción activa de equivalentes farmacéuticos se hace disponible en el sitio de acción farmacológico cuando se administran en la misma dosis molar bajo condiciones similares en un estudio diseñado apropiadamente". El establecimiento de la biodisponibilidad se lleva a cabo para establecer las diferencias entre una forma farmacéutica sólida y la formulación en solución oral, suspensión oral o intravenosa. Por el contrario, por lo general la demostración de bioequivalencia es una prueba comparativa en la cual se mide la velocidad y cantidad absorbida de equivalentes farmacéuticos (misma dosis, misma forma farmacéutica).

Acetaminofén.

El ACE, también conocido como paracetamol, es un analgésico y antipirético eficaz para el control del dolor leve o moderado causado por afecciones articulares, otalgias, cefaleas, dolor odontogénico, neuralgias, procedimientos quirúrgicos menores etc. También es eficaz para el tratamiento de la fiebre, como la originada por infecciones virales, la fiebre posvacunación, etcétera.

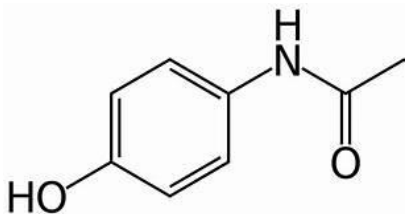


Figura 1. Estructura de acetaminofén

- Solubilidad: Una parte de ACE es soluble en 70 partes de agua a temperatura ambiente y soluble en 20 partes de agua a ebullición. Diferentes fuentes informan una solubilidad acuosa de 14,7 mg/mL a 20°C, 14,3 mg/mL a 28°C, y 23,7 mg/mL en 37°C (Kalantzi et al., 2006).
- log P: se determinó el valor de log de P usando un método basado en las contribuciones atómicas a lipofilia y mediante el programa ClogP (versión 3.0, BioByte Corp., Claremont, CA) dando los siguientes valores de 0.31 (log P), 0.9 (log P), y 0.89 (log P). Otros valores reportados son: 0.46 (octanol/agua) (19); 0.49 (octanol/agua).

El ACE se absorbe rápida y completamente en el tracto gastrointestinal, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas entre 15 minutos y 2 horas después de su administración oral. La biodisponibilidad del ACE es de 60 a 98%. Los alimentos reducen la concentración máxima del ACE en un 49%. Se distribuye de manera uniforme en los fluidos corporales (volumen de distribución de 1 a 2 L/kg) y 10-30% se encuentra unido a proteínas plasmáticas. Es extensamente metabolizado y su depuración corporal total es de 5 mL/min/kg.

Se excreta en la orina en las primeras 24 horas de 90 a 100% de la dosis como metabolitos conjugados sin acción farmacológica. Sólo de 1 a 4% de la dosis de ACE es eliminada de manera inalterada por la orina. Tiene una vida media de 2 a 4 horas.

El ACE presenta efecto analgésico o antipirético similar a los salicilatos; es particularmente útil en pacientes en quienes está contraindicado el uso de ácido acetilsalicílico (por ejemplo, enfermos con úlcera péptica, gastritis o bajo tratamiento con anticoagulantes orales).

Acetaminofen-Cafeína

La CAF, también denominada teína, guaranina o mateína, es un constituyente natural presente en más de 60 especies de plantas. Se encuentra en la dieta diaria contenida en bebidas como el café o el té, el chocolate y algunos refrescos.

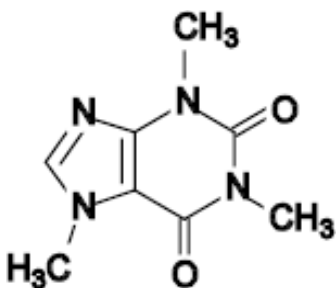


Figura 2. Estructura de cafeína

Se podría considerar la sustancia estimulante de mayor consumo y la más socialmente aceptada a nivel mundial. La CAF es un polvo inodoro, incoloro y amargo. Friedrich Ferdinand Runge la aisló del café en 1819 y del té en 1827, pero su estructura química no se describió hasta 1875 por E. Fischer. La CAF (1,3,7-trimetilxantina) y los otros alcaloides metilxantínicos, como la teobromina (3,7-dimetilxantina) y la teofilina (1,3-dimetilxantina), son derivados del grupo de las xantinas, que a su vez se

derivan de las purinas. Se relacionan farmacológicamente con los psicoestimulantes (*Pardo R. et al. 2007*).

Este alcaloide tiene un punto de fusión de 238°C y un pKa igual a 10.4, así como un valor de logP (octanol-agua) de -0.07.

La combinación de ACE/CAF es más efectiva en comparación con el ACE solo, en el alivio del dolor. La CAF incrementa la eficacia analgésica del ACE; con un inicio de acción más rápido. La CAF es un adyuvante analgésico efectivo, aproximadamente se requiere 40% más de la dosis del analgésico para alcanzar un alivio del dolor equivalente al que se obtiene con el mismo analgésico más CAF. La potencia relativa total estimada para los analgésicos combinados con CAF comparada con los analgésicos solos es de 1.41.

La CAF es un potente inhibidor competitivo de la fosfodiesterasa, enzima responsable de la inactivación del AMPc, mediador de varias funciones celulares como la relajación del músculo liso e inhibición de la liberación de histamina por los mastocitos. La CAF también incrementa la permeabilidad del calcio en el retículo sarcoplásmico y bloquea los receptores de adenosina. Debido a sus efectos estimulantes en el SNC produce sensación de bienestar en los pacientes como mejoría del estado de ánimo, menor somnolencia, menor fatiga y mayor rapidez y claridad de pensamiento, a las dosis de 50 a 200 mg. El ACE inhibe específicamente la ciclooxigenasa del sistema nervioso central, evitando así la síntesis de prostaglandinas a nivel central.

