

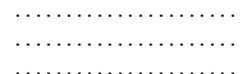


UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
Facultad de Ciencias Exactas  
Departamento de Ciencias Biológicas – 2011

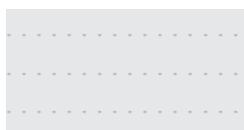


# La intercambiabilidad de medicamentos

Consideraciones biofarmacéuticas  
y terapéuticas



Trabajo de Tesis Doctoral  
Lic. Farm. María Esperanza Ruiz



**Director:**  
Dra. María Guillermina Volonté  
**Co-Directores:**  
Dr. Pietro Fagiolino – Dra. Perla M. de Buschiazzo



***A mamá***

*Porque sos mi apoyo,  
mi guía, mi ejemplo.  
Porque te debo tanto,  
porque te quiero tanto,  
y porque nada pudo ser mejor.*

***A Tati***

*Por lo recorrido juntos,  
y por lo que queda por recorrer.  
Porque te quiero, pero sobre todo,  
porque no quiero ser sin vos.*

***A Santiago***

*Por darle sentido a todo.  
Por fijar el centro de coordenadas.  
Porque ya nada es relativo...  
Porque sos.*



## Agradecimientos

A mi jefa y directora, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo. Por haberme convocado y por haber creído en mí en aquel momento (y por seguir haciéndolo). Gracias Kitty por haberme apoyado y ayudado siempre. Muchas gracias por confiar en mí.

A mis codirectores. A Perla, por haber apuntalado este proyecto con sus consejos y su experiencia. Y a Pietro, porque aunque lejos, siempre conté con su análisis a conciencia, sus sugerencias, correcciones y comentarios. Muchas gracias a ambos por el apoyo.

A mis compañeros de cátedra y de laboratorio: Pablo, Patricia, Susana, Claudia, Analía, Anabella, Yas, Sofía y Kitty (y Lore y Alicia). Son el mejor grupo de compañeros que podría pedir, y cada uno a su manera hace que disfrute enormemente mi trabajo. A Paula, por compartir la mesada e incontables mates. A Pablo y Picho, por interesarse siempre en mi trabajo y estar dispuestos a ayudarme.

A Pietro, Marta, Silvana, Cecilia y toda la gente increíble que conocí en Uruguay. En mis dos viajes a Montevideo aprendí muchísimo. No sólo descubrí un grupo excelente en su trabajo, sino personas capaces de brindar la calidez que se necesita para sentirse a gusto lejos de casa.

¡A los voluntarios! No los voy a enumerar porque son muchos (y el consentimiento informado les prometía anonimato), pero ¡gracias por tantas escupidas! Este trabajo no hubiera podido ser sin ustedes... Y con ellos a Tonga, por salvarme la compu tantas veces, y a Chiclana, por tantos y diversos salvatajes (las luces, la bomba de vacío...).

A mis amigos, Isabel, Leo, Magdalena, Victoria, Paul, Soledad, Emilia, Soledad, Martín, Julián, Marita, Irene, Leslie, Tonga, Agustina, Paula, Alan, por hacer que los años que duró este proceso (los anteriores, y seguramente los que sigan) hayan sido maravillosos. Adoro la vida que tengo, y como toda suma de factores es así por cada uno de ustedes.

A Eugenia. Porque si les parece linda esta tesis, es definitivamente gracias a ella. Mil gracias por ponerle diseño a mis ideas, tan rápido (¡y tan lindo!). Y sobre todo por hacerlo en los tiempos libres de una época tan particular, donde imagino que preferirías estar haciendo casi cualquier otra cosa...

A Alan, por sus incontables ayudas a mi trabajo. Mi amigo es una persona extraordinaria, muy buen amigo, excelente compañero e increíblemente bueno en lo que hace. Y más aún: con ganas de que a uno también le vaya bien.

A Tati. ¡Por aguantarme! Y no me refiero sólo a “tolerarme” (aunque eso también), sino al verdadero aguante que se le puede hacer a una persona: quererla, escucharla, ayudarla, aconsejarla, incentivarla y, no menos importante, ¡alimentarla! Gracias por todas esas cosas que apuntalan la familia que somos, por Santiago, porque te quiero tanto...

A mamá. ¿Cómo agradecer 32 años de felicidad? Mamá cuestiona ese concepto. Para ella la felicidad es un momento y no un estado, pero yo no estoy de acuerdo. Precisamente ella hizo que en mi caso sea un continuo... porque sabe, y siempre supo, cómo hacerme quien soy. Cuando hizo falta (y siempre en el momento exacto) supo empujarme, alentarme, limitarme, apoyarme, y lo mejor de todo: ¡todavía sabe hacerlo! Te adoro vieja, y ojalá llegue a ser para Santiago algo de lo que vos sos para mí.

A mi hermana. Porque este trabajo es lo que se ve gracias a ella. Mi hermana es de esas personas que tienen talento para el trabajo que eligieron, lo que hace que no sólo lo hagan bien, sino que brillen. Así que gracias por leerlo, corregirlo, mejorarlo. Y por el mayor sacrificio de todos: haber trabajado a mis tiempos, con mis consignas, a mi manera.

María Esperanza Ruiz

## Indice

Presentación	11
<b>Capítulo 1 - Introducción</b>	<b>15</b>
El intercambio de medicamentos en el tratamiento de la epilepsia	20
La prueba de bioequivalencia	21
El principio de transitividad	35
Datos <i>in vitro</i> : estudios de disolución	36
Sistema de clasificación biofarmacéutica y las bioexenciones	40
El escenario en nuestro país	41
Hipótesis y objetivos del trabajo	43
<b>Capítulo 2 - Control de calidad de medicamentos</b>	<b>45</b>
Ensayos realizados	49
2.1 Carbamazepina (CBZ)	49
Valoración y uniformidad de unidades de dosificación	
Test y perfiles de disolución	
Resultados y discusión	
2.2 Oxcarbazepina (OxCBZ)	56
Valoración y uniformidad de unidades de dosificación	
Test y perfiles de disolución	
Resultados y discusión	
2.3 Fenitoína (PHT)	62
Valoración y uniformidad de unidades de dosificación	
Test y perfiles de disolución	
Resultados y discusión	
Conclusiones parciales	67
<b>Capítulo 3 - Bioequivalencia media vs. individual: el caso de Fenitoína</b>	<b>69</b>
Ensayos realizados	76
3.1 Desarrollo y validación del método analítico	76
Método para la determinación de PHT en saliva de voluntarios sanos	
3.2 Estudio de BDR (BEI/BEM) de cápsulas de PHT 100 mg en voluntarios sanos	79
Descripción y objetivos	
Resultados y discusión	
3.3 Simulaciones de estudios de BEM vs. BEI	89
Descripción y objetivos	
Resultados y discusión	
Discusión y conclusiones parciales	99

<b>Capítulo 4 - Bioequivalencia vs. intercambiabilidad: el caso de Carbamazepina</b>	<b>103</b>
Ensayos realizados	109
4.1 Desarrollo y validación de los métodos analíticos	109
A. Método para la determinación de CBZ y E-CBZ en plasma y saliva de pacientes	
B. Método para la determinación de CBZ y E-CBZ en saliva de voluntarios sanos	
4.2 Monitorización de niveles plasmáticos y salivales de CBZ en pacientes	117
Descripción y objetivos	
Resultados y discusión	
4.3 Estudio de BDR de comprimidos de CBZ 200 mg en voluntarios sanos	124
Descripción y objetivos	
Resultados y discusión	
Discusión y conclusiones parciales	130
<b>Capítulo 5 – Principio de Transitividad. Métodos para comparar perfiles de disolución</b>	<b>137</b>
Ensayos realizados	140
5.1 Análisis del principio de transitividad mediante perfiles de disolución <i>in vitro</i>	140
Descripción y objetivos	
Materiales y métodos	
Resultados y discusión	
5.2 Análisis de los métodos utilizados para comparar perfiles de disolución	151
Descripción y objetivos	
Materiales y métodos	
Resultados y discusión	
Discusión y conclusiones parciales	169
<b>Capítulo 6 - El uso de saliva en estudios de biodisponibilidad relativa</b>	<b>171</b>
Análisis de datos	186
6.1 Carbamazepina (CBZ)	186
6.2 Fenitoína (PHT)	194
Conclusiones parciales	196
<b>Capítulo 7 - Conclusiones</b>	<b>199</b>
<b>Acrónimos</b>	<b>205</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>209</b>
<b>Anexos</b>	<b>229</b>
I. Equipamiento	
II. Producción científica	
III. Documentación	

# ====■ Presentación





**A**l comienzo del libro *Biofarmacia y Farmacocinética* (Doménech Berrozpe et al., 1997), utilizado por nuestros alumnos para el estudio de dichas disciplinas, se puede leer que “un medicamento tecnológicamente perfecto no garantiza el aprovechamiento del fármaco que contiene por parte del organismo al que se administra”. Si se intenta reformular esta frase en función de las disciplinas involucradas, se podría decir que la tecnología farmacéutica no alcanza por sí sola para garantizar los resultados que la farmacología clínica (terapéutica) se propone. Son necesarios más eslabones en la cadena entre el principio activo y el efecto terapéutico: la biofarmacia y la farmacocinética.

La farmacocinética, décadas mayor que la biofarmacia, se encarga del estudio y caracterización de la evolución temporal de los fármacos y de sus metabolitos en el organismo, es decir, de los procesos físico-químicos que sufre el fármaco por acción del entorno biológico, mediante el análisis cinético de las curvas concentración/tiempo obtenidas a partir de muestras de fluidos biológicos. Secuencialmente, estos procesos se dividen en: absorción, distribución, metabolización y excreción. Se trata de una disciplina fundamentalmente teórica, ya que a excepción del proceso de absorción, los demás objetos de su estudio (que se pueden englobar como procesos de disposición del principio activo) dependen exclusivamente de cada fármaco, y por tanto son susceptibles de análisis pero no de cambios. Ya que si bien los resultados de dicho análisis son capaces de generar ideas para la optimización de la farmacocinética de un principio activo, esto siempre se logrará mediante algún tipo de modificación química del mismo.

Surge entonces la biofarmacia, a partir de la comprensión de que las diferencias obtenidas entre distintas preparaciones con igual cantidad de un mismo fármaco se debían principalmente a los procesos liberación y/o absorción, como la ciencia para estudiar dichos procesos y, ahora sí, encontrar el modo de optimizar los sistemas fármaco-forma farmacéutica-sustrato biológico. Y es precisamente allí donde se enmarca el presente trabajo de tesis.

Los objetivos, descriptos en el Capítulo 1, se pueden resumir en uno solo: estudiar los distintos aspectos involucrados durante los intercambios de medicamentos, a fin de poder garantizar algún día dicha intercambiabilidad desde una base ética y científica. Guiados por este objetivo, nos propusimos trabajar con pacientes medicados con fármacos de estrecho margen terapéutico, realizándoles monitoreos una vez alcanzado el estado estacionario con diferentes productos (marcas comerciales) del mismo fármaco, a fin de poder evaluar comparativamente su desempeño (esta metodología de trabajo se detalla en el Capítulo 4). Sin embargo, al comenzar a trabajar con pacientes medicados con la droga antiepiléptica Carbamazepina (CBZ), surgieron dos inconvenientes.

En primer lugar, para que los resultados del estudio en pacientes fueran válidos debía cumplirse como prerrequisito que los medicamentos ensayados, disponibles para su adquisición en el mercado farmacéutico argentino, fueran bioequivalentes, tal como lo asegura la autoridad sanitaria argentina. No obstante, y sin ahondar en detalles de los posibles motivos, se puso de manifiesto que tal vez dichos medicamentos no fueran realmente bioequivalentes. En segundo lugar apareció una complicación práctica: trabajar con pacientes (enrolarlos en el estudio, que asistan a los monitoreos, que respeten el esquema pautado para la administración de los medicamentos) era una tarea que evolucionaba con tiempos propios, independientemente de la voluntad de quienes realizaban las distintas etapas del estudio y, lo más importante, incompatibles con un trabajo de tesis.

Por todo lo anterior, dicho ensayo se suspendió cuando recién se había completado una primera etapa con un reducido número de pacientes (los resultados obtenidos se presentan al comienzo del Capítulo 4) y se decidió analizar las especialidades medicinales en voluntarios sanos, realizando un clásico estudio de biodisponibilidad relativa (BDR), pero utilizando a la saliva como fluido biológico monitoreado, en vez de sangre venosa, como suele hacerse. Los resultados obtenidos, además de mostrar que efectivamente los productos no eran bioequivalentes, también permitieron extraer otras interesantes conclusiones, detalladas en los Capítulos 4 y 6.

Cuando llegó el turno de la segunda droga propuesta inicialmente y también antiepiléptica Fenitoína (PHT) la decisión fue la misma: trabajar en voluntarios sanos y no en pacientes. Mientras tanto, los demás estudios planteados en el plan original (desarrollo y validación de técnicas analíticas, ensayos de valoración y uniformidad de unidades de dosificación, comparación de perfiles de disolución, simulaciones computarizadas de estudios de bioequivalencia) fueron llevados a cabo sin inconvenientes, tanto para las dos drogas mencionadas como para una tercera, Oxcarbazepina (Ox-CBZ). En este caso en particular se realizaron solamente los estudios *in vitro*, ya que al tratarse de una droga altamente permeable y poco soluble estos permitieron efectuar interesantes predicciones acerca de su comportamiento *in vivo* (al igual que en el caso de CBZ y PHT, los productos de OxCBZ presentes en el mercado fueron declarado BE por ANMAT).

En resumen, trabajando siempre con conceptos y metodologías pertenecientes al área de la biofarmacia, se llegaron a establecer conclusiones aplicables a la terapéutica con medicamentos. Como cada uno de esos conceptos (BD/BE, ensayos de disolución *in vitro*, sistema de clasificación biofarmacéutica -BCS- y bioexenciones, terapéutica de pacientes, fluidos biológicos, etc.) son muy amplios y podrían involucrar un trabajo de tesis en sí mismos, se ha intentado trabajar siempre con una profundidad de análisis adecuada y a la altura del tipo de trabajo y conclusiones que se quisieron presentar, pero recordando siempre que estos conceptos/metodologías fueron las herramientas empleadas para lograr los objetivos propuestos, y no los objetivos en sí mismos.

De este modo fue como se construyó el trabajo que se presenta a continuación, y que de esa manera quedó estructurado con dos ejes principales:

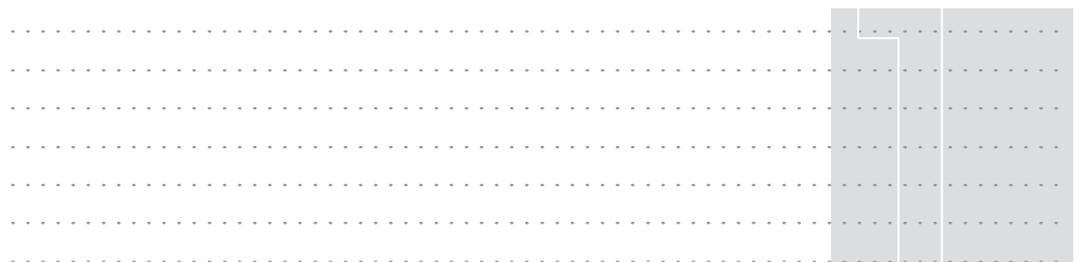
- la intercambiabilidad de medicamentos;
- el uso de saliva como fluido biológico de análisis en estudios de BDR.

---

---

# ■ Capítulo 1

## Introducción





Un medicamento similar es aquel que contiene el mismo principio activo que el producto original o innovador, en la misma dosis y que está destinado a la misma ruta de administración; un producto innovador, líder o de marca es aquel que se ha autorizado y comercializado en base a un dossier completo que incluye datos químicos, biológicos, farmacéuticos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos, tanto de eficacia como de seguridad. Para los estudios comparativos, éste debería ser el producto de referencia (García & Gandia, 2001).

La aparición de productos genéricos en el mercado, que se produce como una estrategia para aumentar la accesibilidad de la población al medicamento, disminuye los costos asociados a la farmacoterapia, generando un efecto que beneficia especialmente a los sectores sociales de bajo poder adquisitivo. Para el año 2000, más del 90% del mercado farmacéutico mundial se encontraba concentrado en sólo ocho países desarrollados (ver Tabla 1-1) (WHO, 2004; Collazo Herrera et al., 2007). Para 2004, aproximadamente un tercio de la población mundial carecía de acceso a tratamientos médicos y medicamentos esenciales (WHO, 2004).

La consolidación del mercado de las formulaciones genéricas (FG) ha sido una de las políticas más efectivas a la hora de regular el precio de los medicamentos, superando al control de precios por parte del Estado: el precio de un genérico varía entre el 3 y el 8% del precio del innovador, lo que implica un ahorro considerable tanto para los pacientes como para los sistemas de salud y los gobiernos (US Congressional Budget Office, 1998; Kees de Joncheere et al., 2003; FDA, 2004 y 2010). El ahorro potencial derivado de la sustitución por FG fue estimado, sólo considerando a los afiliados a Medicaid,<sup>1</sup> en \$229 millones de dólares al año (Fischer & Avorn, 2003). Más recientemente, Haas y colaboradores concluyeron que la sustitución por FG, siempre que sea posible, produce un ahorro no menor al 10% (en promedio) respecto al producto de marca (Haas et al., 2005).

La explicación del menor costo de esta clase de productos es que la inversión económica realizada por el laboratorio farmacéutico para su desarrollo y posterior comercialización es menor que en el caso de los medicamentos originales: no es necesario demostrar la eficacia ni la relación riesgo/beneficio del producto, descubrir la pauta terapéutica adecuada o los criterios de selección de los pacientes susceptibles de beneficiarse con el tratamiento (Zapater & Horga, 1999). Cabe aclarar que el precio de los medicamentos no disminuye únicamente por la menor inversión necesaria para su desarrollo. El precio baja, principalmente, porque surge la competencia cuando finaliza

<sup>1</sup> Programa nacional de los EE.UU. que brinda cobertura de salud a grupos de bajos recursos económicos.

el monopolio del producto patentado. Si se exigieran los mismos estudios para las FG que para el líder posiblemente el precio también bajaría (tal vez menos, pero bajaría), ya que el precio del producto líder está determinado por numerosos factores, no solo por el costo en tiempo y dinero de sus años de desarrollo (Giarcovich, 2001).

A los medicamentos no-innovadores no se les exige que repitan la misma batería de estudios que los innovadores, simplemente porque no es necesario, además de que éticamente no sería correcto repetir ensayos clínicos que fueran estrictamente necesarios (World Medical Association, 2004). Lo que sí es necesario, sin embargo, es garantizar la seguridad y la eficacia de dichos productos antes de permitir su comercialización.

■ **Tabla 1-1.** Distribución del gasto global en medicamentos durante el año 2000 (se presentan los 10 países con mayores valores), extraído de Collazo-Herrera et al., 2007

<i>País</i>	<i>Gasto (billones US \$)</i>	<i>Porcentaje del gasto global</i>
USA	149,5	52,9
Japón	51,5	18,2
Francia	16,7	5,9
Alemania	16,2	5,7
UK	11,1	3,9
Italia	10,9	3,9
España	7,1	2,5
Canadá	6,2	2,2
Brasil	5,2	1,8
Méjico	4,9	1,7

El aumento de la oferta de productos disponibles en el mercado de medicamentos provoca, entonces, que en todos los lugares autorizados para la dispensación de medicamentos sea una práctica común el intercambio entre productos conteniendo el mismo principio activo en la misma dosis, es decir, de un producto similar y el innovador, o de dos productos similares entre sí. Este intercambio se denomina “Intercambiabilidad de Medicamentos” si se produce durante un tratamiento, o “Recetabilidad de Medicamentos” si se produce al inicio de un tratamiento terapéutico con un determinado fármaco.

La intercambiabilidad ha generado gran controversia, principalmente debido a que para garantizar completamente el cambio entre medicamentos durante la práctica clínica se debería demostrar que éstos son **equivalentes terapéuticos** (es decir, productos que luego de su administración en la misma dosis molar no muestran diferencias significativas en sus efectos terapéuticos, con respecto a eficacia y seguridad), pero eso no es posible, principalmente por sus implicancias éticas y por tratarse de estudios muy onerosos. La consecuencia es que la equivalencia terapéutica, en vez de ser demostrada, es inferida de una prueba donde se comparan las concentraciones que rinden dos medicamentos en el organismo, la **bioequivalencia (BE)**.

En la actualidad, los estudios de biodisponibilidad relativa (BDR) *in vivo* o bioequivalencia constituyen la metodología aceptada por la mayoría de las agencias regulatorias de medicamentos para autorizar la comercialización de FG. Dichos estudios consisten en demostrar que la curva temporal de niveles plasmáticos del principio activo contenido en la FG es equivalente a la curva temporal obtenida con el medicamento de referencia. Es decir, si se produce la “equivalencia farmacocinética” se asume que la misma equivalencia existirá en el plano farmacodinámico y –lo más importante– en la eficacia terapéutica (Zapater & Horga, 1999).