La CAF se absorbe completa y rápidamente tras su administración oral, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas (5 a 25 µg/ml) entre 30 y 90 minutos. No existe evidencia de metabolismo presistémico. La CAF se distribuye ampliamente en el organismo con un volumen de distribución aparente correspondiente a 0.55 L/kg y se une a las proteínas plasmáticas en aproximadamente 36%. El 80% de la CAF se metaboliza formando compuestos conjugados sin acción farmacológica y sólo el 4% se convierte en teofilina. Su vida media es de 4 a 5 horas. Se elimina por orina como metabolitos y alrededor de 1% inalterado. Dado que la CAF es metabolizada por el CYP1A2 su eliminación se incrementa en los fumadores y disminuye en pacientes a quienes se administra cimetidina, disulfiram y anticonceptivos orales.

OBJETIVOS.

General.

Analizar mezclas binarias de CAF con ACE y/o ácido acetil salicílico en medicamentos comerciales.

Específicos.

- Realizar pruebas preliminares de identificación y cuantificación de CAF, ACE y/o ácido acetil salicílico en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4.
- Realizar las pruebas farmacopeicas de valoración y uniformidad de dosis a los medicamentos en estudio.
- Determinar los perfiles de disolución de medicamentos que contengan la mezcla CAF/ACE o ácido acetil salicílico con apoyo de metodología espectroscópica o cromatográfica y el aparato farmacopeico de vasos.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Productos

Para desarrollar el método de cuantificación de CAF/ACE mediante espectrometría derivativa en comprimidos, se utilizaron los productos comerciales de la Tabla 2.

Tabla 2. Compuestos utilizados para la validación del método.

Producto	Laboratorio	Clave
Cafeína	Sigma-Aldrich	Estándar
Acetaminofén	Sigma-Aldrich	Estándar

Se realizaron estudios de disolución con dos medicamentos de CAF con ACE en comprimidos (500/50 mg) de libre venta al público. Los datos de cada uno se muestran en la Tabla 3. El medicamento Saridon se utilizó como referencia ya que así lo indica la secretaria de Salud por medio de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) para ser utilizada en estudios de bioequivalencia. El segundo medicamento es una formulación genérica. Se le asignaron las letras R y G, respectivamente.

Tabla 3. Información de los medicamentos comerciales utilizados.

Laboratorio	Producto	Codigo
Bayer de México S.A.	Saridon	R
Perrigo S.A.	Quimofeina	G

Material, reactivos y equipo

Material

- Agitador magnético
- Espátulas de acero inoxidable
- Jeringas de 5 ml
- Matraces volumétricos de 5, 10 ml
- Micropipeta de 0.1 a 1 ml
- Pipeta
- Pipetas Pasteur
- Probeta de 1L
- Vasos de precipitados de 5,10, 50, 100, 250, 500 y 1000 ml

Reactivos

- Ácido clorhídrico
- Agua destilada
- Metanol
- Hidróxido de sodio

- Fosfato monobásico de potasio, grado reactivo
- Fosfato dibásico de sodio, grado reactivo

Equipo

- Balanza analítica Mettler AE 163
- Balanza granataria Havard Trip Ohaus
- Disolutor USP Sotax Type CE-6 CH-4123
- Disolutor USP SotaxAT - 7 Smart con bomba de pistón Sotax CY7-50
- Espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer Lambda 2S

Condiciones espectrofotométricas

ACE/CAF se determinaron simultáneamente mediante un método derivado de UV propuesto. Se utilizó un espectrofotómetro UV/vis de doble haz con celdas de cuarzo de 1 cm. Las condiciones operativas para el análisis UV fueron el modo de primera derivada (1D) con una velocidad de exploración de 240 nm/min, un ancho de rendija de 2 nm y un intervalo de muestreo de 1 nm.

Curvas de calibración

Acetaminofén

Se pesaron 10 mg de ACE y se colocaron en un matraz volumétrico de 10 mL. Se le adicionaron 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4 y se llevó al sonicador durante 10 min para favorecer su disolución, posteriormente se aforó con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4.

De la solución anterior se tomaron alícuotas de 100, 150, 200, 250 y 300 μ L y se colocaron en matraces volumétricos de 10 mL. Las cinco soluciones se aforaron con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4 para obtener soluciones de 10, 15, 20, 25 y 30 μ g/mL. Se determinó el espectro de absorción en el intervalo de 200-350 nm con celda de cuarzo de 1 cm (272.76 nm, derivada 1).

Cafeína

Se pesaron 10 mg de CAF y se colocaron en un matraz volumétrico de 10 mL. Se le adicionaron 5 mL de metanol RA y se llevó al sonicador durante 10 min para favorecer su disolución, posteriormente se aforó con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4. De la solución anterior se tomó una alícuota de 1 mL y se colocó en un matraz volumétrico de 10 mL, posteriormente se aforó con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4. De la solución anterior se tomaron 250 μ L y se colocaron en un matraz volumétrico de 50 mL y 100, 200, 250 y 500 μ L y se colocaron en matraces volumétricos de 10 mL. Las cinco soluciones se aforaron con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4 para obtener soluciones de 0.5, 1, 2, 2.5 y 5 μ g/mL. Se determinó el espectro de absorción en el intervalo de 200-350 nm con celda de cuarzo de 1 cm (216.43 nm, derivada 1).