El hecho de no poder aplicar las conclusiones de los estudios clásicos de BE a todos y cada uno de los individuos implica la necesidad de tomar ciertas precauciones al intentar sustituir un medicamento por una formulación bioequivalente, a pesar de ser ésta una práctica avalada en nuestro país por la Ley 25.649, de prescripción por nombre genérico o denominación común internacional (DCI). Cada vez son más los casos comunicados en la literatura médica de pacientes tratados con productos que, a pesar de haber sido declarados BE, presentaron problemas de falta de eficacia o toxicidad. Al administrar un fármaco, se desarrolla un sistema individuo-medicamento variable, no solamente entre los distintos sujetos, sino incluso para un mismo individuo, debido a factores dependientes tanto del medicamento (variabilidad intra producto) como del sujeto (variabilidad intra individual). Por lo tanto, en varios individuos de la población los medicamentos test (T) y referencia (R) podrían ser bioinequivalentes, y por lo tanto no intercambiables.

La relevancia de este planteo es aún mayor cuando el producto en cuestión contiene un fármaco de estrecho margen terapéutico (FEMT), como es el caso de algunos antiepilépticos de amplio uso [Carbamazepina (CBZ), Fenitoína (PHT), Ácido Valproico (VPA), Oxcarbazepina (OxCBZ), Lamotrigina (LTG)]. Tradicionalmente, la Food and Drug Administration (FDA) ha definido un FEMT como aquel que tiene menos de una diferencia de dos unidades, tanto en dosis letal y efectiva como en concentración mínima tóxica y efectiva, y que requiere por lo tanto de una dosificación cuidadosa y un monitoreo periódico del paciente. Investigadores biofarmacéuticos definen un FEMT como aquel en el cual un cambio del 20% o menos en la dosis produce alteraciones terapéuticas importantes y clínicamente indeseables.

Las características comunes de los FEMT incluyen:

- farmacocinética no lineal en concentraciones de rango terapéutico;
- variabilidad sustancial inter paciente en farmacocinética, farmacodinamia o ambas;
- tendencia a estar disponible en potencias múltiples para facilitar la individualización de la dosis.

Consecuentemente, un FEMT requiere una cuantificación cuidadosa de las dosis posológicas y un monitoreo clínico periódico debido a que cambios relativamente pequeños en las concentraciones sistémicas pueden conducir a cambios marcados en la respuesta terapéutica. Por otra parte, los efectos adversos de los medicamentos conteniendo FEMT se producen usualmente con dosis que son cercanas a aquellas requeridas para alcanzar el efecto terapéutico deseado.

## El intercambio de medicamentos en el tratamiento de la epilepsia

Las epilepsias son desórdenes comunes y frecuentemente devastadores que afectan, sólo en los Estados Unidos, a más de 2,5 millones de personas. Se han identificado más de 40 formas diferentes de epilepsia. Las convulsiones epilépticas causan pérdida temporal de la conciencia, dejando al individuo en riesgo de daños físicos e interfiriendo con su desempeño educativo y laboral. El tratamiento es sintomático ya que las drogas actualmente disponibles inhiben las convulsiones, pero aún no se ha encontrado ningún tratamiento profiláctico o curativo para los pacientes epilépticos. A esto se suma un importante problema: la falta de cumplimiento de la terapéutica por parte de los pacientes, acentuada por la necesidad de terapias a muy largo plazo junto con los efectos adversos indeseados que presenta la mayoría de las drogas anticonvulsivas (Goodman & Gilman, 2006).

El término convulsión se refiere a una alteración temporaria del comportamiento debido a la descarga paroxística, hipersincrónica, excesiva e incontrolada de un gran número de neuronas. La epilepsia es un desorden crónico de la función cerebral caracterizado por episodios convulsivos críticos periódicos e impredecibles. Si bien no todas las convulsiones son de naturaleza epiléptica (existen convulsiones febriles, por ejemplo), cuando sí lo son se denominan también *crisis epilépticas*.

En áreas terapéuticas concretas, como en la epilepsia, surgen problemas únicos. El estrecho índice terapéutico, la baja solubilidad y la farmacocinética no lineal de ciertas drogas antiepilépticas (AEDs), como PHT, CBZ o VPA, producen que el intervalo de biodisponibilidad (BD) legalmente permitido, que hace a los genéricos aceptables en otras especialidades, se considere demasiado amplio para los fármacos antiepilépticos (Besag, 2000). Habitualmente, las pruebas de BD se realizan por medio de estudios de dosis únicas, lo que difiere de la práctica clínica habitual, en donde las concentraciones séricas en equilibrio estable generalmente son más altas que las concentraciones alcanzadas después de una dosis en voluntarios sanos. Además, en los estudios de dosis únicas es imposible detectar los problemas que se asocian con la acumulación de metabolitos, como puede ocurrir durante el tratamiento prolongado y con las variaciones farmacocinéticas en poblaciones especiales (niños, ancianos), así como en pautas con politerapia (Besag, 2000).

La mayoría de los pacientes con diagnóstico reciente de epilepsia tiene buen pronóstico al recibir la primera droga antiepiléptica gracias a su elevada sensibilidad al tratamiento. Sin embargo, el 10% no responderá al tratamiento y requerirá el agregado de otros fármacos (Brodie, 2010). Es por ello que las interacciones entre diversos AEDs representan importantes complicaciones durante los tratamientos. Así, por ejemplo, un paciente medicado con CBZ experimentará disminución de las concentraciones plasmáticas si se suman a su tratamiento PHT o Fenobarbital (PB), o aumento en la concentración de E-CBZ (con riesgo de experimentar toxicidad) si la droga añadida es el VPA (Johannessen & Landmark, 2010).

La repercusión clínica de la diferente BD entre los fármacos de marca y las FG fue valorada por Crawford y col. en más de 1200 pacientes que seguían tratamiento con CBZ, VPA y PHT (Crawford et al., 1996). En el 18,7% de los pacientes se había cambiado el fármaco líder por un genérico o viceversa en los dos años anteriores. De ellos, el 10,8% tuvo algún problema de eficacia o tolerancia claramente atribuible al cambio de tratamiento, mayoritariamente en el caso de cambio de líder a genérico. Esto im-

plica que, aunque se ahorra dinero al cambiar el tratamiento con AEDs originales por productos genéricos, el deterioro experimentado por algunos pacientes, la consecuente pérdida económica personal incurrida y el consiguiente trabajo adicional que se necesita de médicos y servicios sociales, en realidad aumentan los costos globales, que en la epilepsia son especialmente elevados (Argumosa & Herranz, 2000 y 2004).

En un trabajo publicado en 2005, Argumosa y Herranz analizan la repercusión económica como consecuencia de la introducción de un medicamento genérico de CBZ en España mediante indicadores como el análisis de costos, el análisis costo-efectividad y el análisis costo-beneficio. Para ello toman valores estimados para la población española de prevalencia, costos y consecuencias de los eventos más importantes que pueden aparecer al sustituir un tratamiento con CBZ. La proporción de pacientes que presentan convulsiones al cambiar la CBZ de marca por la genérica la toman de la publicación de Crawford y colaboradores (Crawford et al., 1996). También emplean otro estudio (Spitz, 1998) como base para calcular la repercusión de estas convulsiones en términos de asistencia a servicios de Urgencia, días de ingreso, accidentes secundarios a las crisis y muertes acaecidas como consecuencia de estos accidentes. Incluyen en su análisis el costo de dos monitoreos terapéuticos en los pacientes con recidivas, número mínimo que surgió mediante la consulta a numerosos neurólogos. Sus resultados muestran que el intercambio por CBZ genérica sólo trae desventajas económicas: si se introduce una FG de CBZ en el 9% de los pacientes el gasto sanitario aumenta (ahorro negativo) en 2.338.346 €, y si se introducen FG en el 20% de los casos dicho aumento llega hasta 6.336.227 € (Argumosa & Herranz, 2005).

Un análisis similar fue realizado por Crawford y colaboradores. Los autores mencionan el caso de Italia, donde se logró un ahorro de más de 25 millones de dólares como resultado de la introducción de FG en 2002, lo que claramente fue un gran incentivo para prescribir FG. Sin embargo, alertan acerca de que se debe asegurar que el menor costo de las FG no sea el único factor considerado: el verdadero costo de prescribir FG incluye también el de las visitas adicionales al médico y/o al hospital en el caso de presentarse problemas con la sustitución, y el costo de la falla del tratamiento si aparecieran episodios convulsivos asociados. El costo de una única convulsión en un paciente que estaba estabilizado es tan alto que podría contrarrestar cualquier ahorro producido por el intercambio (Crawford et al., 2006).

Muchos profesionales de la salud, organizaciones de apoyo al paciente y asociaciones profesionales creen que los pacientes con epilepsia tienen una incidencia inaceptable de convulsiones o efectos adversos cuando son intercambiados a productos genéricos. Por ejemplo:

- una encuesta realizada en 2004 reveló que sobre un total de 301 neurólogos el 68% asoció el intercambio por un genérico con la aparición de convulsiones, mientras que un 56% reportó efectos adversos aumentados por dicho intercambio (Wilner, 2004);
- de una encuesta electrónica realizada durante 2007, donde respondieron 480 médicos de Alemania, Austria y Suiza, surgió que el 49% de los profesionales reportó la existencia de problemas frente al intercambio del producto líder por un genérico (Kramer et al., 2007).

Sin embargo, se debe tener en cuenta que los datos provenientes de encuestas, más que aportar evidencia fuerte de la falla de los genéricos, dan una idea aproximada de

la magnitud de la preocupación por parte de los médicos consultados. Por otro lado, los reportes de casos (*case reports*) documentan problemas en la intercambiabilidad de AEDs en pacientes individuales (Gilman et al., 1993; Jain, 1993; Burkhardt et al., 2004).

También se ha reportado evidencia indirecta de inequivalencia de productos genéricos para un gran número de pacientes intercambiados: Andermann y colaboradores informaron las tasas de “switchback”, es decir, de retorno al producto de marca, para pacientes con epilepsia que recibían LTG luego de que el sistema de salud canadiense determinara el intercambio a formulaciones genéricas (Andermann et al., 2007). Los autores midieron la frecuencia con la que los pacientes retornaban al producto líder luego del cambio a una FG de LTG, Clobazam, VPA, Simvastatina y dos antidepresivos, Fluoxetina y Citalopram. De 1354 pacientes con prescripción de LTG genérica, un 12,9% volvió al producto de marca, y para otros AEDs se observaron tasas de retorno cercanas al 20%. En el grupo de drogas no-AEDs, los retornos sólo fueron entre el 1,5-2,9%. También se observaron aumentos significativos en las dosis de LTG dentro del grupo que permaneció tomando la formulación genérica. Frente a la misma situación, Duh y colaboradores evaluaron el impacto económico de la sustitución, y su análisis sugirió que los ahorros resultantes fueron menores a lo esperado: se esperaba una reducción del 31,9% en el costo y sin embargo fue del 28,2%, debido a un aumento promedio del 5,5% en la dosis administrada (Duh et al., 2007).

Por el contrario, la FDA (es decir, el organismo gubernamental responsable de la aprobación de los productos genéricos en los Estados Unidos) ha dejado muy clara su posición: afirma que los métodos utilizados para aprobar las formulaciones genéricas son suficientemente rigurosos para que pacientes y profesionales de la salud esperen de los equivalentes genéricos el mismo efecto terapéutico que del producto de referencia (Henney, 1999). Más aún, la FDA sostiene que los intercambios pueden hacerse entre el producto líder y los genéricos, o entre los genéricos mismos, sin temor a que se produzca pérdida del efecto terapéutico o mayor toxicidad, y que no se requieren análisis adicionales en los pacientes que hayan experimentado un intercambio.

Estas recomendaciones son válidas para todas las categorías terapéuticas, ya sea que se trate de drogas empleadas para infecciones menores o para patologías que pongan en riesgo la vida del paciente, tales como arritmias cardíacas, inmunosupresión para el trasplante de órganos o convulsiones. Las recomendaciones también se aplican a drogas consideradas de estrecho margen terapéutico. Por último, en el caso de la epilepsia, la FDA sostiene que no existe evidencia concluyente de que los pacientes hayan experimentado una diferencia en los efectos adversos o en el control de sus convulsiones a partir de cambios en las concentraciones plasmáticas de droga a partir de productos genéricos formulados dentro de los rangos establecidos para la BE (Privitera, 2008).

En noviembre de 2007 la Sociedad Americana de Epilepsia (AES) publicó un documento en el que establecía su postura respecto a la intercambiabilidad de AEDs durante el tratamiento de la epilepsia. En dicho documento declara que, a pesar de la postura de la FDA al respecto, médicos y pacientes expresan como opinión mayoritaria en numerosas encuestas que las diferentes formulaciones de un AED no siempre resultan terapéuticamente equivalentes. También declara que la AES se opone a la sustitución de AEDs sin la aprobación de médicos y pacientes, que apoya el desarrollo de regulaciones nacionales que aseguren la equivalencia terapéutica en los pacientes y que se opone a cualquier legislación nacional o estatal que limite la capacidad de los médicos

de determinar qué formulación de un AED prescribir a sus pacientes (AES, 2007; Liow et al., 2007).

La postura adoptada por otras organizaciones, como la Academia Americana de Neurología, la Fundación Epilepsia y la Liga Internacional contra la Epilepsia (Francia) también refleja lo anterior, abogando siempre por realizar los intercambios solo después del consentimiento de médicos y pacientes. La Epilepsy Foundation of America recomendó, incluso, establecer intervalos de BE diferentes para los AEDs (Epilepsy Foundation of America, 1990).

En el Capítulo 4 se analiza en detalle esta situación, es decir, la intercambiabilidad de medicamentos declarados BE según la metodología experimental clásica (y actualmente exigida por los entes regulatorios) en pacientes estabilizados con un determinado medicamento.

## La prueba de bioequivalencia

La equivalencia farmacocinética o de los perfiles concentración versus tiempo es lo que hoy conocemos como bioequivalencia: dos medicamentos serán BE si no difieren significativamente en su biodisponibilidad, es decir, en la velocidad y la cantidad absorbida cuando se administran en la misma dosis molar e iguales condiciones experimentales (FDA/CDER, 2003). Esta estrategia es una reducción del problema con fines prácticos, que si bien resulta válida para la mayoría de los medicamentos puede resultar limitada en el caso de fármacos con cinéticas complejas o en las situaciones indicadas en la Tabla 1-2.

■ **Tabla 1-2.** Situaciones en las que es imposible asumir una aproximación "reduccionista" del problema de la bioequivalencia

<b>Bioequivalencia - Situaciones especiales</b>
Cinéticas complejas / Desconocimiento de la cinética del producto de referencia
Formulaciones farmacéuticas especiales
Medicamentos empleados en grupos especiales de pacientes
Vías de administración diferentes de la oral y la parenteral
Fármacos con rangos terapéuticos muy estrechos
Excipientes con repercusión potencial (alcoholes, hidratos de carbono)
Interacciones farmacocinéticas durante los procesos de absorción
Fármacos que modifican su propia absorción en tratamientos crónicos (por ejemplo, que modifican el pH gástrico y/o la velocidad de vaciamiento gástrico)

Excepciones aparte, la BE ha sido adoptada por las agencias regulatorias de medicamentos como método para inferir la equivalencia terapéutica, y se ha aplicado principalmente a dos tipos de productos: modificaciones de una formulación existente y versiones genéricas del producto innovador.

Por otro lado, para ser BE dos medicamentos también deben ser *equivalentes o alternativas* farmacéuticas. En el primer caso se trata de productos con igual principio

activo, dosis y forma farmacéutica –no necesariamente con los mismos excipientes–, destinados a la misma vía de administración y que cumplen individualmente con los requisitos de calidad establecidos. En el segundo caso, puede diferir también la forma farmacéutica, la dosis y/o la forma química de la especie activa (sal, éster, etc.). La equivalencia farmacéutica no implica necesariamente bioequivalencia ya que las diferencias en excipientes o en el proceso de fabricación pueden dar lugar a diferencias en la disolución o la BD de dos formulaciones orales. Un esquema clásico de cómo se relacionan entre sí los conceptos anteriores puede verse en la Figura 1-1.

La prueba de BE fue rápidamente aceptada, principalmente por su menor costo comparado con los estudios clínicos que evita, y también por la gran precisión y la exactitud con que las drogas y/o sus metabolitos pueden ser medidos en los fluidos biológicos para la construcción de los perfiles de concentración luego de la administración de una dosis. De manera resumida, un estudio de BE consiste en determinar las concentraciones en un fluido biológico, típicamente plasma, del fármaco contenido en los dos medicamentos que se desea comparar. El estudio suele ser cruzado y con una única administración de cada formulación a cada grupo de voluntarios sanos.



**Figura 1-1.** Esquema de cómo se relacionan los distintos niveles de equivalencia entre medicamentos. En la figura de la izquierda se presentan los tres niveles (equivalencia farmacéutica, bioequivalencia y equivalencia terapéutica) como posiblemente se presentan en realidad; en la figura de la derecha se esquematiza la hipótesis fundamental de la BE: que dos productos BE resultarían equivalentes terapéuticos

A continuación se va a profundizar en los principales aspectos de los estudios de BE: estadística, fuentes de variación, tipos de BE, tratamiento de los datos, cálculos y diseños. En cuanto al número de voluntarios, en la actualidad se acepta que un correcto estudio de BE debe incluir al menos 12 voluntarios sanos (Bakke et al., 1994). Sin embargo, el número preciso para cada estudio dependerá de la variabilidad intra e inter individual que cabe esperar de cada droga, y de la precisión o el poder estadístico exigido (FDA/CDER, 2001). Se han derivado fórmulas para estimar el número requerido en función del coeficiente de variación (CV) esperado, y también se cuenta con tablas que tabulan el número mínimo de voluntarios en función de dicho CV y del poder estadístico deseado (Diletti et al., 1992; Hauschke et al., 1992b; Chow & Liu, 2009). Esto se tratará con más detalle en el Capítulo 3, durante el diseño del estudio de BE de cápsulas de PHT 100 mg.

Como dos formulaciones nunca pueden ser idénticas, como tampoco pueden serlo dos lotes de un mismo producto ni dos comprimidos dentro de un lote, el propósito de un estudio de BE es demostrar que los perfiles farmacocinéticos producidos por dos formulaciones no difieren más de lo permitido. El problema básico fue, por lo tanto, establecer qué diferencia era permitida entre dos perfiles o, dicho de otro modo, cuán diferentes podían ser los mismos y aún considerarse terapéuticamente similares.

Otro factor que complica este análisis es que aun cuando la misma formulación se administra al mismo individuo no se obtienen parámetros farmacocinéticos idénticos. Fue y continúa siendo un desafío encontrar métodos estadísticos robustos que permitan establecer la similitud de dos perfiles y que a su vez puedan ser cumplidos a pesar de las variaciones intra individuales inevitables. Se han publicado infinidad de propuestas respecto a los métodos estadísticos posibles, cubriendo casi toda el área de la estadística teórica: métodos Bayesianos (Rodda & Davis, 1980; Fluehler et al., 1981; Selwyn et al., 1981; Fluehler et al., 1983; Selwyn & Hall, 1984), de intervalos de confianza (Westlake, 1972 y 1976; Mandallaz & Mau, 1981; Locke, 1984), hasta test de hipótesis (Hauck & Anderson, 1984; Patel & Gupta, 1984; Rocke, 1984; Schuirman, 1987), desde paramétricos hasta no paramétricos (Steinijans & Diletti, 1983; Hauschke et al., 1992a).