Linealidad

Se probó con la preparación de dos curvas de calibración estándar de cada fármaco. Todas las soluciones se analizaron de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente y se usaron datos medios para tratamientos matemáticos. Se calculó el análisis de regresión lineal y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de cada regresión. Se calcularon los intervalos de confianza del 95% (IC95%) para las intersecciones.

Precisión

Se verificó con el cálculo de coeficiente de variación (CV) en cada nivel de concentración. Se evaluaron tres mezclas sintéticas a las siguientes concentraciones 12, 18 y 27 ug/mL de acetaminofén y 1.5, 3, 4 ug/mL de cafeína. Las mezclas se analizaron de acuerdo con el método derivado UV propuesto. Se representaron gráficamente las concentraciones encontradas frente a las añadidas y se realizaron los análisis de regresión lineal, determinando los IC95% para pendientes e intersecciones.

Uniformidad de unidades de dosificación y pruebas de ensayo.

Ambas pruebas se realizaron a las formulaciones de Referencia y Genérico según los procedimientos de la USP.

Perfiles de disolución

Aparato 2 USP

Los perfiles de disolución de ACE y CAF se obtuvieron en el USP Aparato 2 (Sotax AT-7 Smart, Suiza) a 75 rpm utilizando 900 ml de tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 a $37,0 \pm 0,5$ °C como medio de disolución. Antes del uso, el medio de disolución se desgasificó al vacío y se transfirió a los recipientes de disolución. A los 10, 20, 30, 45 y 60 min se retiró un volumen de 3 ml y se filtró con filtros de nitrocelulosa de 0.45 µm (Millipore®). Las cantidades de ACE y CAF disueltas se determinaron con curvas de calibración estándar de cada fármaco.

Aparato USP 4

Los perfiles de disolución de ACE y CAF se obtuvieron en un aparato USP 4 (Sotax CE6, Sotax AG, Suiza) con celdas de 22,6 mm (i.d.). Se utilizó flujo laminar (generado con un lecho de 6 g de perlas de vidrio).

El medio de disolución desgasificado, tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 a $37,0 \pm 0,5$ °C, se bombeó a un caudal de 16 ml/min. Se utilizó un sistema abierto, sin reciclar el medio de disolución. A los 10, 20, 30, 45 y 60 min se retiró un volumen de 3 ml y se filtró con filtros de nitrocelulosa. Para cada ensayo, se prepararon curvas de calibración estándar.

Análisis de datos.

Los perfiles de disolución de ACE y CAF de las formulaciones de Referencia y Genérico se compararon mediante enfoques independientes y dependientes del modelo. Para las comparaciones independientes del modelo, se calculó el factor de

similitud f_2 , el tiempo medio de disolución (MDT) y la eficiencia de disolución (DE). El factor de similitud se calculó según la ecuación previamente publicada (Moore y Flanner, 1996). Se consideraron perfiles de disolución similares si $f_2 = 50$ a 100. Se compararon MDT y DE mediante una prueba t de Student y se consideraron diferencias significativas si $p < 0,05$. Para las comparaciones dependientes del modelo, los datos de disolución se ajustaron a la ecuación de Hipérbola y con los parámetros a y b se calcularon los valores $t_{50\%}$. Además, los datos de disolución de ACE y CAF se ajustaron a los modelos Weibull, logístico, Gompertz y Probit (Zhang et al., 2010). La ecuación matemática de cada modelo se muestra en la Tabla 4. El modelo con el coeficiente de determinación ajustado más alto (R^2 ajustado) y el Criterio de Información de Akaike (AIC) más bajo fue elegido el modelo de mejor ajuste (Yuksel et al., 2000). El análisis de datos se llevó a cabo utilizando el programa DDSolver complementario de Excel (Zhang et al., 2010).

Tabla 4. Modelos matemáticos utilizados para ajustar los datos de disolución de acetaminofen y cafeína.

Modelo	Ecuación
Hipérbola	$y = \frac{ax}{b + x}$
Weibull	$F = F_{max} \left[1 - e^{-\frac{(t - T_i)^B}{\alpha}} \right]$
Logístico	$F = F_{max} \cdot \frac{e^{\alpha + \beta \cdot \log(t)}}{1 + e^{\alpha + \beta \cdot \log(t)}}$
Gompertz	$F = F_{max} \cdot e^{-\alpha \cdot e^{-\beta \cdot \log(t)}}$
Probit	$1 = F_{max} \cdot \phi[\alpha + \beta \cdot \log(t)]$

Resultados

Método derivado UV

La adecuada identificación y cuantificación de ACE/CAF con el método derivativo UV propuesto se muestra en la Figura 3.

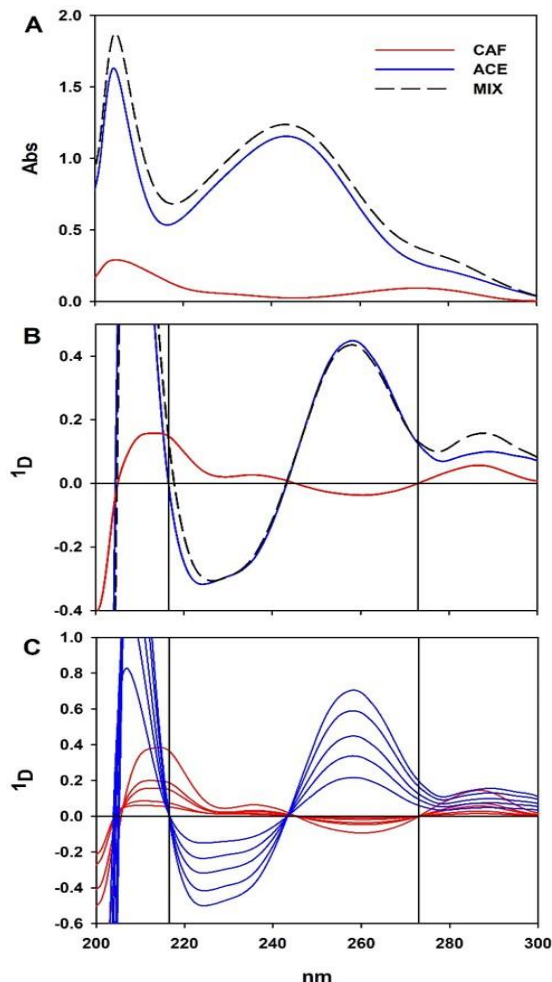


Figura 3: A) Espectros de orden cero de una solución de ACE (20 $\mu\text{g/ml}$), CAF (2 $\mu\text{g/ml}$) y una mezcla de ambos fármacos (MIX) a las mismas concentraciones. B) 1D de las mismas soluciones. C) 1D de curvas de calibración estándar. Las líneas verticales muestran los puntos de cruce por cero a 216,5 y 273 nm.

Como se muestra en la Figura 3A, ACE/CAF no se pueden cuantificar con datos de absorbancia directos porque el espectro de orden cero de la solución de mezcla muestra un espectro superpuesto. Los puntos de cruce cero para cuantificar ACE y CAF se identificaron a 273,0 y 216,5 nm, respectivamente. En estas longitudes de onda, todas las señales analíticas fueron proporcionales a las concentraciones de los fármacos.

Linealidad, precisión y exactitud

Las ecuaciones de regresión lineal para probar la linealidad y precisión de ACE y CAF se muestran en la Figura 4. Para probar la linealidad, todas las regresiones lineales fueron significativas ($p < 0,05$). El IC95% para intersecciones fue: -0,019 a 0,0018 para ACE y -0,0046 a 0,023 para CAF. Considerando ambos fármacos el CV osciló entre 0,39 y 2,53%. Para probar la precisión, el IC95% para intersecciones y pendientes fue: -3,82 a 3,70 y 0,82 a 1,20 para ACE y -0,52 a 0,38 y 0,87 a 1,17 para CAF. Teniendo en cuenta estos resultados, el método derivado UV propuesto fue una buena alternativa para determinar el rendimiento de disolución in vitro de ACE y CAF en formulaciones de combinación de dosis fija.

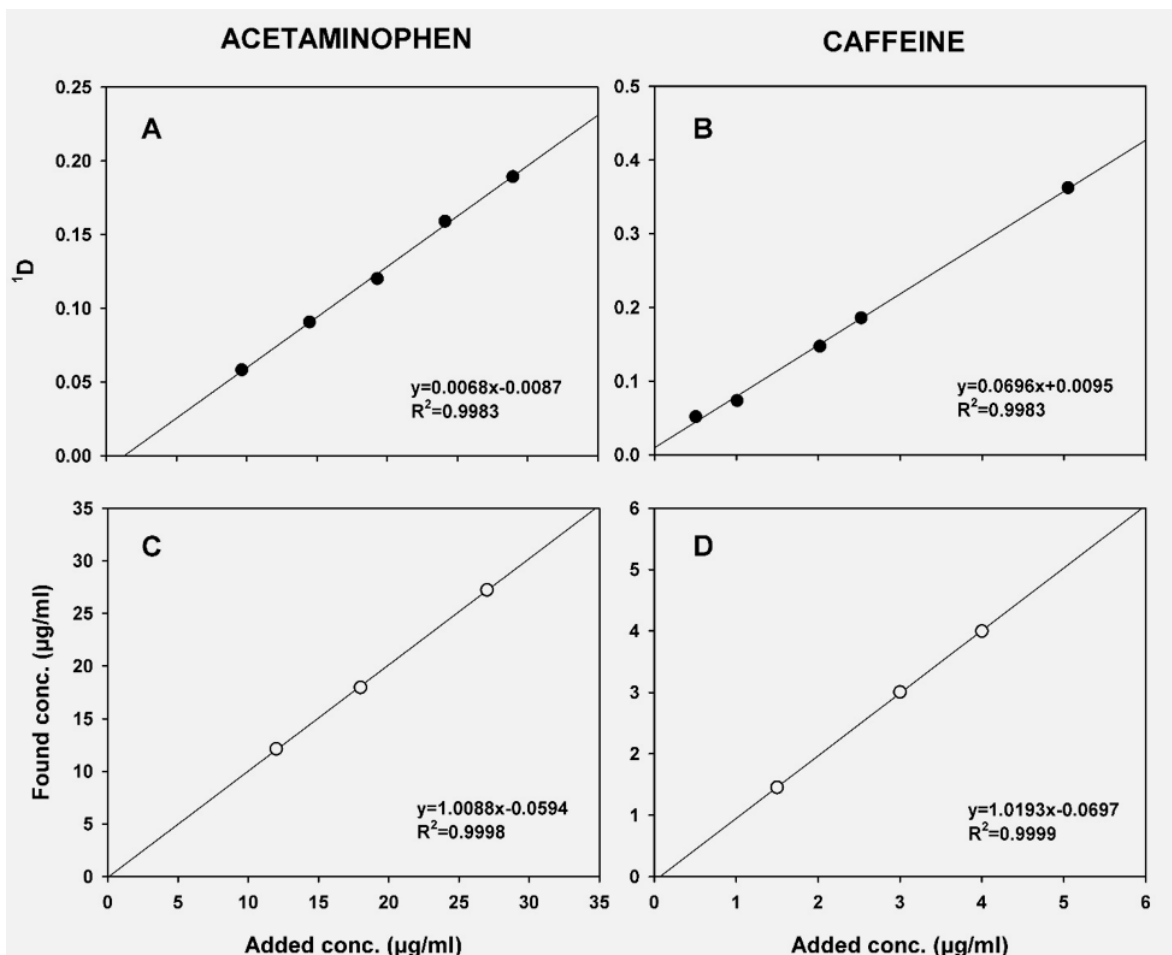


Figura 4: A y B) Curvas de calibración estándar (n=2). C y D) Mezclas sintéticas (n=3)