Estadísticamente, demostrar que una formulación test (T) y otra de referencia (R) son “suficientemente” similares significa establecer una probabilidad o regla de decisión para los parámetros (por ejemplo, la media) de la distribución estadística que asumimos para las medidas de BD (por ejemplo, el ABC). Expresando en símbolos sería:

$$Pr\{\Delta_1 \leq f(\theta_T, \theta_R) \leq \Delta_2\} \leq 1 - P$$

■ Ecuación 1-1

Es decir, que cierta función comparadora de los parámetros de la distribución estadística de T y R,  $f(\theta_T, \theta_R)$ , debe caer dentro de límites preestablecidos,  $\Delta_1$  y  $\Delta_2$ , con una cierta probabilidad  $1 - P$ . El intervalo comprendido entre  $\Delta_1$  y  $\Delta_2$  se denomina “intervalo de bioequivalencia” (IB). Por consiguiente, se requieren estándares bien definidos para establecer:

- a. qué medidas de la biodisponibilidad y que parámetros de sus respectivas distribuciones deben cumplir con el criterio;
- b. el ancho del intervalo para cada uno de esos parámetros;
- c. la función que tiene sentido comparar de dichos parámetros;
- d. el nivel de probabilidad empleado.

a. Las medidas de BD más frecuentemente utilizadas suelen ser: una de cantidad como ABC ( $ABC_{0-t}$  y/o  $ABC_{0-inf}$ , tal que la primera represente al menos el 80% de la segunda) y otra de forma o velocidad como Cmax, junto con la tabulación de Tmax (Schall & Luus, 1992). También se ha propuesto al parámetro Cmax/ABC como una buena medida de la forma de la curva (Endrenyi et al., 1991), ya que es un cociente indicativo de la velocidad del proceso. A su vez, de las medidas de BD elegidas se debe estudiar algún parámetro de su distribución, comúnmente la media. Lo más usual es comparar la diferencia entre las medias de las dos formulaciones, pero con los datos log-transformados (es decir, se comparan las medias geométricas).

b. El ancho del IB es la forma principal de lograr significancia clínica o importancia. Para el cociente de las tendencias centrales,  $\Delta_1$  se toma generalmente como 80%, ó 20% en el caso de diferencias (equivalente a 80-125 para datos log-transformados). El origen de la regla del 20% no es claro, pero parece ser consistente con otros límites, tales como los de la definición de potencia de la Farmacopea de EE.UU. (USP) (Jackson, 1994). Actualmente, éste es el intervalo exigido por la mayoría de las agencias regulatorias de medicamentos, si bien han existido propuestas de un IB más angosto (por ejemplo, 90-110%) para drogas de estrecho margen terapéutico, de elevada toxicidad y/o de elevada variabilidad intra individual (Shah et al., 1996), como así también para las medidas de BD que posean alta variabilidad (EMA/CPMP, 2001).

c. El límite  $\Delta_1$  está expresado como porcentaje de la diferencia respecto a la formulación de referencia. Esta diferencia relativa reconoce el hecho de que el valor absoluto de la estima de los parámetros depende totalmente de los voluntarios del estudio, y que por lo tanto puede haber grandes diferencias en la magnitud de las medidas de BD entre diferentes estudios. Al expresar los resultados en escala relativa, los estudios de BE de distintas drogas pueden tener los mismos límites para el IB.

d. El nivel de seguridad que exigen las autoridades para la comparación entre T y R viene dado por  $1 - P$ . Ésta es la probabilidad de que la diferencia verdadera o el cociente de los parámetros caigan dentro de la zona de seguridad definida por el IB. A menor P, mayor seguridad. Para la mayoría de los parámetros P suele fijarse en 0,05.

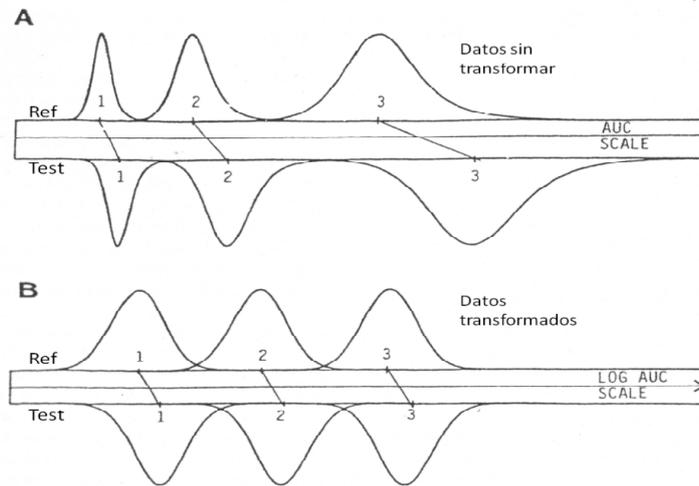
### Distribución de los parámetros farmacocinéticos

Muchos estudios farmacocinéticos (Steinijans et al., 1982; Friedman et al., 1986) indican que la distribución de las medidas de BD es sesgada hacia la derecha (es decir, la “cola” derecha de la distribución es más larga que la de la normal). Debido a ese sesgo positivo, a que sus posibles valores son siempre mayores a cero y a que la varianza tiende a ser mayor cuanto mayor es el valor medio de la variable estudiada, es razonable asumir que la distribución es lognormal (Pabst & Jaeger, 1990) y así se considera actualmente (ANMAT, 1999; EMA/CPMP, 2001; FDA/CDER, 2003).

La Figura 1-2 presenta un ejemplo esquemático del fundamento del uso de la transformación logarítmica. El gráfico superior (A) presenta, para tres individuos (1, 2 y 3), la distribución lognormal de ABC sin transformar. Las curvas superiores corresponden al producto R y las inferiores a T: entre ambos se estableció una diferencia del 20% en los valores medios, y éstos a su vez aumentan secuencialmente entre los individuos (se duplican). Se puede ver que a medida que el ABC medio aumenta entre los sujetos también lo hace la varianza (o desviación estándar [SD]) intra individual, generando gaussianas más anchas, a pesar de que el coeficiente de variación ( $CV = SD/ABC$  medio) se mantiene constante. En este gráfico también se puede observar que las líneas que unen las medias obtenidas con R y T para cada sujeto no resultan paralelas, es decir que una misma diferencia porcentual entre dos formulaciones (20% en este caso) provoca distintas diferencias intra individuales según el valor absoluto del ABC.

El gráfico inferior (B) corresponde a la transformación logarítmica de las curvas de (A). En este caso, todos los sujetos tienen distribuciones con igual forma y las líneas que unen las medias son paralelas, es decir que todos los sujetos tienen igual diferencia logarítmica entre las formulaciones. También las curvas transformadas son equidistantes dentro de una misma formulación ya que la transformación elimina el efecto de aumentar secuencialmente el doble.

Otra razón para el uso de la transformación logarítmica es que la comparación primaria de interés en un estudio de BE es la relación entre las formulaciones T y R, y los modelos estadísticos disponibles más desarrollados no evalúan cocientes sino diferencias, por lo que la transformación permite aplicar dichos modelos a la razón T/R, expresada como  $\ln T - \ln R$  (Zapater & Horga, 1999).



**Figura 1-2.** Efecto de la transformación logarítmica en las comparaciones intra individuales para dos formulaciones con un 20% de diferencia en su respuesta media. El gráfico superior (A) muestra la distribución de ABC de tres individuos (1, 2 y 3) para las formulaciones Referencia (curvas superiores) y Test (curvas inferiores). El gráfico inferior (B) representa lo mismo pero con los datos log-transformados. Extraído de Jackson, 1994. AUC: área bajo la curva (ABC)

## Fuentes de variación

La mayor fuente de variación en un estudio de BE está dada por los individuos (inter individual,  $\sigma_{\text{inter}}$ ), por sus diferencias genéticas (raza, capacidad metabolizadora, etc.), ambientales y sociales (alimentación, actividades, trabajo, entorno, etc.), como así también por encontrarse en diferentes etapas de su vida biológica, psicológica y social. En segundo lugar se encuentra la variación intra individual ( $\sigma_{\text{intra}}$ ): por qué un mismo sujeto no reacciona de la misma manera cuando se le administra el mismo producto en dos oportunidades diferentes. Otra fuente de variación está dada por las diferencias que puedan existir intra formulación: dentro de un mismo lote, no todas las unidades de dosificación (típicamente comprimidos) son iguales. Sin embargo, frente a las variaciones biológicas típicas de un estudio de BE este aporte no suele ser significativo, y es imposible separarlo estadísticamente de  $\sigma_{\text{intra}}$ .

La última gran fuente de variación es aquella que se conoce como “interacción Individuo\*Formulación” (I\*F), que se produce cuando los individuos se comportan de manera diferente en la respuesta relativa de una formulación respecto a otra. Un ejemplo clásico es cuando se modifica la absorción en algunos sujetos por interacción con un excipiente presente en una formulación y no en la otra (Chow & Liu, 2009).

Las demás variabilidades de un estudio clásico de BE se deben minimizar al máximo: las correspondientes al método analítico y a los tiempos de muestreo, al igual que ciertas variables biológicas (voluntarios biológicamente homogéneos, alimentación,

ingesta de líquidos, horas de ayudo previas y nivel de actividad durante el estudio, etc.). En cuanto a los métodos analíticos para estudios biológicos, se exige que sean exactos (entre 85 y 115% del verdadero valor) y precisos (error estándar relativo menor al 15%, y menor al 20% en el límite de cuantificación).

### Datos atípicos (“outliers”)

En los estudios de BE, los outliers se definen como sujetos que presentan valores discordantes o atípicos de uno o más parámetros farmacocinéticos cuando se comparan con los demás valores obtenidos en el estudio. En el caso de la BE, como suele llevarse a cabo siguiendo un diseño cruzado, el tipo más importante de outlier es el que difiere significativamente de los demás en cuanto a la respuesta *relativa* T/R (USP 31/NF 24, 2008).

La existencia de un outlier en un estudio de BE generalmente se debe a fallas en el producto (en una unidad de dosificación dada, lo que es más común que suceda en sistemas de liberación modificada cuando falla el sistema regulador de la liberación), fallas durante la administración (vómito, por ejemplo) o subpoblación (clase minoritaria en la población general para la que los productos no resultan BE aunque sí lo hayan sido para la población mayoritaria).

Se han desarrollado numerosos test estadísticos para la identificación de outliers, la mayoría basados en análisis de residuales (Liao, 2007; Ramsay & Elkum, 2005; Wang & Chow, 2003). Sin embargo, los outliers no pueden ser simplemente eliminados del análisis sobre la base de un test estadístico: cuando se identifican uno o más datos atípicos se debe buscar y proveer de evidencia científica y/o explicaciones que justifiquen la exclusión de dicho sujeto del análisis estadístico (y dependiendo de la presunta causa del outlier, el mismo deberá estar presente tanto en los datos de ABC como de Cmax).

No sólo eso, sino que sólo se podrán eliminar del análisis aquellos outliers resultantes de fallas de productos o procesos, y no así cuando el valor atípico sea causado por una potencial interacción I\*F (subpoblación). En un diseño cruzado 2x2 no es posible distinguir estas dos clases de outliers, sino que para ello es necesario un diseño con administraciones replicadas de cada producto (Schall et al., 2010).

Por último, si se eliminan datos del análisis primario, corresponde realizar un análisis de sensibilidad e informar los resultados finales de la BE, tanto incluyendo como excluyendo dichos datos.

### Tipos de bioequivalencia

Acorde a lo discutido hasta aquí, se puede concluir que dos formulaciones pueden diferir entre sí por sus parámetros de tendencias centrales, por variaciones intra individuales y/o por la existencia de interacciones con algunos individuos. A raíz de esto se han propuesto diversos diseños experimentales: desde enero de 2001, con la aparición de la guía *Statistical Approaches to Establishing Bioequivalence* la FDA contempla los estudios de BE poblacional (BEP) e individual (BEI), en adición a la BE media (BEM) universalmente aplicada (FDA/CDER, 2001).

La Figura 1-3 presenta ejemplos de posibles situaciones durante estudios de BE. Las líneas punteadas verticales representan la variabilidad inter individual para las formulaciones T y R. Las líneas verticales más pequeñas representan la variabilidad intra individual de cada voluntario (se ejemplifican tres voluntarios) con cada formulación.

Las líneas que unen las formulaciones conectan la media verdadera de cada sujeto. En el caso A, las tres clases de BE serían aceptadas; en el caso B la respuesta media para la formulación T es diferente que para R, si bien todas las variabilidades permanecen constantes y no hay interacciones. Si dicha diferencia es lo suficientemente grande, ninguna de las tres BE resultaría positiva.

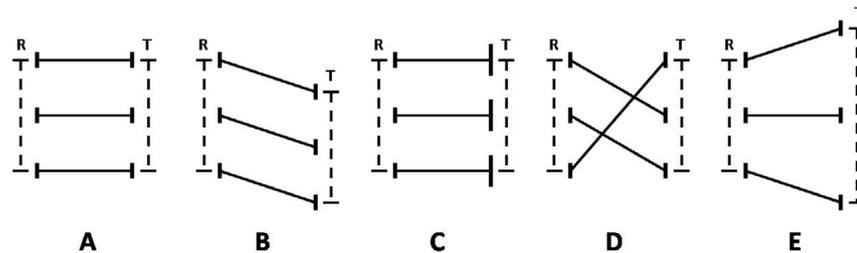


Figura 1-3. Cinco posibles situaciones para ejemplificar cómo los diferentes tipos de BE declararían a los productos R (referencia) y T (test) [ver más detalle en el texto]

En la situación C, el producto T muestra mayor variabilidad intra individual que R. Qué magnitud de esta mayor variabilidad es clínicamente significativa aún no ha sido establecido por ninguna agencia reguladora. Una BEM sería posiblemente aceptada en este caso, ya que la mayor  $\sigma_{\text{intra}}$  se diluye en el término del error y puede ser enmascarada si el tamaño de muestra es lo suficientemente grande. Sin embargo, BEP y BEI podrían no concluirse ya que en ellas se compara la varianza de los parámetros. Los casos D y E ilustran distintas interacciones I\*F: en D un individuo se comporta de manera inversa a los otros dos a pesar de que los demás parámetros se mantienen constantes, mientras que en E la interacción provoca un aumento en la  $\sigma_{\text{inter}}$  de T. En D, los productos R y T posiblemente serían declarados BEM y BEP pero no BEI, mientras que en el caso E ni BEP ni BEI serían aceptadas.

Por lo tanto, la BEM no es capaz de determinar o separar algunos aspectos de variación, como la variabilidad intra individual de cada una de las formulaciones o la variabilidad por la interacción I\*F, ya que sólo establece diferencias entre las medias de la muestra estudiada. Mediante la BEP se puede calcular la suma de las varianzas intra e inter individuales de las formulaciones test y referencia por separado, y la BEI permite calcular la variabilidad intra individual de cada formulación por separado y el componente de la variabilidad de la interacción I\*F. Se ha postulado que tanto BEP como BEI resuelven mejor el problema de la intercambiabilidad entre medicamentos, al estudiar mejor el efecto del cambio en un mismo sujeto y acercarse más al objetivo final de garantizar la eficacia y seguridad del intercambio (García & Gandía, 2001).

Si bien ninguna agencia reguladora de medicamentos estableció la exigencia de estudios de BEP o BEI, en la literatura aparecieron muchas opiniones a favor de dichos estudios, así como propuestas de implementación en determinadas situaciones, típicamente para drogas de estrecho margen terapéutico (Schall, 1995; Chow & Liu, 2009). Un clásico ejemplo es la PHT, que ha sido propuesta como candidata para estudios de BE individual (BEI), ya que reúne todos los factores que afectan negativamente la equivalencia terapéutica y la BE: es un FEMT de baja solubilidad en agua y farmacocinética no-lineal (Anderson, 2008). Es por ello que en el Capítulo 3 se analizan comparativamente la BEM y la BEI utilizando PHT como droga modelo.

## Cálculo de la BEM

La manera usual de formular las hipótesis en estadística (hipótesis nula de no diferencia vs. hipótesis alternativa de diferencia) tiene dos grandes desventajas cuando se aplica a estudios de BE: por un lado, en los parámetros se detectan diferencias estadísticamente significativas que tal vez no sean clínicamente significativas; por otro, un estudio con estimas imprecisas de los parámetros (es decir, poder inadecuado) podría resultar en BE cuando en realidad la diferencia no detectada entre los productos es clínicamente relevante (Zapater & Horga, 1999).

Para solucionar esas desventajas, Westlake propuso el empleo de intervalos de confianza (IC) y postuló que se obtendría una seguridad razonable en el establecimiento de la BE si el IC de una función adecuada de los datos se encontraba completamente incluido dentro de un intervalo de BE (IB) terapéuticamente determinado (Westlake, 1972). También propuso que el nivel de confianza igual a 1-2α% sería más apropiado como criterio de aceptación de nuevas drogas. Al mismo tiempo, derivó un IC (1-2α%) simétrico respecto a 100%, pero este intervalo simétrico no fue bien recibido por implicar una mayor probabilidad de aceptación comparado con el intervalo 1-2α% tradicional (Westlake, 1976).

Las ecuaciones correspondientes al IC (1-2α%) tradicional son:

$$(\overline{\ln T} - \overline{\ln R}) \pm t_{\left(\frac{2\alpha}{2}; n_1+n_2-2\right)} \cdot \sqrt{\frac{n_1+n_2}{2n_1n_2} \cdot s_e^2}$$

■ Ecuación 1-2

En la ecuación anterior,  $\overline{\ln T}$  y  $\overline{\ln R}$  son las medias de los datos ln-transformados del parámetro correspondiente (Cmax, ABC) de T y R, respectivamente; t es el valor correspondiente de la tabla de Student;  $s_e^2$  la varianza residual obtenida del análisis de varianza (ANAVA); y  $n_1$  y  $n_2$  el número de voluntarios que recibieron una u otra formulación. Como en el diseño clásico cruzado  $n_1 = n_2$  y  $N = n_1+n_2$  (ver más adelante), la ecuación se transforma en:

$$(\overline{\ln T} - \overline{\ln R}) \pm t_{(\alpha; N-2)} \cdot \sqrt{\frac{2}{N} \cdot s_e^2}$$

■ Ecuación 1-3

Los límites superior e inferior del IC de la media geométrica de los datos en escala normal (anti-ln) están dados por:

$$e^{[(\overline{\ln T} - \overline{\ln R}) \pm t_{(\alpha; N-2)} \cdot \sqrt{\frac{2}{N} \cdot s_e^2}]} = e^{[(\overline{\ln T} - \overline{\ln R})]} \cdot e^{[\pm t_{(\alpha; N-2)} \cdot \sqrt{\frac{2}{N} \cdot s_e^2}]}$$

■ Ecuación 1-4

Donde  $e^{[(\overline{\ln T} - \overline{\ln R})]}$  es precisamente la media geométrica del cociente T/R del parámetro considerado.

El problema básico de los test de hipótesis tradicionales, mencionados anteriormente, es que en el caso de la BE resultan estar planteados a la inversa: la BE, definida

mediante el IB, debería ser la hipótesis alternativa en vez de la hipótesis nula ( $H_0$ ). De ese modo, el error de tipo I (error más importante, ya que es la probabilidad de declarar BE dos productos que no lo son, también llamado “riesgo del consumidor”) quedaría fijado en 5%, mientras que el error de tipo II (la probabilidad de no declarar BE a dos productos que sí lo son) quedaría en aproximadamente el 20% ( $1-\beta$ ). Hauck y Anderson derivaron un test que contemplaba esta inversión de las hipótesis, pero el ensayo tenía pobres características cuando las varianzas eran grandes (Hauck & Anderson, 1984).

Schuirmann propuso entonces el método de los dos ensayos de hipótesis unilaterales, también con la BE como hipótesis alternativa: uno para ensayar sub-biodisponibilidad y otro súper-BD (Schuirmann, 1987). Como cada uno de ellos se realiza con el  $\alpha\%$  nivel de confianza, y para un estudio de BE sólo se puede cometer un error de tipo I (nunca dos), el ensayo general tiene  $\alpha\%$  probabilidad de error (típicamente,  $\alpha = 5\%$ ). En ese trabajo, Schuirmann también demuestra que su método es matemáticamente equivalente a la construcción del IC ( $1-2\alpha\%$ ). Por lo tanto, si se fija el riesgo del consumidor al 5%, idénticas conclusiones se obtienen si se construye el IC 90%.

Las ecuaciones correspondientes son:

$$Pr \left\{ t_{inf} = \frac{(\ln \bar{T} - \ln \bar{R}) - \ln \Delta_1}{\sqrt{\frac{2 \cdot s_e^2}{N}}} \right\} \leq \alpha ; Pr \left\{ t_{sup} = \frac{\ln \Delta_2 - (\ln \bar{T} - \ln \bar{R})}{\sqrt{\frac{2 \cdot s_e^2}{N}}} \right\} \leq \alpha$$

■ Ecuación 1-5

En la práctica lo que se hace es calcular  $t_{inf}$  y  $t_{sup}$ , y sólo si ambos resultan  $\geq t_{(\alpha; N-2)}$  se rechazan ambas hipótesis nulas y los productos T y R se declaran BE al aceptar la hipótesis alternativa. Matemáticamente, esto es equivalente a reemplazar  $t_{inf}$  y  $t_{sup}$  por  $t_{(\alpha; N-2)}$  y despejar los  $\ln \Delta_1$  y  $\ln \Delta_2$  respectivos, lo que por anti- $\ln$  devuelve a la Ecuación 1-4. Las BEM incluidas en el presente trabajo de tesis se realizaron de acuerdo a lo descrito hasta aquí, y siempre se informa el IC 90% ( $\alpha = 5\%$ ).

## El ANAVA y el diseño experimental

Si bien en determinadas circunstancias puede ser necesario realizar experimentos administrando dosis múltiples, lo más común es la realización de ensayos con dosis únicas (Bakke et al., 1994), y por ello nuestro análisis se limita a dicha situación. Si se asume la distribución lognormal se deben transformar previamente los datos (generalmente se utiliza logaritmo natural) de manera de cumplir con los requisitos del ANAVA, principalmente la aditividad de los errores y su distribución normal.

Se puede trabajar siguiendo un diseño en paralelo, si bien no es el de elección. Hay situaciones que no dejan otra alternativa, como drogas con vidas medias muy largas –para las que el período de lavado (washout) de un diseño cruzado implicaría demasiado tiempo– o drogas que no resulta ético administrar a voluntarios, y por lo tanto se debe trabajar con pacientes: debido a su enfermedad, resulta imposible asumir que en el segundo período se encuentran en las mismas condiciones que en el primero. En ese caso, y como se ve en la Figura 1-4, los sujetos se asignan al azar a un grupo u otro, y el modelo estadístico aditivo viene dado por:

$$Y_{ij} = \mu + F_i + \varepsilon_{ij}$$

■ Ecuación 1-6

Donde  $Y_{ij}$  es la observación (Cmax, ABC) para el sujeto  $i$  con la droga  $j$ ,  $\mu$  es la media general,  $F_i$  es el efecto verdadero de la formulación  $i$  y  $\varepsilon_{ij}$  es el error al azar, para el que se asume distribución normal,  $N(0, \sigma_e^2)$ . El mayor problema de este diseño es que todas las fuentes de variación mencionadas anteriormente quedan incluidas en  $\sigma_e^2$  del error, ya que ninguna se puede estimar por separado. Como  $\sigma_e^2$  es estimada por  $s_e^2$ , la que se utiliza en las fórmulas de BEM, su aumento produce que sea más difícil concluir BEM y/o se necesiten más individuos para poder hacerlo.

Los diseños de elección son los diseños cruzados: éstos constan de secuencias (S) que describen el orden en que las formulaciones (F) son administradas a los sujetos en los períodos (P). Los sujetos se asignan al azar a las secuencias (o grupos) y también al azar se asignan las F a los períodos. Éstos deben estar separados por tiempos de lavado adecuados para que toda la droga se elimine del organismo de los individuos participantes (generalmente se acepta entre 5 ó 7 vidas medias del fármaco).

Las ventajas de este tipo de diseños son:

- cada individuo sirve como su propio control, lo que permite comparar las dos F en estudio en el mismo sujeto;
- cuando se comparan ambas F se puede eliminar la variabilidad inter individual, ya que los mismos individuos han recibido las dos F en estudio;
- si se asigna aleatoriamente a cada individuo a recibir una de las dos S de administración de las F se pueden estimar sin sesgos las diferencias o razones entre ambas F;
- desde un punto de vista práctico, se necesitan menos individuos en el estudio de lo que se requerirían en un estudio en paralelo con el mismo poder.

Existen muchos tipos de diseños cruzados que difieren entre sí en el número de S, F y P, sin embargo se pueden clasificar en diseños con o sin replicados, entendiendo por replicados a la administración de al menos una formulación más de una vez en una secuencia, es decir, en un individuo.

El diseño cruzado más frecuentemente utilizado es el de dos períodos y dos secuencias (2x2), sin replicados (ver Figura 1-4). En este caso, el modelo estadístico aditivo tiene la siguiente forma:

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + I_{j(i)} + F_k + P_l + C_k + \varepsilon_{ijkl}$$

■ Ecuación 1-7

Donde  $Y_{ijkl}$  es la observación (Cmax, ABC) para el sujeto  $j$  en la secuencia  $i$ , con la formulación  $k$  en el período  $l$ ;  $\mu$  es la media general;  $S_i$  el efecto de la secuencia;  $I_{j(i)}$  el efecto del individuo  $j$  en la secuencia  $i$ ;  $F_k$  el efecto de la formulación  $k$ ;  $P_l$  el efecto del período  $l$ ;  $C_k$  el efecto de arrastre (carryover) de la formulación  $k$  y  $\varepsilon_{ijkl}$  el error al azar, para el que se asume una distribución  $N(0, \sigma_e^2)$ . Este modelo asume que las observaciones en cada sujeto son independientes, y que la varianza de una  $Y$  observada es  $\sigma_{inter}^2 + \sigma_e^2$ .

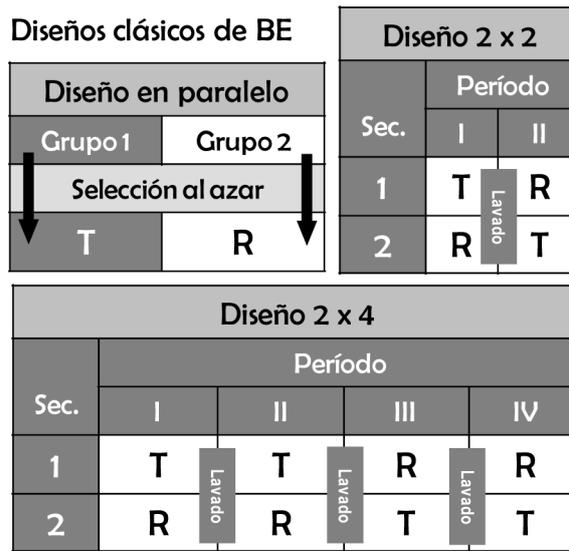


Figura 1-4. Diseños experimentales típicos en estudios de BE. El diseño en paralelo, donde cada individuo se asigna al azar a cada grupo; el diseño 2x2, sin replicados; y el diseño 2x4, apto para estudios de BEI, donde cada formulación se administra dos veces a cada individuo

En un estudio correctamente diseñado y realizado, los efectos  $P_r$ ,  $S_i$  y  $C_k$  deberían no ser significativos, ya que si los grupos fueron verdaderamente asignados al azar y se respetaron los tiempos de lavado, no deberían existir diferencias entre ellos ni entre los períodos, como así tampoco influencia de una formulación dada en las medidas siguientes. Por el contrario, el efecto de los individuos ( $I_{j(i)}$ ) suele ser significativo, ya que eso significa que la  $\sigma^2_{inter}$  es significativamente mayor a  $\sigma_e^2$ , lo que a su vez justifica el uso de un diseño cruzado. El efecto de la formulación ( $F_k$ ) es el que interesa en un estudio de BE. Si bien la conclusión del ANAVA no es válida para el establecimiento o no de BE, es común obtener un resultado coincidente al que arroja luego el IC 90%. El término del error ( $\varepsilon_{ijkl}$ ) representa todas las fuentes de variación que no pueden ser explicadas por ninguno de los efectos anteriores. Frecuentemente se lo denomina “varianza intra individual” (sin distinción de la formulación), si bien no es estrictamente correcto, ya que también incluye la interacción Individuo\*Formulación.

Surge hasta aquí que un diseño sin replicados no permite estimar los efectos puros de las formulaciones, las verdaderas varianzas intra individuales, como así tampoco la interacción Individuo\*Formulación, inconvenientes que se superan si se replica la administración de las formulaciones en los sujetos. Estos diseños tienen más períodos o secuencias que formulaciones. En su parte inferior, la Figura 1-4 muestra uno de los diseños replicados más comúnmente empleados, el de dos S y cuatro P (2x4). Se pueden encontrar muchos otros esquemas replicados en bibliografía (Chow & Liu, 2009). En general, el modelo aditivo de estos diseños replicados se compone de los siguientes términos:

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + I_{j(i)} + F_k + P_l + C_k + I_{j(i)k} * F + \varepsilon_{ijkl}$$

Ecuación 1-8

El significado de los términos es el mismo que para el modelo sin replicados, solo que aquí se agrega el término de la interacción  $I_{j(f)k} * F$ , y el error al azar se distribuye según  $N(0, \sigma_{\text{intra}}^2)$ . Si bien brinda más información que el de una BEM, este modelo resulta estadísticamente más complejo. En el Capítulo 3 se presenta un ejemplo de aplicación, donde se detallan las ecuaciones necesarias para el cálculo de BEI por uno de los métodos posibles para su determinación (método de los momentos).

Cabe destacar que todos los modelos anteriores sólo pueden aplicarse a variables continuas y normalmente distribuidas como Cmax y/o ABC. En el caso de Tmax, no es adecuado realizar un análisis paramétrico como el ANAVA por tratarse de una variable discontinua. Se suele utilizar una prueba no paramétrica como el test de Wilcoxon (Hauschke et al., 1992a; Steinijans et al., 1992). De todas maneras, la evaluación estadística de Tmax sólo tiene sentido cuando la liberación rápida del principio activo se relaciona con un efecto clínico relevante o efectos adversos (García & Gandía, 2001).

### El fluido biológico utilizado para el monitoreo

Además de los estudios de BE, el monitoreo de drogas en los fluidos biológicos es una parte esencial de muchas aplicaciones clínicas y farmacocinéticas, ya que brinda información valiosa acerca de los parámetros farmacocinéticos de un paciente específico, y de esa manera permite mejorar la terapéutica. En teoría, la mejor forma de evaluar el efecto farmacológico sería mediante la monitorización en el sitio de acción, pero como no es posible hacerlo, se acepta al plasma como el fluido biológico que brinda la mayor información, por ser allí a donde en principio acceden las moléculas administradas antes de distribuirse al resto del organismo. En ciertas ocasiones también se ha utilizado la orina, por su más fácil obtención y menor agresión al sujeto (micción espontánea), a pesar de poseer menor poder informativo.

Sin embargo, aunque no de manera muy extensa aún, muchos autores han utilizado a la saliva tanto para investigaciones clínicas como para el monitoreo terapéutico de diversos fármacos (Ritschel & Tompson, 1983; Drobitch & Svensson, 1992; Eadie, 2001; Kaufman & Lamster, 2002; Aps & Martens, 2005). El uso del monitoreo terapéutico de drogas en saliva está ampliamente justificado por la simplicidad en la obtención de muestras, las ventajas éticas que implica ser un método no invasivo y la posibilidad del monitoreo domiciliario por parte de los mismos pacientes, entre otras ventajas. Las muestras salivales pueden ser tomadas por individuos con escaso o nulo entrenamiento y no se requiere para ello ningún equipamiento especial (Hofman, 2001).

Aunque aún no se ha aceptado a nivel de las agencias regulatorias de medicamentos, el monitoreo en saliva posee un potencial informativo formidable. La saliva es un fluido producido por un tejido que, como cualquier otro, está en equilibrio con la sangre arterial. Los solutos allí presentes son producto de la difusión de la fracción no ligada a los componentes macromoleculares sanguíneos, es decir son reflejo de la fracción de droga farmacológicamente activa. Esto no es equivalente a la fracción de droga libre cuantificable en sangre venosa, sino que está relacionado con la fracción libre presente en sangre arterial, que proviene prácticamente sin capilarización previa –salvo a nivel pulmonar–, y por ende sin distribución, desde el sitio de absorción (Fagiolino, 1999).

Por esto, creemos que la saliva es una valiosa elección para los estudios de BD/BE: todos los estudios de BE incluidos en este trabajo fueron realizados en saliva. El fundamento de su aplicación y las evidencias de su idoneidad se presentan y discuten en el Capítulo 6.

## El principio de transitividad

Se entiende como “Principio de Transitividad” al que establece que, dadas dos formulaciones genéricas (FG) o similares B y C, y una referencia A, si B y C son bioequivalentes a A, entonces B y C se asumen BE entre ellas, a pesar de que esa BE no ha sido realmente probada (ver esquemáticamente en Figura 1-5). Este principio surge como consecuencia de la metodología con que se realizan los estudios de BE actualmente exigidos en las etapas de pre-comercialización de un producto: para lograr la aprobación de la autoridad sanitaria para su comercialización, todas las FG de una determinada droga deberán demostrar ser BE al producto que dicha autoridad establezca como referencia. En ningún caso se ensaya la BE entre las distintas FG, si bien luego las mismas se pueden llegar a intercambiar en la práctica clínica, más aún, a pesar de que se ha demostrado que el principio de transitividad no siempre se cumple (Benet & Goyan, 1995; Anderson & Hauck, 1996; Midha et al., 1998)

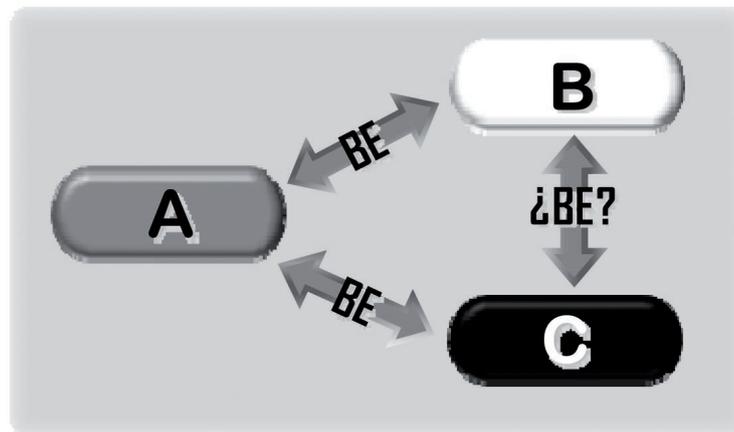


Figura 1-5. Representación esquemática del principio de transitividad: dos productos B y C que demostraron ser BE con el producto de referencia A se asumen BE entre ellos si bien dicha BE nunca fue probada

Con el objetivo de respaldar los intercambios entre medicamentos conteniendo el mismo principio activo, la mayoría de los países requiere a los productores de medicamentos genéricos la realización de estudios de BE entre su producto y un producto de referencia, de manera de asegurarse que poseen características farmacocinéticas similares (EMA/CPMP, 2001; FDA/CDER, 2003). La referencia suele ser el producto innovador, por ser éste el único con eficacia terapéutica y seguridad comprobadas. Sin embargo, cuando el innovador no se encuentra disponible, la referencia puede ser el producto líder del mercado o aquel que determine la autoridad sanitaria correspondiente.

De esta forma, la prueba de BE entre una FG y la referencia estaría garantizando que un paciente puede sustituir dicha FG por *cualquier* otra similar (la referencia o demás FG) sin poner en riesgo su salud y con el mismo resultado terapéutico.

En el Capítulo 5 se estudia el principio de transitividad. Allí se utilizan ensayos *in vitro* para probar que existe una gran probabilidad de encontrar desviaciones al principio de transitividad en estudios de BE *in vivo*. Creemos que esta clase de metodologías en las que se estiman resultados *in vivo* a partir de resultados *in vitro* (ver también en el Capítulo 6) constituyen una aproximación bioética a los problemas planteados (*principio de las Tres Rs*, Russell & Burch, 1959).

## Datos *in vitro*: estudios de disolución

*...it would seem that prompt action of certain remedies  
 must be considerably impaired by firm compression.  
 ...the composition of all compressed tablets should be such  
 that they will readily undergo disintegration and dissolution in the stomach.  
 C. Caspari (1895)*

La disolución se define como la transferencia de masa desde un sólido al medio de disolución o solvente que lo rodea. Es una propiedad dinámica que se modifica en el tiempo y que explica el proceso por medio del cual se puede obtener una mezcla homogénea de un sólido o un líquido en un solvente. Fisicoquímicamente, puede representarse como el proceso inverso a la cristalización, lo que macroscópicamente corresponde a la desintegración de la estructura cristalina bajo la acción del disolvente que la rodea (Cárcamo, 1981).

La evaluación de la disolución tiene aproximadamente un siglo de desarrollo. Sin embargo, en las últimas décadas ha suscitado mayor interés, especialmente por su aplicación al estudio de productos medicamentosos sólidos, relacionando este proceso con la biodisponibilidad de fármacos en el organismo, ya que a excepción de algunos casos, todo principio activo debe disolverse para poder absorberse, puesto que antes de cruzar una membrana biológica debe ser solubilizado en los líquidos que bañan dicha membrana (Arancibia et al., 1992). Si además el principio activo se encuentra incluido en una forma farmacéutica deberá ser liberado de ella antes de disolverse. En consecuencia, la velocidad a la que aquellos principios activos poco solubles en agua se disuelven en el tracto gastrointestinal a partir de la forma farmacéutica se correlaciona con la velocidad de su absorción sistémica (Shargel & Yu, 1993).

El estudio de la disolución se convierte en el ensayo *in vitro* de elección para poder emitir un juicio sobre el comportamiento que tendrá el medicamento *in vivo*. Con el tiempo, los estudios de disolución se han expandido más allá de los comprimidos y las cápsulas, para abarcar a los productos de liberación modificada, productos transdérmicos, suspensiones orales, etcétera.

En 1897, Noyes y Whitney publicaron el artículo “Rate of dissolution of solid substances in their own solution”, que se convirtió en una de las primeras referencias a la evaluación de la disolución. En dicho trabajo, los autores sugieren que la velocidad de disolución ( $dC/dt$ ) es limitada por una capa estanca de solución saturada que se forma instantáneamente alrededor de las partículas del sólido y a partir de la cual las moléculas difunden al seno de la solución (Noyes & Whitney, 1897). En 1904, Nernst y Brunner establecieron la relación entre la velocidad de disolución y el coeficiente de difusión (D), mediante una ecuación derivada de la de Noyes-Whitney por la aplicación de la ley de difusión de Fick (Dokoumetzidis & Macheras, 2006). La Figura 1-6 muestra las ecuaciones correspondientes.

$$(A) \frac{dC}{dt} = k \cdot (C_s - C) \quad (B) \frac{dC}{dt} = \frac{DS}{Vh} \cdot (C_s - C)$$

Figura 1-6. Ecuaciones derivadas por Noyes y Whitney (A) y Nernst y Brunner (B). En todos los casos,  $dC/dt$  representa la velocidad de disolución de la droga;  $k$  es una constante;  $C_s$  la concentración de la droga en la capa estanca (concentración de saturación);  $C$  la concentración en el seno de la solución;  $S$  el área superficial del sólido;  $D$  el coeficiente de difusión,  $V$  el volumen de solución y  $h$  el espesor de la capa estanca

En 1930 comenzaron a aparecer experimentos de disolución bajo la forma de correlaciones *in vitro/in vivo*, y en 1934 fue la primera vez que un libro oficial, la farmacopea Helvética de Suiza, incluyó el test de desintegración para comprimidos, aunque recién en 1950 dicho test se convirtió en oficial para la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 14).

Levy y Hayes utilizaron un vaso de precipitados, agitado mediante una paleta accionada por un motor que giraba a 30-60 rpm (Figura 1-7), y con ese dispositivo encontraron diferencias significativas en las velocidades de disolución de diferentes marcas de comprimidos de aspirina, lo que se relacionaba con la incidencia de irritación gástrica causada por aquellas marcas con menores velocidades de disolución (Levy & Hayes, 1960).

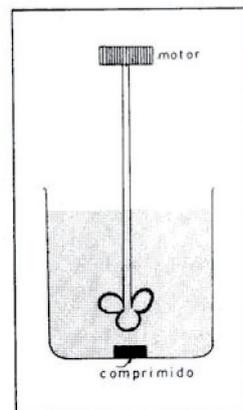


Figura 1-7. El vaso de Levy

El primer test oficial de disolución para formas sólidas de dosificación fue incorporado en la USP 18 (1970) y consistía en un canastillo rotatorio, similar al que se utiliza hoy en día (Figura 1-8). En 1975, la USP comenzó a desarrollar calibradores para test de disolución y en 1978 propuso dos de ellos: comprimidos de Prednisona (desintegrables) y de Ácido Salicílico (no desintegrables).

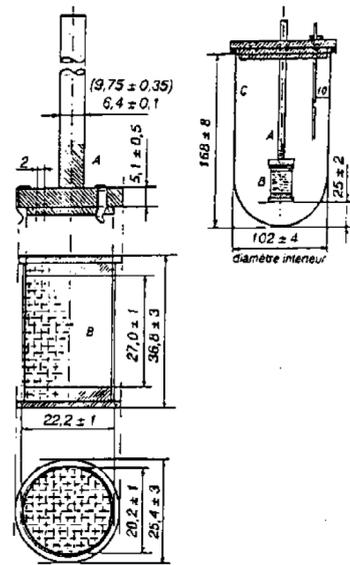


Figura 1-8. El canastillo rotatorio

Debido al creciente interés en los tópicos de disolución y absorción gastrointestinal se produjo una explosión en el número de monografías con requerimientos de disolución en las siguientes ediciones de la USP/NF. En 1978 apareció el método de paleta (aparato 2, ver Figura 1-9), mientras que recién en 1985 se publicó un capítulo general llamado “Drug Release” en la USP 21. Para 1990, había 23 monografías para formas farmacéuticas de liberación modificada en USP 22-NF 18, y en 1997 aparecieron las guías de la FDA para disolución de formas sólidas orales (de liberación inmediata, modificada y prolongada) que aún permanecen vigentes (FDA/CDER, 1997a; FDA/CDER, 1997c; FDA/CDER, 1997b).