Uniformidad de dosis y prueba de ensayo

Ambas formulaciones comerciales cumplieron con la uniformidad de unidades de dosificación y pruebas de ensayo. El porcentaje de contenido de ACE/CAF osciló entre 85 y 115 % y la prueba de ensayo estuvo entre 90 y 110 %. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Resultados de las pruebas farmacopeicas de calidad.

Prueba de USP	Referencia		Genérico	
	ACE	CAF	ACE	CAF
Uniformidad de dosis (min/max%)	90.58-106.27	90.65-102.86	96.79-105.49	96.35-103.86
Ensayo (%)	101.48	102.66	101.95	105.20

h

Perfiles de disolución

Los perfiles de disolución de ACE/CAF obtenidos con los Aparatos USP 2 y 4 se muestran en la Figura 5.

Para comparar los perfiles de disolución (formulación de referencia frente a genérica) se calcularon parámetros independientes del modelo. El porcentaje de fármaco disuelto a los 60 min (Q60), MDT, DE y el factor de similitud f2 se muestran en la Tabla 6. Teniendo en cuenta el factor f2, solo los perfiles de disolución de ACE fueron similares ($f_2 > 50$). Algunas otras comparaciones coinciden con este resultado. Todas las comparaciones de CAF, en el Aparato 4 de la USP, mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$). Por otro lado, el rendimiento de disolución in vitro de ACE y CAF fue más lento con el aparato de células de flujo continuo que con el Aparato 2 de USP. Este tipo de comportamiento ha sido informado por algunos autores debido al entorno hidrodinámico que genera el Aparato 4 de USP. sobre la forma farmacéutica (Looney, 1997; Brown, 2005; Medina et al., 2014).

Tabla 6. Parámetros independientes del modelo de ACE y CAF

USP	Fármaco	Código	Q ₆₀ (%)	MDT (min)	DE (%)	F ₂
2	ACE	R	99.63±1.49	6.71±0.34	88.50±1.43	61.71
		G	97.13±0.79	7.65±0.37	84.70±0.46	
	CAF	R	106.66±1.42	6.50±0.35	95.06±1.08	41.69
		G	91.67±0.84	7.03±0.38	80.90±0.60	
4	ACE	R	102.31±2.75	10.33±0.70	84.47±1.80	57.80
		G	109.03±1.77	9.66±0.68	91.32±1.04	
	CAF	R	74.20±2.03	7.61±0.92	64.51±1.06	30.50
		G	109.63±1.46	11.81±0.33	88.00±0.89	

Para comparar los perfiles de disolución con un enfoque dependiente del modelo y después del ajuste de los datos de disolución al modelo Hipérbola, se calcularon los valores t50% de ACE y CAF. Los resultados se muestran en la Tabla 7. Con estos datos, se encontraron perfiles de disolución similares de ambos fármacos solo con el Aparato 4 de la USP ($p > 0,05$).

Tabla 7. Parámetros de hipérbola y datos de t50% derivados de este ajuste

USP	Fármaco	Código	a	b	R ²	T50%(min)
2	ACE	R	101.57	1.22	0.9990	1.15±0.18
		G	104.79	3.36	0.9961	2.98±0.33
	CAF	R	107.91	0.96	0.9987	0.80±0.17
		G	97.20	2.53	0.9966	2.59±0.37
4	ACE	R	114.98	6.29	0.9923	4.75±0.36
		G	122.13	5.77	0.9944	3.89±0.36
	CAF	R	78.37	2.75	0.9891	5.04±0.39
		G	122.60	7.07	0.9975	4.77±0.34