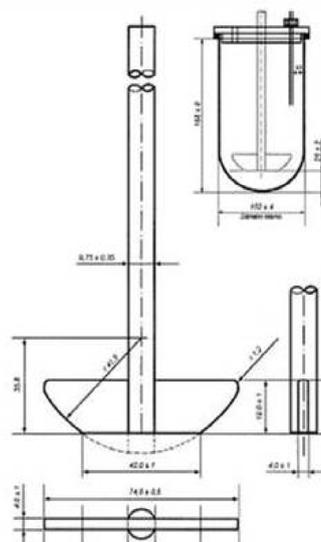


Figura 1-9. El aparato 2: paleta

Las pruebas de disolución como hoy las conocemos son métodos de control *in vitro* que permiten evaluar las características de liberación de un fármaco desde su forma farmacéutica a un medio de disolución apropiado, en condiciones experimentales cuidadosamente estandarizadas (Arancibia et al., 1992). Para el control de calidad de productos orales de liberación inmediata las farmacopeas indican, en las monografías correspondientes, las condiciones en las que se debe realizar el “Test de Disolución”: aparato, medio, volumen, temperatura, agitación, tiempo de muestreo y porcentaje disuelto. Bajo dichas condiciones, se ensayan seis unidades del producto en cuestión y, al tiempo especificado, cada una de ellas debe haber superado cierto porcentaje de disolución. Sin embargo, una única determinación (único tiempo de muestreo) no permite caracterizar a la forma farmacéutica, y por lo tanto resulta de interés evaluar y comparar “perfiles” de disolución: registros del porcentaje disuelto (respecto al valor declarado) en función del tiempo (Shah et al., 1998).

La obtención y comparación de perfiles es una metodología aplicable con numerosos objetivos, entre ellos:

- a. servir como guía para el desarrollo de formas farmacéuticas orales;
- b. monitorear la calidad, la consistencia y la estabilidad de dichas formulaciones;
- c. establecer las especificaciones finales de disolución para una forma farmacéutica dada;
- d. predecir la absorción *in vivo* del principio activo, mediante el establecimiento de correlaciones *in vitro/in vivo* que permiten reducir costos y acelerar el desarrollo de productos farmacéuticos, además de evitar la realización de estudios de BD/BE en voluntarios humanos;
- e. establecer la similitud de dos productos farmacéuticos, por ejemplo:
  - productos conteniendo el mismo principio activo, en igual dosis y forma farmacéutica, pero provenientes de distintos laboratorios (es decir, potenciales equivalentes farmacéuticos);
  - productos del mismo productor que han sufrido algún cambio posterior a su aprobación: escalado, cambio de composición, de sitio de producción, de equipamiento, etcétera.

En las situaciones descritas en los incisos d. y e. se requiere de la obtención, pero más que nada de la comparación, de los perfiles de disolución. En consonancia con el aumento de relevancia de los estudios de disolución *in vitro* de productos farmacéuticos –al punto de permitir reemplazar a los estudios *in vivo* en ciertas circunstancias (FDA/CDER, 2000)– aumentó también la discusión acerca de los métodos empleados para comparar dichos datos, como asimismo acerca de qué criterio de similitud/no similitud aplicar.

En la década del 90, aparecieron en la literatura científica numerosas propuestas de métodos útiles para la comparación de perfiles de disolución (Shah et al., 1987; Moore & Flanner, 1996; Polli et al., 1996; Sathe et al., 1996; Tsong et al., 1996; Chow & Ki, 1997). En la segunda parte del Capítulo 5 (sección 5.2) se analizan en profundidad los diversos métodos existentes para la comparación de perfiles de disolución.

## Sistema de clasificación biofarmacéutica y las bioexenciones

La absorción sistémica de la mayoría de los medicamentos consiste en una sucesión de procesos, cada uno de los cuales se produce a una velocidad determinada. Estos procesos incluyen: la desintegración del producto con la consiguiente liberación del principio activo, la disolución de dicho principio activo en el medio acuoso gastrointestinal y la absorción a través de las membranas celulares hacia la circulación sistémica. Los dos primeros procesos suelen agruparse en uno solo denominado “liberación (L)”, seguido entonces por la “absorción (A)”. Una vez en la circulación sistémica, el fármaco sufrirá “distribución (D)” a todos los órganos y tejidos irrigados, “metabolismo (M)” en los órganos destinados a tal fin y, por último, “eliminación (E)” del organismo. El conjunto de estos procesos, denominado abreviadamente LADME, es lo que determina el comportamiento farmacocinético característico de cada droga (Shargel & Yu, 1993).

En el caso de procesos consecutivos, como pueden ser los de liberación y absorción, si el primero es más lento que el segundo, la velocidad e incluso el orden del segundo quedan supeditados a los del primero. Así, por ejemplo, si la liberación del fármaco discurre a menor velocidad que la velocidad a la que es capaz de absorberse una vez disuelto, la velocidad con la que ese fármaco aparecerá en plasma es igual a la velocidad con la que se libera de la forma farmacéutica y, aparentemente, el fármaco se absorbe a una velocidad determinada por la velocidad de liberación. Se dice, en ese caso, que la liberación es el factor limitante de la absorción (Doménech Berrozpe et al., 1997).

De acuerdo al Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS) todas las drogas se encuadran en una de cuatro categorías (I, II, III o IV), según sean altamente solubles y altamente permeables, poco solubles y altamente permeables, muy solubles y poco permeables, o poco solubles y poco permeables, respectivamente (Figura 1-10).

En 2000 aparece el concepto de “bioexenciones” para denominar a aquellos productos que podrían ser eximidos de realizar los estudios de BE *in vivo*. En su planteo original, las bioexenciones podían ser permitidas para aquellos productos sólidos de liberación inmediata, destinados a ser administrados por vía oral, conteniendo drogas pertenecientes a la clase I del BCS, si se cumplieran los siguientes requisitos: el fármaco no posee estrecho margen terapéutico (FEMT) y resulta estable en el tracto gastrointestinal, los excipientes no afectan la velocidad ni el grado de absorción, y el producto no ha sido diseñado para su absorción en la cavidad bucal. En esos casos, los perfiles de disolución *in vitro* podrían reemplazar a los estudios de BE *in vivo* (FDA/CDER, 2000).

Una intensa discusión se ha desarrollado recientemente acerca de la posibilidad de ampliar los criterios de elegibilidad de bioexenciones a ciertas drogas de las clases II y III del BCS (Graffner, 2006; Tubic-Grozdanis et al., 2008; Tsume & Amidon), incluyendo al Ibuprofeno y a otros antiinflamatorios no esteroides (AINES) (Yazdanian et al., 2004; Potthast et al., 2005) y Ranitida (Kortejarvi et al., 2005). La OMS, incluso, presentó una propuesta de flexibilización para aquellos productos que contengan principios activos de las clases II y III (para la clase III dicha propuesta ya se aprobó) del BCS (WHO, 2010), y la autoridad sanitaria sueca (Swedish MPA) ha aprobado bioexenciones para productos conteniendo Ibuprofeno, Paracetamol y Prednisolona, entre otros (Graffner, 2006).

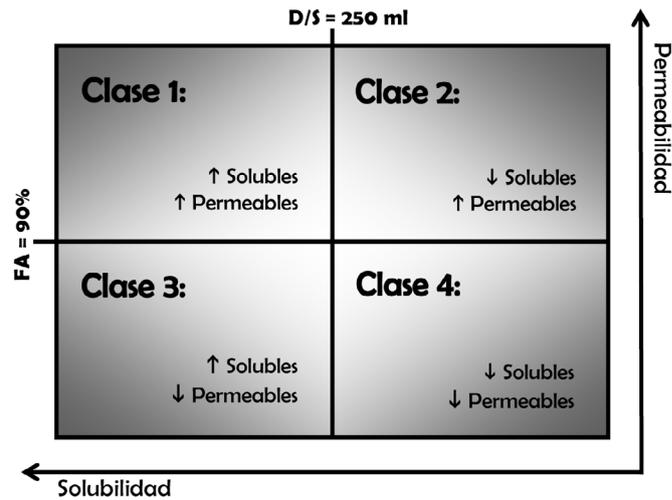


Figura 1-10. Representación esquemática del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS). FA: fracción absorbida. D/S: relación dosis/solubilidad

## El escenario en nuestro país

Debido a que no existe la protección de las patentes, en el mercado argentino siempre coexistieron los productos innovadores con los productos similares, es decir, la competencia entre las empresas para cada principio activo. Por lo general, la diferenciación se produjo a partir de las diferentes marcas comerciales de los productos (o del nombre del laboratorio productor) mientras que el Estado ha recurrido al procedimiento de las licitaciones para abastecer sus necesidades por concurso de precios (Giarovich, 2001). Por lo tanto, si bien nunca se produjo la situación de intercambio forzado u obligatorio que se describió para otros países, la posibilidad de intercambio entre marcas existió siempre y fue recién a partir de 1999 que en nuestro país se comenzó a hablar de bioequivalencia.

La disposición ANMAT 3185/99 sentó las bases de un Programa de Equivalencia entre Medicamentos, estipulando requerimientos de estudios de BD y BE según un criterio de riesgo sanitario de las drogas a analizarse (calculado según una ecuación sencilla) y de un cronograma operativo de realización de los mismos. Resoluciones posteriores fueron agregando drogas a dicho cronograma (los antirretrovirales, por ejemplo, por la resolución 40/01, que luego fue derogada y reemplazada por la 46/03).

También aparecieron disposiciones estableciendo qué producto debía emplearse como referencia en los estudios de BE de cada droga. Entre ellas, la disposición 2807/02 establece a los productos Tegretol y Trileptal (ambos de Lab. Novartis Argentina) como referencia para los estudios de BE de comprimidos de CBZ y de OxCBZ respectivamente, mientras que la disposición 5318/02 define al producto Phenytoin Sodium Prompt cápsulas de 100 mg (IVAX Pharms, EE.UU.) como referencia para las cápsulas de liberación inmediata de PHT sódica.

En 2009 se sumaron dos importantes disposiciones: la 556/09, que aprobó la Guía para aplicar en los Cambios de Escala y Cambios Posteriores al Registro de Medicamentos Sujetos a Demostración de Bioequivalencia (Normas SUPAC- BO 26/02/09); y la 758/09, que estableció los criterios para eximir de la realización de estudios de BE

a determinados medicamentos sólidos orales de liberación inmediata (bioexenciones). Ésta última fija bioexenciones para productos conteniendo principios activos de riesgo intermedio (según la clasificación original establecida en la disposición 3185/99) acorde a los siguientes criterios:

- en base al BCS: cuando dichos principios activos pertenezcan a las clases I o III del BCS se considerarán bioexenciones en función de los resultados de ensayos de disolución;
- en base a un criterio “proporcional” de similitud: cuando la dosis más alta de un producto hubiere demostrado equivalencia *in vivo* o *in vitro* con el producto de referencia correspondiente, los productos de menor dosis con composición proporcionalmente similar podrán ser bioeximidos en función de los resultados de ensayos de disolución.

Recientemente, la disposición 3113/10 incorporó los principios activos Lamotrigina y Topiramato a la lista de aquellos a los que se exigen estudios de BE.

Por último, en mayo de 2011 apareció el “Listado de Medicamentos de Alto Riesgo e Inmunosupresores con Resultados Aceptables de Biodisponibilidad y Bioequivalencia” (ANMAT, 2011), en el que se incluyen los productos de CBZ, PHT y OxCBZ (entre otras drogas) con resultados aceptables de estudios de BE. Entre dichos productos se encuentran la mayoría de los utilizados en el presente trabajo y para los que, por lo tanto, podría “asumirse” bioequivalencia en base a dicho listado oficial.

## Hipótesis y objetivos del trabajo

### Hipótesis

- Los estudios de bioequivalencia individual (BEI), si bien brindan mayor información que los de bioequivalencia media (BEM) al replicar la administración de los productos en los voluntarios, en la mayoría de los casos no presentan ventajas significativas que justifiquen su aplicación para la evaluación comparativa de la biodisponibilidad (BD) de dos medicamentos.
- Ninguna prueba experimental puede asegurar idéntico desempeño terapéutico de dos medicamentos en la práctica clínica, por lo tanto no deben realizarse intercambios cuando el riesgo asociado es elevado, como en el caso del intercambio de fármacos antiepilépticos (AEDs) en pacientes estabilizados.
- El principio de transitividad, inevitablemente asociado a la prueba de bioequivalencia (BE) “Test (múltiples productos) vs. Referencia (un mismo producto)” no tiene validez, y por lo tanto no debería asumirse como cierto.
- De los distintos métodos posibles para comparar perfiles de disolución, el factor de similitud  $f_2$  ofrece la mejor performance cuando se trata de comparar diferentes productos de un mismo principio activo (distintas marcas), si bien por sus limitaciones es conveniente que se complemente con otro método.
- La saliva es un fluido biológico apto y adecuado para su monitoreo en estudios de biodisponibilidad relativa (BDR) que, a diferencia de la sangre venosa comúnmente utilizada, refleja la fracción de droga libre farmacológicamente activa en el organismo.

### Objetivos

*El objetivo general del presente trabajo de tesis fue contribuir en el campo de la salud pública a dar respuesta a los múltiples interrogantes planteados respecto de las garantías que ofrecen las actuales normativas en relación con la intercambiabilidad de medicamentos. Garantizar la seguridad de dichos intercambios y pautar las condiciones y/o limitaciones de su aplicación sería, no sólo un importante logro a nivel científico, sino un invaluable aporte a la sociedad que se ve directamente afectada, tanto por las falencias como por los aciertos del sistema de salud.*

Para ello se emplearon diversas metodologías, descriptas a continuación bajo la forma de objetivos parciales:

1. Control de calidad *in vitro* de todos los medicamentos empleados en los ensayos descriptos en los restantes capítulos [Capítulo 2].

2. Estudio de la influencia del diseño experimental de los estudios de bioequivalencia (BE) sobre los resultados de los mismos: cómo influye el diseño estadístico a la hora de tomar la decisión BE/No BE entre diferentes formulaciones de un mismo medicamento [Capítulo 3].

3. Evaluación de la capacidad de los estudios clásicos de BE, exigidos por los entes regulatorios (BEM), para garantizar la intercambiabilidad de dos formulaciones conteniendo el mismo principio activo en la misma dosis [Capítulo 4].

4. Análisis de una de las consecuencias de los estudios de BE: el problema de la transitividad. Es decir, qué efecto tiene sobre la intercambiabilidad de medicamentos el hecho de que todos los productos presentes en el mercado con un determinado principio activo hayan demostrado su BE respecto a un mismo producto de referencia pero no entre ellos [Capítulo 5].

5. Análisis del desempeño de diversos métodos de comparación de perfiles de disolución *in vitro*. Por ello se trabajó con drogas clase II del BCS (CBZ, PHT y OxCBZ), para las cuales se espera que la disolución sea la etapa limitante en el proceso de absorción. El análisis se orientó al caso de comparaciones entre productos de distintas marcas con igual principio activo, como herramienta predictiva de los resultados *in vivo* (caso de las bioexenciones) [Capítulo 5].

6. Estudio del desempeño y la idoneidad de la saliva como fluido biológico de análisis en estudios de biodisponibilidad relativa (BDR) [Capítulo 6].

---

---

# ■ Capítulo 2

## Control de calidad de medicamentos





La calidad puede definirse como la capacidad de un producto o de un servicio de satisfacer las necesidades del usuario. Para obtener una calidad duradera, es necesario establecer un sistema de garantía de calidad, el que se define como “el establecimiento de un conjunto adecuado de disposiciones preestablecidas y sistemáticas destinadas a dar confianza en la obtención de la calidad requerida” (Cohen & Pradeau, 1998). Sin embargo, aun la aplicación estricta de un sistema adecuado de garantía de calidad no exime del control al producto terminado, ya que a pesar de todas las precauciones que se puedan tomar a nivel de la fabricación o la preparación de los productos farmacéuticos, los pacientes y los profesionales de la salud no están a salvo de los incidentes que se presentan en las distintas etapas del proceso.

Es por ello que el presente trabajo de tesis comienza con el control de calidad de los productos que se emplean a lo largo del estudio. En los Capítulos 3 y 4 se analizan los desempeños *in vivo* de productos conteniendo los principios activos (pa) Fenitoína (PHT) y Carbamazepina (CBZ), respectivamente, y en el Capítulo 5 se evalúa el desempeño *in vitro* de éstos y otros productos mediante el análisis de perfiles de disolución. Sin embargo, los resultados arrojados por dichos ensayos carecerían de fundamento si no estuvieran respaldados por los que a continuación se presentan.

Es decir, en primer lugar se debe asegurar que los medicamentos empleados cumplan con los requisitos mínimos de calidad antes de poder sacar otras conclusiones. Pese a esto, en la literatura científica rara vez se presentan los resultados de ensayos tales como la valoración o la uniformidad de unidades de dosificación de los medicamentos que se administran, por ejemplo, a pacientes o voluntarios, aunque dichos resultados, de no ser aceptables, podrían invalidar todas las conclusiones posteriores. Por ejemplo, la Disposición ANMAT 3185/99 establece que “el contenido de droga activa del producto problema con respecto al producto de referencia no debe diferir en más de un 5%. Si ello ocurriera, esta diferencia debe ser tenida en cuenta en el cálculo de los datos de biodisponibilidad para facilitar la comparación de ambos productos farmacéuticos”.

Para definir qué ensayos realizar a fin de conocer la calidad de un producto determinado se debe recurrir a las Farmacopeas. Éstas brindan patrones públicos, especificaciones y métodos de ensayo que los analistas independientes pueden utilizar en el control de calidad (Keitel, 2011). Allí se definen las características que debe poseer un producto y se establecen los ensayos que permiten demostrar que el mismo satisface los requisitos mínimos de calidad exigidos por la Autoridad Sanitaria. Dichas normas se aplican en cualquier momento de la vida útil del producto, desde la elaboración hasta el vencimiento, y los resultados obtenidos se aplican exclusivamente al lote analizado (FA 7, 2003).

El esquema básico de un protocolo completo de control de calidad para un producto terminado de una formulación sólida de administración oral (únicas formas farmacéuticas estudiadas en el presente trabajo) incluiría, sin contar los controles higiénicos microbiológicos, los ensayos de identificación, valoración, uniformidad de unidades de dosificación (UUD) y el Test de Disolución. Estos son los ensayos fisicoquímicos fundamentales, aunque no los únicos que se pueden aplicar a estas formas farmacéuticas.

El ensayo de identificación, en el caso de productos terminados, tiene por objeto confirmar que dicho producto se ajusta a la descripción dada en el rótulo del envase, y no está destinado a proporcionar una confirmación completa de la estructura química o composición de dicho producto. Luego, mediante la valoración del medicamento, se busca determinar la cantidad media del pa presente en el lote analizado. Numerosas técnicas analíticas son aplicables a este objetivo, siendo la cromatografía, la espectrofotometría y la volumetría las más comúnmente utilizadas. Debido a que el resultado representa el contenido *promedio* en el lote, se realiza a continuación el ensayo de UUD, de manera de analizar el contenido en cada una de las unidades que verdaderamente se le administran al paciente. Por último, se realiza el ensayo de disolución, de manera de determinar el comportamiento de la disolución del pa contenido en la forma farmacéutica sólida, estableciendo un criterio de evaluación de las propiedades físicas y biofarmacéuticas del producto (FA 7, 2003). En las secciones correspondientes se brinda una breve descripción junto con las especificaciones aplicadas en cada uno de estos ensayos.

Si bien la calidad de un producto puede desviarse de los estándares requeridos, cuando se realiza el control de la misma se debe estar seguro de que la calidad del análisis en sí mismo cumple con los estándares correspondientes (Watson, 2005). Los métodos y los reactivos descritos en las Farmacopeas –libros oficiales– deben ser siempre los de primera elección, y pueden aplicarse directamente como están descritos. Sin embargo, también es posible utilizar otros métodos con el mismo objetivo, y en ese caso la nueva técnica o sus modificaciones sencillas deben validarse. En caso de litigio, el método de la Farmacopea es la única norma legal (Cohen & Pradeau, 1998).

Validar un método analítico es demostrar que dicho método es idóneo para el uso propuesto. Las características de validación más comunes son la exactitud, precisión, especificidad, límites de detección y cuantificación, linealidad, rango y robustez, si bien no todas deben ser determinadas para todos los tipos de ensayos (FDA/CDER, 2000). Los tres ensayos de valoración realizados en el presente capítulo (para productos de Carbamazepina, Oxcarbazepina y Fenitoína) utilizan metodologías no oficiales, por lo que las mismas debieron ser validadas. En el caso de los comprimidos de CBZ, el proceso de validación fue realizado previamente por nuestro grupo de trabajo y por lo tanto se presenta la cita correspondiente, mientras que para los dos productos restantes se incluyen los resultados de la validación.

Por último, resta considerar que los resultados de un análisis químico (y de cualquier medida cuantitativa) se suelen disponer como un conjunto de números representando repetidas determinaciones realizadas bajo idénticas condiciones. Dichos datos brutos (números que pueden corresponder a porcentaje de pureza, normalidad, peso de compuesto, etc.) deben ser interpretados por el analista, de manera de establecer la *mejor estimación* del valor “verdadero” de la cantidad que se está midiendo así como la *confianza* que merece dicho estimador (Connors, 1981). Es por ello que todos los resultados incluidos en el este capítulo, y en los siguientes, se analizan e informan mediante las técnicas y los parámetros estadísticos adecuados para su correcta interpretación.

## Ensayos realizados

### 2.1 Carbamazepina (CBZ)

#### Valoración y uniformidad de unidades de dosificación

##### ● Diseño del estudio

A los comprimidos de los cuatro productos analizados en voluntarios sanos (ver Capítulo 4), más un quinto producto no ensayado *in vivo*, se les realizó el control de contenido (Valoración) y de uniformidad de contenido, para verificar que cualquier diferencia que pudiera encontrarse en sus desempeños tanto *in vivo* como *in vitro* (ver a continuación el ensayo de Disolución) no se debiera a un problema de contenido.

Los productos evaluados, todos comprimidos de 200 mg, fueron:

- producto A\* (*Referencia*): Tegretol, Lab. Novartis Argentina SA (Lote: 337621, Vto.: 05/2008)
- producto B: Carbamazepina Denver Farma, Lab. Denver Farma SA (Lote: 50105, Vto.: 01/2008)
- producto C: Carbamazepina Bouzen, Lab. Bouzen SACIFIAF (Lote: 0243, Vto.: 02/2010)
- producto D: CMP 200, Lab. Klonal SRL (Lote: 1637, Vto.: 12/2008)
- producto E: Elebe, Lab. Medipharma SA (Lote: 133, Vto.: 08/2008)

Si bien en todos los casos se intentó trabajar con los mismos lotes de cada uno de los productos, lo que fue posible en el caso de los productos B, C y D, para el producto A no fue posible evaluar *in vitro* el mismo lote ensayado en voluntarios sanos (y pacientes). Los ensayos *in vivo* fueron con el lote 343362, Vto.: 10/08.

El ensayo de uniformidad de unidades de dosificación (UUD) se llevó a cabo según la metodología de "Uniformidad por Peso". Los comprimidos analizados cumplían con las condiciones establecidas por la USP (USP 31/NF 24, 2008) para ser analizados por peso: todos contenían más de 25 mg y la dosis representaba más del 25% del peso de los comprimidos.

Para el mismo ensayo, la Farmacopea Argentina (FA 7, 2003) fija condiciones más estrictas: la dosis debe ser mayor a 50 mg y representar más del 50% del peso de los comprimidos. Los productos A y B cumplían con esta especificación, mientras que los productos C y D tenían un peso medio mayor a 400 mg (el producto E estaba en el límite, algunos comprimidos pesaban más y otros menos de 400 mg), con lo que la dosis (200 mg en todos los casos) representaba menos del 50% del peso (pero siempre más del 25%).

#### Método analítico

Espectrofotometría UV-Visible para la determinación de CBZ (*ver descripción del espectrofotómetro en el Anexo I*). No se realizó la validación del método ya que éste había sido validado en un trabajo anterior de nuestro grupo de trabajo (Volonté et al., 2004).

● **Condiciones analíticas y preparación de la solución de referencia**

El medio utilizado fue etanol 96° y la longitud de onda elegida para la cuantificación fue 285 nm. Cada día de trabajo se preparó una solución de referencia pesando con exactitud alrededor de 15 mg de CBZ sustancia de referencia (SR, título: 98,1% sdtc). La cantidad pesada se colocó en un matraz de 25 ml al que se agregaron alrededor de 15 ml de etanol 96°, se sonicó hasta disolución completa y se llevó a volumen con el mismo medio. Se realizó una dilución 1:50 también con etanol 96° y se leyó la absorbancia a 285 nm de la solución resultante.

● **Preparación de las muestras**

Se pesaron 10 comprimidos en forma individual, los que se trabajaron en un mortero de forma de obtener un pulverizado homogéneo. A partir de allí, y de acuerdo al valor de peso medio (PM) obtenido, se pesaron cuatro alícuotas (cuatuplicado) equivalentes a 60 mg de CBZ, las que se colocaron en erlenmeyers con aproximadamente 25 ml de etanol 96° y se llevaron a ebullición, durante 3 minutos a reflujo.

Una vez enfriadas, las muestras se agitaron en una platina magnética durante 10 minutos y su contenido se trasvasó a matraces de 100 ml que se llevaron a volumen con el mismo medio. A partir de allí se midieron alícuotas de aproximadamente 10 ml, se centrifugaron durante 10 minutos a 3500 rpm y del sobrenadante se hizo una dilución 1:50 con etanol 96°. Se leyó la absorbancia de las soluciones resultantes a 285 nm.

## Test y perfiles de disolución

Se determinaron los perfiles de disolución de los cinco productos ensayados en voluntarios sanos en diferentes medios de disolución. En todos los casos se trabajó con 12 comprimidos (*ver descripción del equipo de disolución en el Anexo I*).

Como solamente la USP codifica un ensayo de disolución para comprimidos conteniendo CBZ, se utilizaron las condiciones experimentales allí descriptas (medio, volumen, aparato, agitación). Luego, se ensayó también la disolución de los comprimidos en los medios sugeridos por la OMS: buffer pH 1,2 – 4,5 y 6,8 (WHO, 2006). En cada caso, se mantuvieron las condiciones de volumen, aparato y agitación, y simplemente se cambió el medio utilizado.

## Método analítico

Espectrofotometría UV-Visible para la determinación de CBZ en las muestras extraídas del equipo de disolución con detección a 285 nm (*ver descripción del espectrofotómetro en el Anexo I*).

● **Condiciones experimentales**

Aparato: Aparato 2 USP, paletas

Temperatura: 37,0 ± 0,5 °C

Agitación: 75 rpm

Muestreo: 5 ml, sin reposición

Tiempos de muestreo: 10, 15, 20, 40, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos

Medios ensayados (900 ml en todos los casos):

- USP 31: agua conteniendo 1% de Lauril Sulfato de Sodio (LSNa);
- OMS pH 1,2: preparado a partir de HCl concentrado (12 M) mediante dilución 1:200 con agua destilada;
- OMS pH 4,5: preparado a partir de  $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (3 g/L) +  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (1,681 g/L) hasta pH  $4,50 \pm 0,05$ ;
- OMS pH 6,8: preparado a partir de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (6,805 g/L) + NaOH (0,896 g/L) hasta pH  $6,80 \pm 0,05$ .

#### ● Preparación de la solución de referencia y de las muestras

Cada día de trabajo se preparó una solución de referencia pesando con exactitud alrededor de 25 mg de CBZ (SR, título: 98,1% sdtc). La cantidad pesada se colocó en un matraz de 50 ml y se llevó a volumen con metanol. A partir de allí se realizó una dilución 1:50 con el medio de disolución correspondiente a ese día de trabajo, y se leyó la absorbancia a 285 nm de la solución resultante.

Las muestras, una vez extraídas del equipo de disolución a los tiempos correspondientes, se centrifugaron durante 10 minutos a 3500 rpm y a partir del sobrenadante se realizó una dilución adecuada de manera de obtener valores de absorbancia cercanos al valor de la solución de referencia. En todos los casos, las diluciones se hicieron con el medio de disolución correspondiente. Por último, se leyó la absorbancia de dichas soluciones a 285 nm.

#### ● Tolerancia (Test de Disolución)

Se aplican los criterios de la farmacopea USP 31 (USP 31/NF 24, 2008) para comprimidos conteniendo 200 mg.

##### ■ Test 2 - Tiempo y Tolerancia

**Primera Etapa (E1):** se ensayan 6 unidades. Entre el 45% y el 75% de la cantidad declarada de CBZ se disuelve en 15 minutos, y no menos del 75% (Q) de la cantidad declarada se disuelve en 60 minutos.

**Segunda Etapa (E2):** se ensayan otras 6 unidades. El promedio de las 12 unidades (E1+E2) debe encontrarse entre el 45% y el 75% de la cantidad declarada de CBZ a los 15 minutos, y no debe ser menor del 75% a los 60 minutos. Por otro lado, a los 15 minutos ninguna unidad debe desviarse más del 5% del rango establecido, y a los 60 minutos ninguna unidad debe ser menor a  $Q - 5\%$ .

**Tercera Etapa (E3):** se ensayan 12 unidades más. El promedio de las 24 unidades (E1+E2+E3) debe estar entre el 45% y el 75% de la cantidad declarada de CBZ a los 15 minutos, y no debe ser menor del 75% a los 60 minutos. Por otro lado, a los 15 minutos ninguna unidad debe desviarse más del 10% del rango establecido, y no más de 2 de las 24 unidades deben desviarse más del 5% de dicho rango. A los 60 minutos, ninguna unidad puede ser menor a  $Q - 10\%$ , y no más de 2 de las 24 deben ser menores a  $Q - 5\%$ .

##### ■ Test 3 - Tiempo y Tolerancia

**Primera Etapa (E1):** se ensayan 6 unidades. Entre el 60% y el 85% de la cantidad declarada de CBZ se disuelve en 15 minutos, y no menos del 75% (Q) se disuelve en 60 minutos.

**Segunda Etapa (E2):** se ensayan otras 6 unidades. El promedio de las 12 unidades (E1+E2) debe encontrarse entre el 60% y el 85% de la cantidad declarada de CBZ a los

15 minutos, y no debe ser menor del 75% a los 60 minutos. A los 15 minutos ninguna unidad debe desviarse más del 5% del rango establecido, y a los 60 minutos ninguna unidad debe ser menor a  $Q - 5\%$ .

**Tercera Etapa (E3):** se ensayan 12 unidades más. El promedio de las 24 unidades (E1+E2+E3) debe estar entre el 60% y el 85% de la cantidad declarada de CBZ a los 15 minutos, y no debe ser menor del 75% a los 60 minutos. A los 15 minutos ninguna unidad debe desviarse más del 10% del rango establecido, y no más de 2 de las 24 unidades deben desviarse más del 5% de dicho rango. A los 60 minutos, ninguna unidad puede ser menor a  $Q - 10\%$ , y no más de 2 de las 24 deben ser menores a  $Q - 5\%$ .

## Resultados y discusión

### ● Ensayo de valoración

La Tabla 2-1 presenta en forma resumida los resultados del ensayo de valoración de las cinco especialidades medicinales analizadas. Como la especificación de farmacopea (USP 31/NF 24, 2008) para comprimidos de CBZ establece que su contenido debe encontrarse dentro de 92-108% sobre valor declarado (SVD), de la Tabla 2-1 se desprende que todos los productos analizados cumplen con este ensayo.

**Tabla 2-1.** Resultados del ensayo de valoración, expresados como % Sobre Valor Declarado (% SVD). Se presentan los valores obtenidos para cada una de las cuatro alícuotas ensayadas de cada producto (producto A\* -referencia, Tegretol- B, C, D y E), su media y su coeficiente de variación (CV%)

	Producto A*	Producto B	Producto C	Producto D	Producto E
Alícuota 1	98,66	101,09	102,63	99,17	98,03
Alícuota 2	97,70	100,61	100,98	98,96	98,28
Alícuota 3	98,71	100,82	102,34	99,87	97,44
Alícuota 4	97,49	99,97	101,27	97,97	99,16
Media	<b>98,14</b>	<b>100,62</b>	<b>101,81</b>	<b>98,99</b>	<b>98,35</b>
CV%	<b>0,65</b>	<b>0,47</b>	<b>0,78</b>	<b>0,79</b>	<b>0,96</b>

### ● Ensayo de uniformidad de unidades de dosificación (UUD)

La Tabla 2-2 presenta los resultados del ensayo de UUD (realizado por peso, en todos los casos) de las cinco especialidades medicinales analizadas.

**Tabla 2-2.** Resultados del ensayo de UUD, expresados como % Sobre Valor Declarado (% SVD). Se presentan los rangos de valores obtenidos para los 10 comprimidos ensayados de cada producto (producto A\* -referencia, Tegretol- B, C, D y E), la media y el coeficiente de variación (CV%)

	Producto A*	Producto B	Producto C	Producto D	Producto E
Rango	<b>[97,09 - 99,66]</b>	<b>[97,74 - 103,60]</b>	<b>[98,69 - 103,31]</b>	<b>[98,66 - 99,79]</b>	<b>[94,23 - 105,77]</b>
Media	98,37	100,84	101,73	99,02	97,92
CV%	<b>0,96</b>	<b>2,26</b>	<b>1,44</b>	<b>0,40</b>	<b>4,34</b>

Como el promedio de los límites de la definición de potencia (92-108% SVD) es 100%, el criterio de aceptación para el ensayo de UUD según la FA 7 establece que, para cumplir este ensayo en una primer etapa, los 10 comprimidos analizados deben encontrarse dentro del rango 85-115% SVD y el CV debe ser  $\leq 6\%$ . Siguiendo este criterio, todos los productos analizados cumplen el ensayo.

Por otro lado, para conocer si las especialidades cumplen con el ensayo de UUD, según los criterios establecidos por la USP 31 <905>, es necesario el cálculo del “Valor de Aceptación” (VA), el cual se calcula de acuerdo a la siguiente expresión:

$$VA = |VR - M| + K \cdot S$$

■ Ecuación 2-1

VR = valor de referencia

a. Si  $98,5\% \leq M \leq 101,5\%$ , VR = M y por lo tanto, VA = K.S

b. Si  $M < 98,5\%$ , VR = 98,5% y por lo tanto, VA = (98,5 - M) + K.S

c. Si  $M > 101,5\%$ , VR = 101,5% y por lo tanto, VA = (M - 101,5) + K.S

M = media del contenido individual expresado como % SVD

K = constante de aceptabilidad (si N = 10, K = 2,4)

N = número de unidades testeadas (10)

S = desviación estándar

Como se desprende de la Tabla 2-2, los productos A y E corresponden al inciso b. de la especificación ( $M < 98,5\%$ ), el producto C al inciso c. ( $M > 101,5\%$ ) y los productos D y B al inciso a. ( $98,5\% \leq M \leq 101,5\%$ ). Haciendo los cálculos correspondientes, los valores de VA encontrados fueron: 2,62 - 5,46 - 3,83 - 0,95 y 10,35 para los productos A, B, C, D y E, respectivamente. Por lo tanto, las especialidades analizadas también cumplieron con el ensayo de UDD de acuerdo a los criterios de la USP <905>, ya que los VA son  $\leq$  a L1 = 15 en todos los casos.

### ● Test de Disolución

La Tabla 2-3 presenta los datos obtenidos para cada uno de los cinco productos ensayados. Se muestran los % Disueltos a los 15 y 60 minutos, en los cuatro medios de disolución ensayados.

■ **Tabla 2-3.** Resultados del Test de Disolución en cada uno de los cuatro medios empleados, expresados como % Disuelto (SVD). Se presenta el rango (de los primeros seis comprimidos y total), la media (n = 12) y el CV%

		Producto A*	Producto B	Producto C	Producto D	Producto E
<b>LSNa1%</b>						
15 min	Rango (6)	41,70 - 59,51	33,17 - 42,82	58,66 - 73,16	75,65 - 86,59	72,09 - 88,51
	Rango (12)	41,70 - 59,51	33,17 - 43,29	57,18 - 76,04	75,65 - 86,59	70,61 - 88,51
	Media	49,19	38,16	66,99	81,63	80,65
	CV%	12,07	8,53	9,22	4,19	8,64
60 min	Rango (6)	72,66 - 94,20	71,38 - 83,24	96,28 - 102,1	91,47 - 102,4	94,72 - 107,8
	Rango (12)	72,66 - 94,20	71,38 - 85,92	95,09 - 104,5	91,47 - 102,4	87,66 - 107,8
	Media	85,96	79,19	99,57	96,79	98,62
	CV%	7,40	5,01	2,68	3,30	6,22

<b>pH 1,2</b>						
	<b>Rango (6)</b>	21,39 - 24,99	2,68 - 4,04	14,29 - 44,0	39,65 - 41,23	8,51 - 12,33
<b>15</b>	<b>Rango (12)</b>	21,39 - 27,90	1,43 - 4,04	14,29 - 44,0	39,65 - 50,45	6,48 - 12,33
<b>min</b>	<b>Media</b>	25,02	2,67	25,87	45,23	9,59
	<b>CV%</b>	8,45	28,73	32,93	10,61	18,49
	<b>Rango (6)</b>	51,55 - 57,07	5,56 - 8,25	77,66 - 91,47	78,62 - 82,61	60,07 - 70,12
<b>60</b>	<b>Rango (12)</b>	51,55 - 57,07	4,09 - 8,25	77,66 - 91,47	78,62 - 83,86	60,07 - 72,46
<b>min</b>	<b>Media</b>	54,75	6,13	84,84	81,70	67,20
	<b>CV%</b>	3,51	20,28	5,75	1,99	5,48
<b>pH 4,5</b>						
	<b>Rango (6)</b>	22,57 - 25,15	4,86 - 10,08	38,53 - 55,89	50,37 - 51,42	19,01 - 23,64
<b>15</b>	<b>Rango (12)</b>	22,57 - 25,15	2,98 - 10,08	36,50 - 55,89	50,08 - 51,53	19,01 - 34,08
<b>min</b>	<b>Media</b>	24,01	5,49	44,60	50,90	24,04
	<b>CV%</b>	3,64	40,40	13,49	0,84	19,40
	<b>Rango (6)</b>	52,53 - 54,78	10,10 - 16,83	85,61 - 92,28	83,96 - 86,92	69,68 - 75,81
<b>60</b>	<b>Rango (12)</b>	46,15 - 54,78	7,38 - 16,83	85,61 - 93,58	83,31 - 86,92	69,68 - 76,60
<b>min</b>	<b>Media</b>	50,49	11,05	90,42	85,51	74,41
	<b>CV%</b>	7,07	28,91	2,86	1,22	3,31
<b>pH 6,8</b>						
	<b>Rango (6)</b>	24,84 - 26,55	6,49 - 10,38	44,34 - 61,60	46,99 - 51,12	27,63 - 36,29
<b>15</b>	<b>Rango (12)</b>	24,84 - 28,36	5,56 - 17,57	43,15 - 61,60	46,99 - 51,12	27,63 - 36,75
<b>min</b>	<b>Media</b>	26,57	9,55	49,55	48,82	31,81
	<b>CV%</b>	4,29	35,97	10,57	2,60	9,74
	<b>Rango (6)</b>	55,11 - 58,13	14,32 - 19,33	88,88 - 93,06	82,87 - 88,52	71,46 - 86,66
<b>60</b>	<b>Rango (12)</b>	52,44 - 58,13	12,17 - 32,16	88,88 - 99,11	82,67 - 88,52	71,46 - 91,99
<b>min</b>	<b>Media</b>	55,42	18,98	93,37	85,67	84,52
	<b>CV%</b>	2,65	28,93	3,67	2,31	6,50

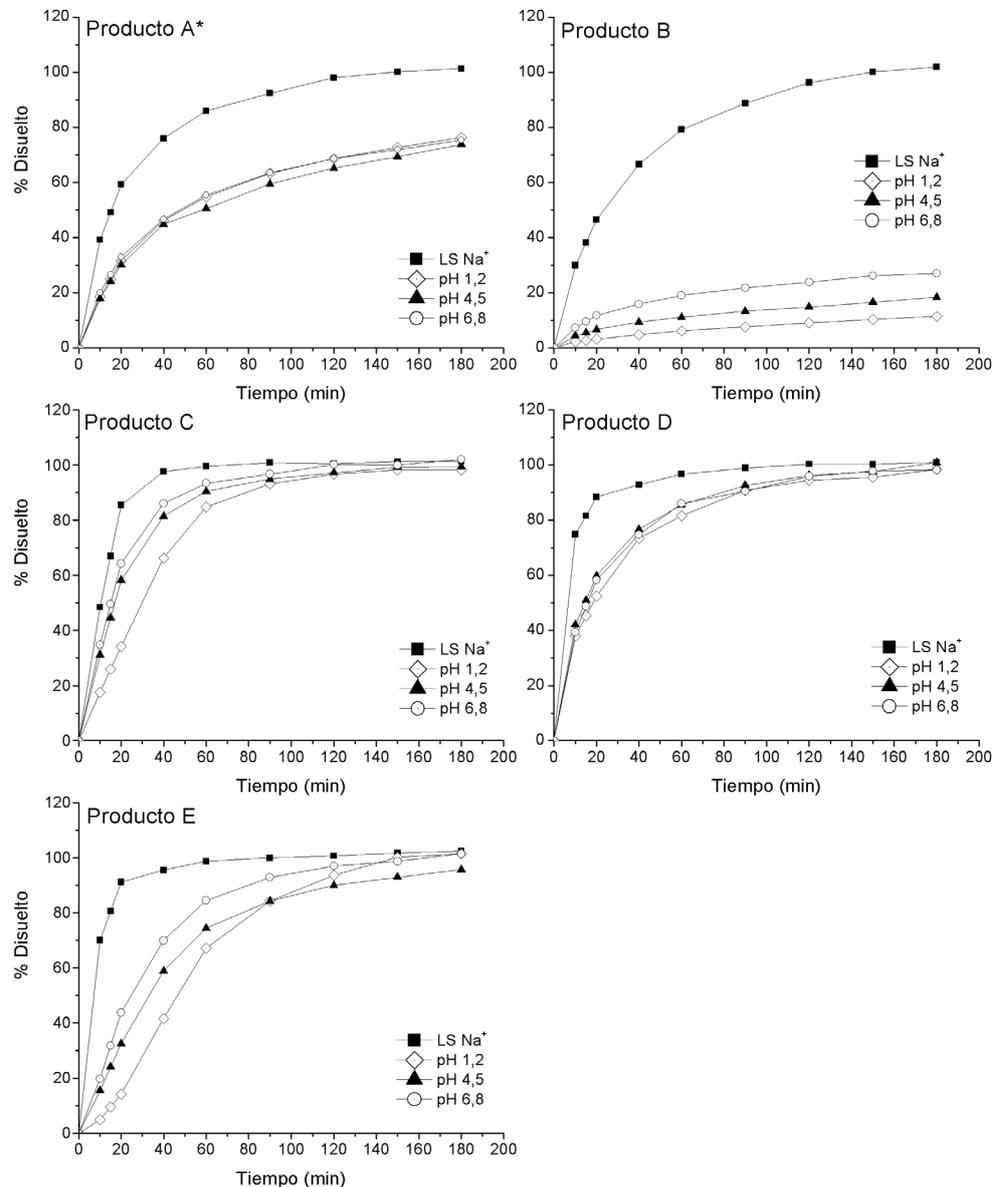
A partir de la tabla anterior puede verse que, en el medio codificado por la USP, LSNa 1%, el producto A cumple el test 2 en la segunda etapa (E2), el producto B no cumple ninguno de los dos test posibles (ni cumpliría ensayando 12 comprimidos más), el producto C cumple el test 2 en la primera etapa (E1), y los productos D y E cumplen con el test 3 en la segunda etapa (E2).