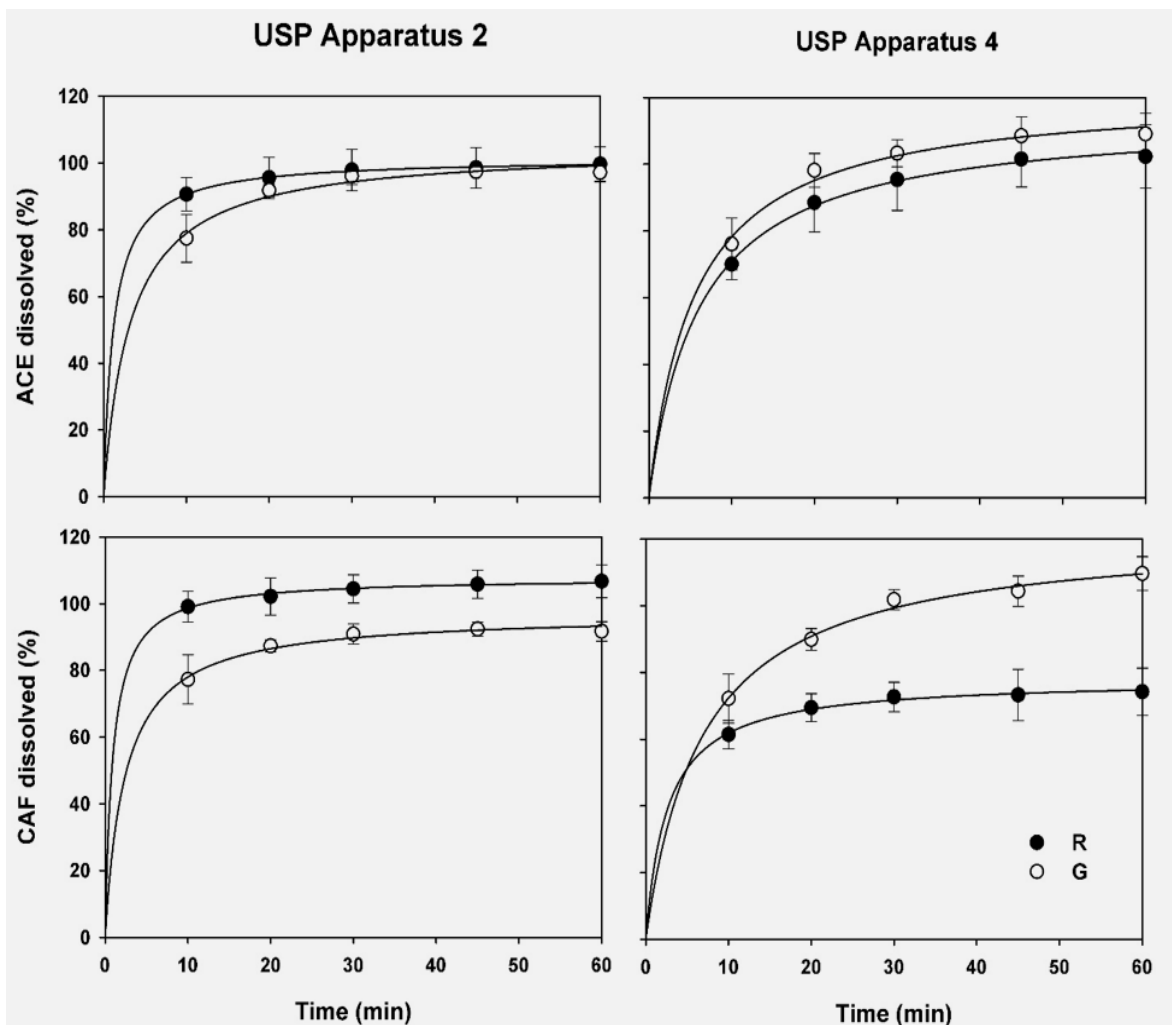


Figura 5: Perfiles de disolución de ACE/CAF de formulaciones de referencia (R) y genéricas (G).

Para un esquema de comparación dependiente del modelo completo, los datos de disolución de ACE/CAF se ajustaron a ecuaciones comunes. Se utilizaron las ecuaciones de Weibull, logística, Gompertz y Probit. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Como se puede ver en la Tabla 8 y considerando los criterios para elegir el modelo de mejor ajuste, solo el rendimiento de disolución de ACE en el Aparato USP 2 y CAF en el Aparato USP 4 fueron bien descritos por la misma ecuación (modelo Probit). Para comparar los perfiles de disolución de ACE/CAF, en las condiciones descritas anteriormente, se calcularon los valores de $t_{50\%}$ derivados del modelo Probit. Los resultados se muestran en la Tabla 9. Se encontraron diferencias significativas solo con los datos de ACE ($p < 0,05$).

Tabla 8. Criterios utilizados para elegir el modelo de mejor ajuste

USP	Fármaco	Código	Weibull	Logistic	Gompertz	Probit
$R^2_{ajustada}$						
2	ACE	R	0.9989	0.9992	0.9992	0.9992
		G	0.9984	0.9987	0.9987	0.9988
	CAF	R	0.9983	0.9990	0.9990	0.9990
		G	0.9971	0.9979	0.9979	0.9979
4	ACE	R	0.9903	0.9930	0.9929	0.9931
		G	0.9957	0.9967	0.9967	0.9967
	CAF	R	0.9811	0.9874	0.9874	0.9875
		G	0.9967	0.9976	0.9975	0.9977
AIC						
2	ACE	R	10.14	9.23	9.26	9.20
		G	14.36	14.75	14.99	13.85
	CAF	R	8.35	6.54	6.56	6.58
		G	15.43	15.55	15.67	15.25
4	ACE	R	19.19	20.81	21.04	20.47
		G	20.02	20.64	20.44	20.93
	CAF	R	24.57	22.72	22.82	22.62
		G	19.53	18.33	18.79	18.23

Tabla 9. Parámetros probit y datos t50% derivados de este ajuste

USP	Fármaco	Código	α	β	F_{max}	$T_{50\%}$ (min)
2	ACE	R	-0.44	1.22	215.41	1.30
		G	-1.73	2.44	104.12	4.53
4	CAF	R	-2.31	2.84	385.71	5.88
		G	-1.43	1.55	162.07	4.84

Discusión.

De acuerdo con datos obtenidos en el estudio se determinó que los perfiles de disolución de ACE/CAF entre la formulación de referencia y genérica no son similares ya que los fármacos no muestran equivalencia en su rendimiento de liberación in vitro.

Estudios de disolución en tabletas de ACE/CAF para la determinación de la calidad, algunos autores (*Alvarado, 2019*) evidenciaron que los lotes hechos en los laboratorios genéricos no son homogéneos ya que presentan variaciones entre ellos afectando de esta manera la calidad de los productos. La explicación a este comportamiento radica en el uso de materia prima de diferentes proveedores, malas técnicas de fabricación, el tipo de excipientes utilizados, así como la ausencia de un proceso estandarizado de producción.