Si se intenta aplicar los mismos criterios de aceptación a los resultados obtenidos para los medios buffer, más representativos del medio interno, se observa que:

- el producto A no cumple el ensayo en ninguno de los tres buffers ensayados. Los resultados son menores respecto al LSNa 1%, pero no se modifican al variar el pH del medio;
- el producto B, que no cumplía con ninguno de los dos test en LSNa 1%, prácticamente no se disuelve en los medios buffer;
- el producto C, en medio buffer pH 6,8, cumple el test 2 en la segunda etapa (E2). Como sus % Disueltos disminuyen al disminuir el pH, deja de cumplir con la especificación;
- el producto D cumple el test 2 en la primera etapa (E1) a pH 6,8 y 4,5 (prácticamente no varía su disolución entre estos dos medios). A pH 1,2 se observa una disminución de los % Disueltos, sin embargo aún podría cumplir con el test 2 en la tercera etapa (E3);
- el producto E no cumple el ensayo en ninguno de los tres buffers ensayados y los porcentajes disueltos van disminuyendo junto con la disminución del pH.

### ● Perfiles de disolución

La Figura 2-1 presenta los perfiles de disolución obtenidos en los cuatro medios ensayados, agrupados por especialidad medicinal analizada, de manera de poder comparar el comportamiento de cada producto en función del medio de disolución utilizado.



**Figura 2-1.** Perfiles de disolución (promedio de doce comprimidos) en cuatro medios diferentes: LSNa 1% y tres soluciones buffer de pH 1,2 – 4,5 – 6,8. Los perfiles se muestran agrupados por producto analizado: Producto A (producto de referencia, Tegretol), B, C, D y E, todos comprimidos de CBZ 200 mg de liberación inmediata

La Figura 2-2, en tanto, presenta los mismos perfiles de disolución, pero esta vez agrupados por medio de disolución ensayado, de manera de poder comparar el desempeño de los distintos productos.

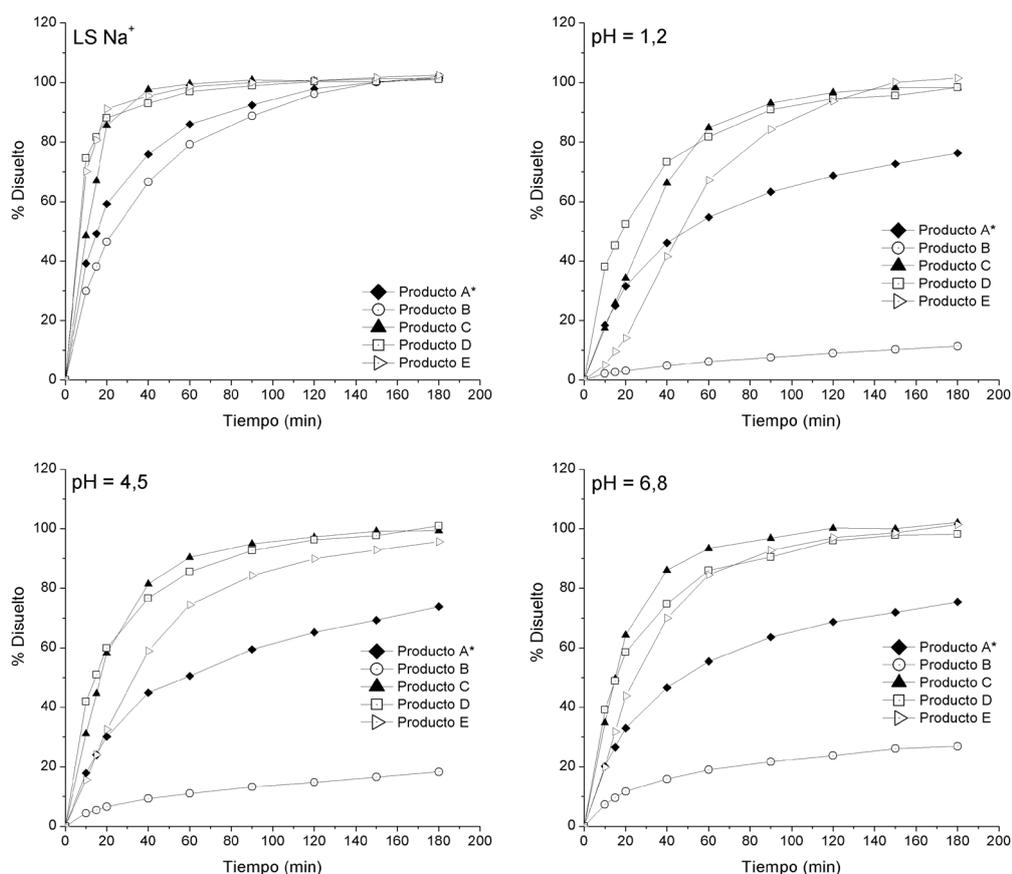


Figura 2-2. Perfiles de disolución (promedio de doce comprimidos) de las cinco especialidades medicinales conteniendo CBZ 200 mg comprimidos de liberación inmediata analizadas: Productos A (producto de referencia, Tegretol), B, C, D y E. Los perfiles se muestran agrupados por medio de disolución: LSNa 1% y buffers de pH 1,2 – 4,5 – 6,8

## 2.2 Oxcarbazepina (OxCBZ)

### Valoración y uniformidad de unidades de dosificación

#### ● Diseño del estudio

Al igual que en la sección anterior, se realizó el control de contenido (Valoración) y de uniformidad de contenido a comprimidos conteniendo el principio activo Oxcarbazepina (OxCBZ), en dos dosis diferentes, para verificar que cualquier diferencia que pudiera encontrarse en su desempeño *in vitro* (ver a continuación el ensayo de disolución) no se debiera a un problema de contenido.

Los productos evaluados fueron:

- producto J\* (Referencia): Trileptal 600 mg, Lab. Novartis Argentina SA (Lote: Z0007, Vto.: 02/2013)
- producto K: Aurene 600 mg, Lab. Ivax Argentina SA (Lote: 0167, Vto.: 05/2013)
- producto L: Rupox 600 mg, Lab. Medipharma SA (Lote: 017, Vto.: 08/2010)
- producto M: Rupox 300 mg, Lab. Medipharma SA (Lote: 021, Vto.: 01/2012)

El ensayo de UUD se llevó a cabo según la metodología de “Uniformidad por Peso”. Los comprimidos analizados cumplían con las condiciones establecidas para ser analizados por peso, tanto según la USP (dosis mayor a 25 mg y que represente más del 25% del peso) como según la FA (dosis mayor a 50 mg y que represente más del 50% del peso de los comprimidos) [FA 7, 2003; USP 31/NF 24, 2008].

### Método analítico

Se aplicó una técnica por HPLC con detección por UV (*ver descripción del cromatógrafo en el Anexo I*). El método analítico empleado se desarrolló a partir de otro previamente publicado y validado (Greiner-Sosanko et al., 2007) al que se le hicieron pequeñas modificaciones. Por esta razón, se llevó a cabo un esquema reducido de validación (linealidad, especificidad y precisión).

#### ● Condiciones analíticas y preparación de la solución de referencia

Como fase estacionaria se empleó una columna LiChrospher RP 18 (250 x 4 mm, 5 µm) y como fase móvil una mezcla Acetonitrilo: buffer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM (60:40) cuyo pH se ajustó a 3,7 con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  10%. El flujo fue de 1,2 ml/min y la longitud de onda de detección se fijó en 256 nm.

Como la valoración de las muestras se realizó el mismo día que la determinación de la linealidad, no fue necesario preparar una solución de referencia, ya que las concentraciones se obtuvieron directamente de la curva de calibración construida (*ver más adelante*).

#### ● Preparación de las muestras

Se pesaron 10 comprimidos en forma individual, los que se trabajaron en un mortero de forma de obtener un pulverizado homogéneo. A partir de allí, y de acuerdo al valor de PM obtenido, se pesaron tres alícuotas (triplicado) equivalentes a 60 mg de OxCBZ, las que se colocaron en un matraz de 100 ml con metanol y se sonicaron durante 15 minutos. Luego se llevó a volumen con metanol y a partir de allí se midieron alícuotas de aproximadamente 10 ml, se centrifugaron durante 10 minutos a 3500 rpm y del sobrenadante se hizo una dilución 1:25 también con metanol.

Las muestras resultantes se filtraron a través de membrana de nylon de 0,45 µm de tamaño de poro y se inyectaron por duplicado en el cromatógrafo.

### Validación del método analítico

Para la validación del método se prepararon tres muestras de OxCBZ (SR, título: 100% sdtc) pesando alrededor de 15 mg y disolviendo en 25 ml de metanol (600 µg/ml aproximadamente). A partir de cada una de esas soluciones madre se realizaron diluciones en metanol de manera de obtener soluciones con las siguientes concentraciones: 6, 12, 24, 36 y 48 µg/ml (tres réplicas independientes por concentración). Con dichas soluciones se construyó la curva de calibración y se calculó la precisión del método y del sistema. La Figura 2-3 muestra un cromatograma obtenido para una de las soluciones de referencia de concentración 24 µg/ml, aproximadamente.

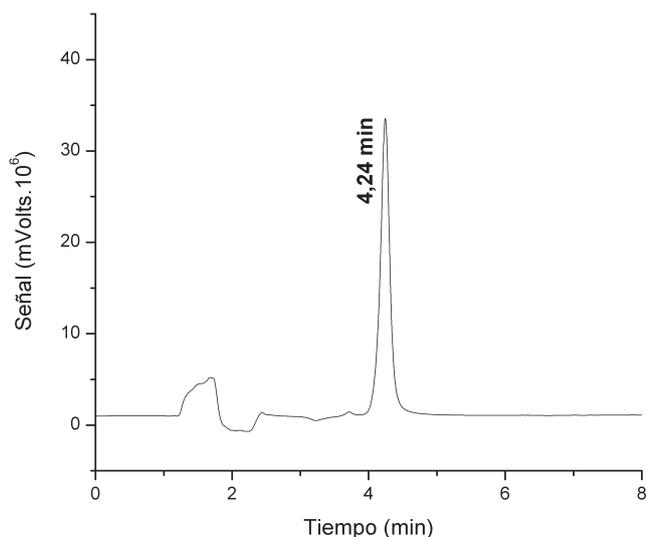


Figura 2-3. Cromatograma obtenido para una solución de referencia de OxCBZ en metanol de concentración 24 µg/ml

Se obtuvo una respuesta lineal en el rango de concentraciones estudiado (6,0 – 48,0 µg/ml) con un coeficiente de determinación  $R^2 = 0,99995$ . La pendiente (b) y la ordenada (a) (con sus respectivos intervalos del 95% de confianza) fueron:  $b = 22713,3 \pm 301,9$  y  $a = -4858,54 \pm 4780,21$ , respectivamente. De acuerdo al test de Student, la correlación lineal fue significativa ( $p < 0,0001$ ). La suma de los residuos fue  $1,11 \cdot 10^{-9}$ , y los mismos se encontraron aleatoriamente distribuidos alrededor de cero.

La precisión del sistema se determinó mediante inyecciones repetidas de una misma muestra ( $n = 6$ ) y arrojó un resultado de 0,18% (expresado como CV%), mientras que la precisión del método a cada nivel de concentración estudiado ( $n = 3$ ), también expresada como CV%, fue de 0,73; 0,70; 0,37; 0,40 y 0,25% para 6, 12, 24, 36 y 48 µg/ml, respectivamente.

La falta de interferencia por parte de los excipientes (especificidad del método) se estableció, para cada producto analizado, determinando el cociente entre las áreas de los picos cromatográficos a dos longitudes de onda (256 y 220 nm) de una muestra y verificando que el mismo no difiera en más de un 1% respecto al mismo cociente obtenido para las soluciones de referencia. Todos los productos cumplieron con este criterio.

### Test y perfiles de disolución

Se determinaron los perfiles de disolución de los cuatro productos de OxCBZ descritos anteriormente, y en todos los casos se trabajó con 6 comprimidos (*ver descripción del equipo de disolución en el Anexo I*).

Como hasta el momento ninguna farmacopea ha incorporado formas farmacéuticas de OxCBZ (solamente la USP codifica la materia prima), se aplicó el ensayo de disolución codificado para comprimidos de Carbamazepina, y se ensayaron también los medios sugeridos por la OMS: buffer pH 1,2 – 4,5 y 6,8 (WHO, 2006). En cada caso, se mantuvieron las condiciones de volumen, aparato y agitación, y simplemente se cambió el medio utilizado.

## Método analítico

Espectrofotometría UV-Visible para la determinación de OxCBZ en las muestras extraídas del equipo de disolución con detección a 256 nm (*ver descripción del espectrofotómetro en el Anexo I*).

### ● Condiciones experimentales

Se emplearon las mismas condiciones del ensayo realizado para comprimidos de CBZ (*ver página 50*); sólo cambiaron los tiempos de muestreo, que en este caso fueron 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 180 minutos.

### ● Preparación de la solución de referencia y de las muestras

Cada día de trabajo se preparó una solución de referencia pesando con exactitud alrededor de 15 mg de OxCBZ (SR, título: 100% sdtc). La cantidad pesada se colocó en un matraz de 25 ml y se llevó a volumen con metanol. A partir de allí se realizó una dilución 1:25 con el medio de disolución correspondiente a ese día de trabajo, y se leyó la absorbancia a 256 nm de la solución resultante.

Las muestras, una vez extraídas del equipo de disolución a los tiempos correspondientes, se centrifugaron durante 10 minutos a 3500 rpm y a partir del sobrenadante se realizó una dilución adecuada de manera de obtener valores de absorbancia cercanos al valor de la solución de referencia. En todos los casos, las diluciones se hicieron con el medio de disolución correspondiente. Por último, se leyó la absorbancia de dichas soluciones a 256 nm.

### ● Tolerancia (Test de Disolución)

Se aplican los criterios de la USP 31 para comprimidos de CBZ (*ver página 51*).

## Resultados y discusión

### ● Ensayo de valoración

La Tabla 2-4 presenta en forma resumida los resultados del ensayo de valoración de las cuatro especialidades medicinales analizadas. Si bien no se dispone de ninguna especificación de farmacopea para el contenido de OxCBZ se puede ver que todos los productos analizados arrojaron resultados aceptables dentro del intervalo 92-108% (intervalo establecido por la USP para CBZ).

Tabla 2-4. Resultados del ensayo de valoración, expresados como % Sobre Valor Declarado (% SVD). Se presentan los valores obtenidos para cada una de las tres alícuotas ensayadas de cada producto (producto J\* –referencia, Trileptal– K, L y M), su media y su coeficiente de variación (CV%)

	Producto J*	Producto K	Producto L	Producto M
Alícuota 1	99,58	99,23	99,02	100,10
Alícuota 2	99,98	100,15	100,29	98,68
Alícuota 3	101,40	100,88	99,89	98,75
Media	100,32	100,08	99,73	99,18
CV%	0,95	0,82	0,65	0,81

● **Ensayo de uniformidad de unidades de dosificación (UUD)**

La Tabla 2-5 presenta los resultados del ensayo de UUD (realizado por peso, en todos los casos) de las cuatro especialidades medicinales analizadas.

■ **Tabla 2-5.** Resultados del ensayo de UUD, expresados como % Sobre Valor Declarado (% SVD). Se presentan los rangos de valores obtenidos con los 10 comprimidos ensayados de cada producto (producto J\* –referencia, Trileptal– K, L y M), la media y el coeficiente de variación (CV%)

	<b>Producto J*</b>	<b>Producto K</b>	<b>Producto L</b>	<b>Producto M</b>
<i>Rango</i>	<b>[99,05 - 102,55]</b>	<b>[98,49 - 101,70]</b>	<b>[98,08 - 100,72]</b>	<b>[96,67 - 102,78]</b>
<i>Media</i>	<b>100,32</b>	<b>100,11</b>	<b>99,67</b>	<b>99,18</b>
<i>CV%</i>	<b>1,17</b>	<b>1,09</b>	<b>0,96</b>	<b>2,11</b>

Aplicando la forma general de la especificación para la uniformidad de contenido de la FA 7 (criterio A: cada uno de los 10 comprimidos debe encontrarse dentro de 85-115% SVD con  $CV \leq 6\%$ ) se concluye que todos los productos analizados cumplen el ensayo. Por otro lado, se calculó el VA para determinar si los productos cumplen con el ensayo de UUD según los criterios establecidos por la USP 31 <905> (Ecuación 2-1).

Como se desprende de la Tabla 2-5, para todos los productos se cumple que  $98,5\% \leq M \leq 101,5\%$  (M = media del contenido individual como % SVD), por lo que  $VA = K.S.$  Haciendo los cálculos correspondientes, los valores de VA encontrados son 2,82 – 2,80 – 2,31 y 5,03 para los productos J\*, K, L y M, respectivamente. Por lo tanto, las especialidades analizadas también cumplieron con el ensayo de UDD de acuerdo a los criterios de la USP <905>, ya que los VA son  $\leq a L1 = 15$  en todos los casos.

● **Test de Disolución**

La Tabla 2-6 presenta los datos obtenidos para cada uno de los cuatro productos ensayados a los 15 y 60 minutos (tiempos incluidos en la especificación de CBZ). No se presentan los resultados obtenidos en los otros medios ensayados (pH 1,2 – 4,5 y 6,8) debido a que los porcentajes disueltos en dichos medios de los productos analizados fueron muy bajos (a los 180 minutos sólo se había disuelto alrededor del 20% en los productos de 600 mg y del 40% en el de 300 mg).

■ **Tabla 2-6.** Resultados del Test de Disolución, expresados como % Disuelto (SVD), para los cuatro productos de OxCBZ en LSNa 1%. Se presentan los datos para cada uno de los seis comprimidos ensayados, la media y el coeficiente de variación (CV%)

<b>Resultados del ensayo de disolución en LSNa 1%</b>								
	<b>Producto J*</b>		<b>Producto K</b>		<b>Producto L</b>		<b>Producto M</b>	
	<b>15 min</b>	<b>60 min</b>	<b>15 min</b>	<b>60 min</b>	<b>15 min</b>	<b>60 min</b>	<b>15 min</b>	<b>60 min</b>
Comp. 1	90,72	95,88	77,17	97,96	38,61	99,57	51,42	99,08
Comp. 2	97,22	99,29	81,99	101,79	49,69	101,40	49,76	99,25
Comp. 3	98,47	100,19	78,54	99,00	39,65	100,94	46,01	97,57
Comp. 4	79,31	97,71	78,44	98,35	35,20	101,57	49,13	104,21
Comp. 5	98,93	102,84	69,56	92,20	36,95	95,20	52,35	101,38
Comp. 6	90,38	100,50	72,46	96,35	47,31	99,68	52,57	99,33
<b>Media</b>	<b>92,50</b>	<b>99,40</b>	<b>76,36</b>	<b>97,61</b>	<b>41,23</b>	<b>99,73</b>	<b>50,21</b>	<b>100,14</b>
<b>CV%</b>	<b>8,10</b>	<b>2,42</b>	<b>5,94</b>	<b>3,27</b>	<b>14,25</b>	<b>2,38</b>	<b>4,93</b>	<b>2,33</b>

A partir de la Tabla anterior puede verse que, de acuerdo con las especificaciones para CBZ, el producto K cumple con el test 3 y el M con el test 2, mientras que los productos J\* y L no cumplen con ninguno de los dos: J\* porque se disuelve > 85% a los 15 min y L porque se disuelve < 45% en 15 minutos. Si bien se trata de la primera etapa (E1), ninguno de los dos productos tiene oportunidad de cumplir con el test en las etapas posteriores, en el caso de J\* porque el test 3 (que sería el más aplicable) no permite ninguna unidad más allá del 10% del rango establecido (60-85%) a los 15 minutos, y de los seis comprimidos ensayados en E1 tres se encuentran por encima del 95%. En el caso de L sucede a la inversa: el test 2 no permite más de dos unidades por fuera del 5% del rango (45-75%) a los 15 minutos, y ya se puede ver que hay cuatro comprimidos por debajo del 40%.