En cuanto a la validación del método de cuantificación utilizado, los parámetros de linealidad, precisión y la exactitud arrojaron resultados aceptables, con los cuales se puede afirmar que la metodología (UV derivativo) utilizada permite el estudio del

rendimiento de disolución in vitro de ACE/CAF en formulaciones de combinación de dosis fija. Los resultados encontrados demuestran significativas entre los perfiles del medicamento de referencia y el genérico.

La prueba de disolución oficial para comprimidos de ACE/CAF describe el uso del Aparato 2 de la USP a 100 rpm y 900 ml de agua como medio de disolución (Q>75 % a los 60 min) (Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos, 2019). En este estudio de disolución comparativo, utilizamos el Aparato USP 2 a 75 rpm y el aparato de celda de flujo con un medio de disolución de pH controlado (tampón de fosfato 0,1 M pH 7,4) con el objetivo de tener una mejor perspectiva del proceso de disolución ya que citando la bibliografía pertinente (*Valerio et al., 2017*) el Aparato IV de USP posee un sistema de bombeo que proporciona una hidrodinámica de tipo laminar que se ajusta mejor a las condiciones requeridas para este producto y hace posible realizar una comparación estadística más acertada. Adicionalmente ha mostrado ser útil en el desarrollo de métodos más discriminativos que los aparatos tradicionales I y II USP, permitiendo obtener mejores perfiles de disolución, posibilitando la extracción continua del fármaco, asegurando mejores condiciones sink, y simulando la absorción a la circulación sistémica (*López et al., 2012*).

Utilizando las condiciones mencionadas en este trabajo, ACE/CAF alcanzaron más del 75 % del fármaco disuelto a los 60 min, excepto CAF en el Aparato 4 de la USP (74,20 %). Varios autores han informado que la velocidad media y de rotación adecuada de la paleta es importante para garantizar que la prueba de disolución sea útil y discriminatoria (*Shah et al., 1992*). Las diferencias observadas entre los equipos, pueden radicar en el hecho de que en el aparato II el tipo de flujo suele ser radial o axial, dependiendo la velocidad de agitación y la forma farmacéutica evaluada, ya que somete el sistema de entrega a mayores fuerzas de agitación, con respecto a la celda de flujo, que emplea flujos de tipo laminar, dependiendo de la velocidad de flujo empleada o la cantidad de perlas que oponen resistencia al flujo del medio en la celda, cuya presencia en la celda resulta en una reducción en la turbulencia del flujo (*Valerio et al., 2017*) esperando de esta manera que las velocidades máximas de fluido en el aparato IV en condiciones estándar sean considerablemente más bajas y más semejantes a una condición real que las que se encuentran en los aparatos de paleta o cesta.

Si bien los Aparatos 1 y 2 de la USP son actualmente los métodos más populares para estudiar el rendimiento de disolución in vitro de los fármacos, ambos métodos funcionan en condiciones de sumidero finito cerrado y no pueden imitar el entorno del tracto gastrointestinal (*Gao, 2009*). El aparato de celda de flujo continuo tiene la ventaja de generar un ambiente hidrodinámico similar al que se encuentra dentro del sistema digestivo (*Looney, 1997*). Es importante realizar un seguimiento posterior a la comercialización para garantizar la seguridad y eficacia de las formulaciones de combinación de dosis fija de ACE/CAF con todas las metodologías analíticas disponibles. ACE se considera un fármaco hepatotóxico y es fácilmente accesible en varias formulaciones como medicamento de venta libre (*Yoon et al.,*

2016). Existen muchos productos farmacéuticos combinados con CAF para potenciar las propiedades analgésicas de los AINES y la comparación de los perfiles de disolución de las formulaciones genéricas de AINE/CAF son escasas.

Conclusión

La metodología analítica utilizada para la cuantificación de ACE/CAF demostró ser exacta, lineal y precisa, así como útil para la determinación del rendimiento de disolución in vitro en ambos medicamentos sometidos a prueba.

Es importante realizar estudios de bioequivalencia en formulaciones ACE/CAF ya que se comprobó en esta investigación que el medicamento genérico no es similar al de referencia dictado por las instituciones regulatorias. Es vital mantener un monitoreo riguroso para la evaluación después de la salida al mercado de estos medicamentos ya que, al ser analgésicos de amplio uso, es fundamental asegurar a la población que las formulaciones que se encuentran a la venta sean de calidad.

Referencias

- Alvarado, N. B. E. Perfil de Disolución in vitro de Tabletas de Acetaminofén y Cafeína Comercializadas en Guatemala para la Determinación de su Calidad.
- Ameri, M. N. A., Nayuni, N., Kumar, K. A., Perrett, D., Tucker, A., Johnston, A. 2012. The differences between the branded and generic medicines using solid dosage forms: In-vitro dissolution testing. *Results in Pharma Sciences*, 2:1–8
- Amidon GL, Lenerhas H, Shah VP, Crison JR. (1995). A Theoretical Basis For a Biopharmaceutics Drug Classification: The Correlation of In Vitro drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability. *Pharm Res.* p 413-420.
- Anderson, N. H., Bauer, M., Bousac, N., Khan-Malek, R., Munden, P., Sardaro, M. 1998. An evaluation of fit factors and dissolution efficiency for the comparison of in vitro dissolution profiles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17(4- 5):811–822.
- Aulton ME. *Farmacología: La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*. segunda ed. España: Elsevier; 2004.
- Cárdenas Hilda y Cortés Alma (1996). Aspectos biofarmaceuticos de la evaluación de medicamentos, 1° edición, Edit. UAM-X, México, p. 46-48,69-73,89-91
- Cardot, J.-M., Beyssac, E., Alric, M. 2007. In Vitro– In Vivo Correlation: Importance of Dissolution in IVIVC. *Dissolution Technologies*, 14(1):15–19.
- D'Arcy, D. M., Liu, B., Bradley, G., Healy, A. M., Corrigan, O. I. 2010. Hydrodynamic and Species Transfer Simulations in the USP 4 Dissolution Apparatus: Considerations for Dissolution in a Low Velocity Pulsing Flow. *Pharmaceutical Research*, 27(2):246–258.
- Dinç, E. 1999. A comparative study of the ratio spectra derivative spectrophotometry, Vierordt's method and high-performance liquid

chromatography applied to the simultaneous analysis of caffeine and paracetamol in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 21(4):723–730.

- FDA, 1995, Center for Drug Evaluation and Research, Guidance for Industry: Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. Scale-up and Post-Approval Changes: Chemistry, Manufacturing and Controls, In Vitro Dissolution Testing, and In Vivo Bioequivalence Documentation [Guía para la industria: formas de dosificación oral sólidas de liberación inmediata. Cambios de aumento en escala y posteriores a la aprobación: química, fabricación y controles, pruebas de disolución in vitro y documentación de bioequivalencia in vivo] [SUPAC-IR], Noviembre de 1995.
- Franek, F., Holm, P., Larsen, F., Steffansen, B. 2014. Interaction between fed gastric media (Ensure Plus®) and different hypromellose based caffeine controlled release tablets: Comparison and mechanistic study of caffeine release in fed and fasted media versus water using the USP dissolution apparatus 3. *International Journal of Pharmaceutics*, 461(1-2):419–426.
- Kalantzi L, Reppas C, Dressman JB, Amidon GL, Junginger HE, Midha KK, et. al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Acetaminophen (paracetamol). *J Pharmaceut Sci*. 2006; 95 (1): 4-14
- Liu, X. Z., Liu, S. S., Wu, J. F., Fang, Z. L. 1999. Simultaneous monitoring of aspirin, phenacetin and caffeine in compound aspirin tablets using a sequential injection drug-dissolution testing system with partial least squares calibration. *Analytica Chimica Acta*, 392(2-3):273–281.
- Lokhandwala, H., Deshpande, A., Deshpande, S. 2013. Kinetic modeling and dissolution profiles comparison: an overview. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(1):728–737.
- Looney, T. J. 1997. USP Apparatus 4 - Applying the Technology. *Dissolution Technologies*, 4(2):16–18.
- López, J. R., Peña, M. H., Arroyo, A. R., & Ramírez, A. M. (2012). Disolución comparativa de indometina en cápsulas utilizando los Aparatos 1 y 4 USP. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 72 - 80.
- Moore, J. W., Flanner, H. H. 1996. Mathematical comparison of dissolution profiles. *Pharmaceutical technology*, 20(6):64–74.
- Paracetamol. [Consultado: 2022 Feb. 11] Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Paracetamol.htm
- Pardo R, Álvarez Y, Barral D, Farré M. Cafeína: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso. *Adicciones*. 2007; 19(3): 225-238.
- Podczek, F. 1993. Comparison of in vitro dissolution profiles by calculating mean dissolution time (MDT) or mean residence time (MRT). *International Journal of Pharmaceutics*, 97(1-3):93–100.
- R. Gennaro Alfonso. (2003) Remington Farmacia, 20° edición, Tomo 2. Editorial Médica Panamericana. Argentina.p. 1690-1691.

- Shah, V.P., et al., (1989). In Vitro Dissolution Profile of Water Insoluble Drug Dosage Forms in the Presence of Surfactants, *Pharmaceutical Research*, 6; p. 612-618.
- Szumilo, M., Belniak, P., Kasperek-Nowakiewicz, R., Holody, E., Poleszak, E. 2019. Comparative dissolution studies on granules with acetaminophen and caffeine using the basket and paddle methods with simultaneous spectrophotometric determination of active substances. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 32(4):219–224.
- Tan, S., Ebrahimi, A., Langrish, T. 2019. Controlled release of caffeine from tablets of spray-dried casein gels. *Food Hydrocolloids*, 88:13–20.
- Vecina, F. (2002). Guidance For Disolution Testing of oral Inmerelase Dosage Forms. *Official Journal, Volumen II*, P1-25.
- Valerio, T., Persoons, T., Grove, G., Healy, A., & D'Arcy, D. (2017). Characterization and Simulation of Hydrodynamics in the Paddle, Basket and Flow-Through Dissolution Testing Apparatuses- A Review . *Dissolution Technologies*, 24-25.
- Williams, H. D., Barrett, D. A., Ward, R., Hardy, J., Melia, C. D. 2010. A liquid chromatography method for quantifying caffeine dissolution from pharmaceutical formulations into colloidal, fat-rich media. *Journal of Chromatography B*, 878(21):1739–1745.
- Yoon, E., Babar, A., Choudhary, M., Kutner, M., Pysopoulos, N. 2016. Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: a Comprehensive Update. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 4(2):131– 142.
- Yuksel, N., et al. 2000. Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and -independent methods. *International Journal of Pharmaceutics*, 209(1-2):57–67.
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., Xie, S. 2010. DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *The AAPS Journal*, 12(3):263–271.

Vo. Bo. de los asesores respecto a los contenidos académicos.



M. en C. José Raúl Medina López

No. Económico: 23981



M. en C. Marcela Hurtado y de la Peña

No. Económico: 15677