El análisis anterior se basa en los límites impuestos para comprimidos de CBZ; por lo tanto, sólo resulta orientativo en el caso de OxCBZ. Sin embargo, se puede concluir que los productos analizados difícilmente resulten equivalentes farmacéuticos.

### ● Perfiles de disolución

La Figura 2-4 presenta los perfiles de disolución superpuestos para los cuatro productos ensayados obtenidos en los cuatro medios utilizados. Como se mencionó, sólo en LSNa 1% se logra la disolución completa del principio activo, ya que en los medios buffer, independientemente del pH, sólo logra disolverse aproximadamente el 20% de la droga en los productos de 600 mg (J\*, K y L) y el 40% en el caso del de 300 mg (M).

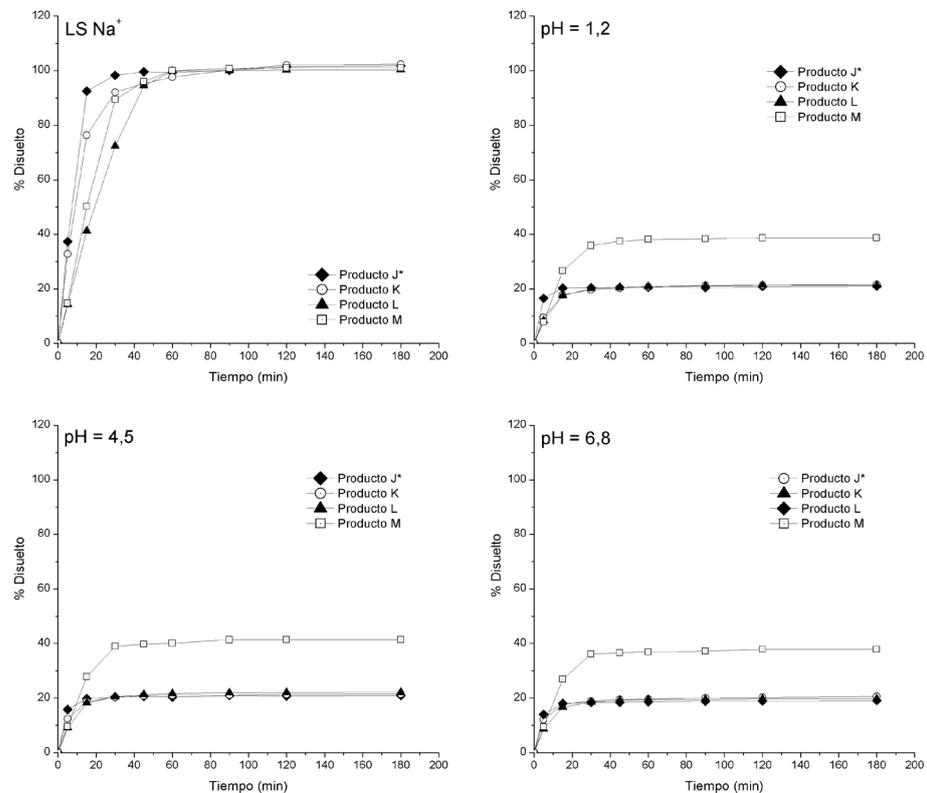


Figura 2-4. Perfiles de disolución (promedio de seis comprimidos) de las cuatro especialidades medicinales conteniendo OxCBZ comprimidos de liberación inmediata analizadas: Productos J\* (producto de referencia, Trileptal), K, L y M. Los perfiles se muestran agrupados por medio de disolución: LSNa 1% y buffers pH 1,2 - 4,5 - 6,8

Los porcentajes encontrados en función de la dosis sugieren un proceso saturable: en 900 ml de las soluciones buffer, en el rango de pH 1,2 – 6,8 y las condiciones de agitación y temperatura aplicadas, se disuelve un máximo aproximado de 120 mg de OxCBZ.

Este resultado es coherente con los ya descritos para CBZ, ya que la OxCBZ es una droga, si bien químicamente relacionada con la CBZ, de menor solubilidad que ésta (*Clarke's analysis of drugs and poisons*, 2004).

## 2.3 Fenitoína (PHT)

### Valoración y uniformidad de unidades de dosificación

#### ● Diseño del estudio

Se realizó el control de contenido (Valoración) y de uniformidad de contenido a las cápsulas rígidas conteniendo 100 mg del principio activo Fenitoína (PHT) para verificar que cualquier diferencia que pudiera encontrarse en su desempeño tanto *in vivo* (ensayo en voluntarios, ver Capítulo 3) como *in vitro* (ver a continuación el ensayo de Disolución) no se debiera a un problema de contenido.

Los productos evaluados, todas cápsulas de 100 mg, fueron:

- producto F: Fenitoína Denver Farma, Lab. Denver Farma SA (Lote: 090071, Vto.: 02/2011)
- producto G: Fenigramon, Lab. Gramon SAIC (Lote: 021T, Vto.: 07/2010)

De acuerdo al criterio utilizado en las secciones anteriores para definir qué producto era la “referencia” (el producto elegido por la autoridad nacional para actuar como referencia en los estudios de BE), ninguno de los dos productos de PHT analizados puede considerarse como tal, ya que para cápsulas de 100 mg ANMAT establece como referencia para los estudios *in vivo* a una formulación extranjera, no disponible comercialmente en nuestro país: Phenytoin Sodium Prompt cápsulas de 100 mg, Ivax Pharms, EE.UU. (ANMAT, 2002).

El ensayo de UUD se llevó a cabo según la metodología de “Uniformidad por Peso”. Las cápsulas analizadas cumplían con las condiciones establecidas para ser analizadas por peso según la USP (dosis mayor a 25 mg y que represente más del 25% del peso), si bien no según la FA, ya que la dosis representaba menos del 50% del peso neto de los polvos contenidos en las cápsulas del producto F (FA 7, 2003; USP 31/NF 24, 2008).

#### Método analítico

Espectrofotometría UV-Visible para la determinación de PHT (*ver descripción del espectrofotómetro en el Anexo I*). El método analítico empleado se validó en términos de su linealidad, especificidad y precisión.

#### ● Condiciones analíticas y preparación de la solución de referencia

El medio utilizado fue metanol y la longitud de onda elegida para la cuantificación fue 258 nm. Cada día de trabajo se preparó una solución de referencia pesando con exactitud alrededor de 13,5 mg de PHT (SR, título: 99,11% sdtc). La cantidad pesada

se colocó en un matraz de 25 ml al que se agregaron alrededor de 15 ml de metanol, se sonicó hasta disolución completa y se llevó a volumen con el mismo medio. Se realizó una dilución 3:10 también con metanol y se leyó la absorbancia a 258 nm de la solución resultante.

#### ● Preparación de las muestras

Se pesaron 10 cápsulas en forma individual, luego se vaciaron y se volvieron a pesar, de manera de obtener el peso del contenido por diferencia. El contenido se trabajó en un mortero de forma de obtener un pulverizado homogéneo. A partir de allí, y de acuerdo al valor de PM de contenido obtenido, se pesaron cuatro alícuotas (cuadruplicado) equivalentes a 50 mg de PHT, las que se colocaron en un matraz de 50 ml con metanol y se sonicaron durante 20 minutos. Luego se llevó a volumen con metanol y a partir de allí se midieron alícuotas de aproximadamente 10 ml, se centrifugaron durante 10 minutos a 3500 rpm y del sobrenadante se hizo una dilución 4:25 también con metanol. Se leyó la absorbancia de las soluciones resultantes a 258 nm.

#### Validación del método analítico

Para la validación del método se prepararon dos soluciones ( $S_1$  y  $S_2$ ) de PHT (SR, título: 99,11% sdte) pesando alrededor de 20 mg y disolviendo en 50 ml de metanol (400  $\mu\text{g/ml}$  aproximadamente). A partir de estas soluciones madre se realizaron diluciones cruzadas en metanol de manera de obtener soluciones (M) con las siguientes concentraciones: 80, 120, 160, 200 y 240  $\mu\text{g/ml}$ . Con dichas soluciones se construyó la curva de calibración y se calculó la precisión del método y del sistema. La Figura 2-5 muestra esquemáticamente las diluciones realizadas.

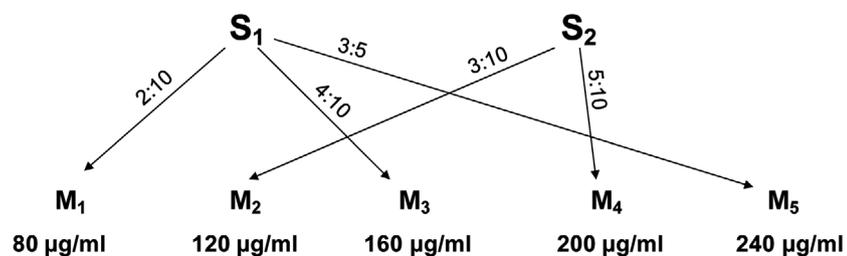


Figura 2-5. Esquema de las diluciones cruzadas realizadas a partir de las dos soluciones madre de PHT SR ( $S_1$  y  $S_2$ , 400  $\mu\text{g/ml}$ )

Se obtuvo una respuesta lineal en el rango de concentraciones estudiado con un coeficiente de determinación  $R^2 = 0,99990$ . La pendiente (b) y la ordenada (a) (con sus respectivos intervalos del 95% de confianza) fueron:  $b = 0,0029 \pm 5,46 \times 10^{-5}$  y  $a = 0,0017 \pm 0,0094$ , respectivamente. De acuerdo al test de Student, la correlación lineal entre las variables estudiadas fue significativa ( $p < 0,0001$ ). La suma de los residuos fue  $-8,33 \times 10^{-17}$ , y los mismos se encontraron aleatoriamente distribuidos alrededor de cero.

Se determinó la precisión del sistema y del método a la concentración de trabajo ( $M_3$ , 160  $\mu\text{g/ml}$ ). La precisión del sistema, mediante inyecciones repetidas de una misma muestra ( $n = 6$ ), arrojó un resultado de 0,25% (expresado como coeficiente de

variación, CV%), mientras que la del método calculada como CV% entre tres muestras independientes de la concentración fue de 0,94%.

La falta de interferencia por parte de los excipientes (especificidad del método) se estableció, para cada producto analizado, determinando el cociente de absorbancias a dos longitudes de onda (258 y 262 nm) de una muestra y verificando que el mismo no difiera en más de un 1% respecto al mismo cociente obtenido para las soluciones de referencia. A las longitudes de onda elegidas, los dos productos analizados cumplieron con este criterio.

### Test y perfiles de disolución

Se determinaron los perfiles de disolución de los dos productos de PHT descritos anteriormente, y en todos los casos se trabajó con 12 cápsulas (*ver descripción del equipo de disolución en el Anexo I*).

Para los ensayos de disolución se emplearon las condiciones (medio, volumen, aparato, agitación) especificadas por la USP para cápsulas de PHT Sódica de liberación inmediata.

También se ensayó de manera preliminar la disolución de las cápsulas en los medios buffer sugeridos por la OMS (WHO, 2006). Sin embargo, en ellos las cápsulas de gelatina quedaban intactas y no liberaban su contenido, por lo que no se observaba disolución alguna del principio activo.

### Método analítico

Espectrofotometría UV-Visible para la determinación de PHT en las muestras extraídas del equipo de disolución con detección a 258 nm (*ver descripción del espectrofotómetro en el Anexo I*).

#### ● Condiciones experimentales

Aparato: Aparato 1 USP, canastillo

Temperatura:  $37,0 \pm 0,5$  °C

Agitación: 50 rpm

Muestreo: 5 ml, sin reposición

Tiempos de muestreo: 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos

Medios ensayados (900 ml en todos los casos): USP 31, agua destilada

#### ● Preparación de la solución de referencia y de las muestras

Cada día de trabajo se preparó una solución de referencia pesando con exactitud alrededor de 13,5 mg de PHT (SR, título: 99,11% sdtc). La cantidad pesada se colocó en un matraz de 25 ml y se llevó a volumen con metanol. A partir de allí se realizó una dilución 3:10 con agua destilada y se leyó la absorbancia a 258 nm.

Las muestras, una vez extraídas del equipo de disolución a los tiempos correspondientes, se centrifugaron durante 10 minutos a 3500 rpm y a partir del sobrenadante se realizó una dilución adecuada de manera de obtener valores de absorbancia cercanos al valor de la solución de referencia. En todos los casos, las diluciones se hicieron con el medio de disolución (agua destilada). Por último, se leyó la absorbancia de dichas soluciones a 258 nm.

### ● Tolerancia (Test de Disolución)

Se aplica el criterio de la farmacopea USP 31 para cápsulas de PHT Sódica de liberación inmediata, el que establece un valor  $Q = 85\%$  a los 30 minutos. Es decir, de acuerdo a las especificaciones generales de los ensayos de disolución, USP 31 <711> (USP 31/NF 24, 2008), los productos cumplirán en la primera etapa (E1) si cada una de seis unidades ensayadas se disuelve más de  $Q + 5\%$  (90% en este caso) a los 30 minutos.

## Resultados y discusión

### ● Ensayo de valoración

La Tabla 2-7 presenta los resultados del ensayo de valoración de las dos especialidades medicinales analizadas. Se puede comprobar que ambos productos cumplen con este ensayo, ya que la especificación de farmacopea (USP 31/NF 24, 2008) para cápsulas de PHT Sódica de liberación inmediata establece que su contenido debe encontrarse dentro de 95-105% SVD.

■ **Tabla 2-7.** Resultados del ensayo de valoración, expresados como % Sobre Valor Declarado (% SVD). Se presentan los valores obtenidos para cada una de las cuatro alícuotas ensayadas de cada producto (F y G), su media y su coeficiente de variación (CV%)

	Producto F	Producto G
Alícuota 1	99,09	101,79
Alícuota 2	99,09	101,18
Alícuota 3	99,34	102,88
Alícuota 4	96,83	101,44
<i>Media</i>	<b>98,59</b>	<b>101,82</b>
<i>CV%</i>	<b>1,19</b>	<b>0,73</b>

### ● Ensayo de uniformidad de unidades de dosificación (UUD)

La Tabla 2-8 presenta los resultados del ensayo de UUD (realizado por peso, en todos los casos) de las especialidades medicinales analizadas.

■ **Tabla 2-8.** Resultados del ensayo de UUD, expresados como % Sobre Valor Declarado (% SVD). Se presentan los rangos de valores obtenidos con las diez cápsulas ensayadas por producto (F y G), la media y el coeficiente de variación (CV%)

	Producto F	Producto G
<i>Rango</i>	<b>[92,86 - 102,29]</b>	<b>[95,72 - 107,95]</b>
<i>Media</i>	98,72	101,95
<i>CV%</i>	<b>3,03</b>	<b>4,24</b>

Como el promedio de los límites de la definición de potencia (95-105% SVD) es 100%, el criterio de aceptación para el ensayo de UUD según la FA 7 establece que, para cumplir este ensayo en una primera etapa, las 10 cápsulas analizadas deben encontrarse dentro del rango 85-115% SVD y el CV debe ser  $\leq 6\%$ . Siguiendo este criterio, los dos productos analizados cumplen el ensayo (a pesar de que según FA el producto F tendría que haber sido por contenido).

Por otro lado, se calculó el VA para determinar si los productos cumplen con el ensayo de UUD según los criterios establecidos por la USP 31<905> (Ecuación 2-1). Como se desprende de la Tabla 2-8:  $98,5\% \leq M \leq 101,5\%$  para ambos productos ( $M$  = media del contenido individual como % SVD), por lo que  $VA = K.S$ . Haciendo los cálculos correspondientes, los valores de VA encontrados son 7,16 y 10,37 para los productos F y G, respectivamente. Por lo tanto, los mismos cumplen con el ensayo de UDD de acuerdo a los criterios de la USP <905>, ya que los VA son  $\leq$  a  $L1 = 15$  en todos los casos.

● **Test de Disolución**

La Tabla 2-9 presenta los resultados obtenidos a los 30 minutos durante el ensayo de disolución en agua de los productos F y G.

■ **Tabla 2-9.** Resultados del test de disolución, expresados como %Disuelto (Sobre Valor Declarado, SVD), para los dos productos de PHT en agua destilada. Se presentan los datos para cada una de las 12 cápsulas ensayadas, la media y el coeficiente de variación (CV%).

<i>Resultados del ensayo de disolución en agua destilada</i>		
	<b>Producto F</b>	<b>Producto G</b>
	<b>30 minutos</b>	<b>30 minutos</b>
Cápsula 1	100,94	102,53
Cápsula 2	100,49	101,62
Cápsula 3	101,27	93,48
Cápsula 4	100,24	91,96
Cápsula 5	100,79	93,20
Cápsula 6	102,07	101,57
Cápsula 7	100,97	108,86
Cápsula 8	97,71	96,65
Cápsula 9	99,00	100,86
Cápsula 10	102,34	98,72
Cápsula 11	94,88	103,74
Cápsula 12	100,95	97,65
<b>Media</b>	<b>100,14</b>	<b>99,24</b>
<b>CV%</b>	<b>2,07</b>	<b>4,99</b>

A partir de la tabla anterior puede verse que, de acuerdo con las especificaciones de la USP, ambos productos cumplen con el ensayo en la primera etapa (E1), ya que cada una de las unidades ensayadas se disolvió más del 90% ( $Q + 5\%$ ) a los 30 minutos.

● **Perfiles de disolución**

La Figura 2-6 presenta los perfiles de disolución superpuestos para los dos productos ensayados en agua destilada como medio de disolución.

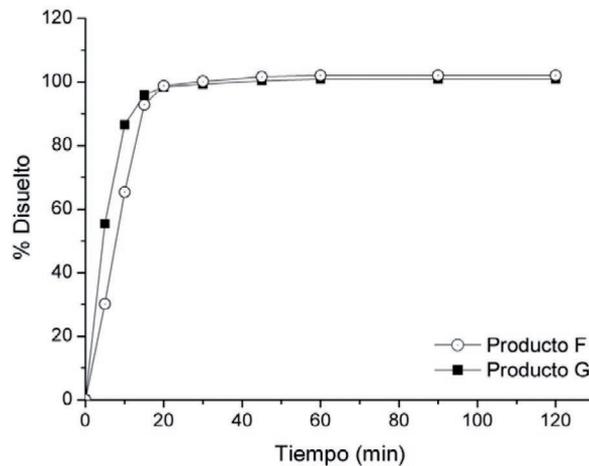


Figura 2-6. Perfiles de disolución (promedio de doce cápsulas) en agua de las dos especialidades medicinales conteniendo PHT Sódica 100 mg cápsulas de liberación inmediata analizadas: Productos F y G

## Conclusiones parciales

Los productos analizados de Carbamazepina 200 mg, comprimidos de liberación inmediata, cumplieron con las especificaciones farmacopeicas en términos de contenido y uniformidad de dicho contenido (ensayos de valoración y UUD), sin embargo no todos cumplieron con los requisitos del Test de Disolución:

- el producto A cumplió el test 2 en la segunda etapa (E2);
- el producto B no cumplió ninguno de los dos test ni podría cumplir si se ensayaran 12 unidades más;
- el producto C cumplió el test 2 en la primera etapa (E1);
- los productos D y E cumplieron el test 3 en la segunda etapa (E2).

Los productos correspondientes a Oxcarbazepina 600 y 300 mg representan un caso especial, ya que al no estar codificados en ninguna farmacopea (solamente la USP incluyó, en su última edición, la monografía de la materia prima Oxcarbazepina) no se cuenta con ninguna especificación preestablecida para comparar los resultados. Si por similitud química se le aplican las especificaciones correspondientes a productos de CBZ, se concluye que todos los comprimidos de OxCBZ analizados cumplieron con los ensayos de valoración y UUD. Sin embargo, no se puede decir lo mismo respecto al test de disolución, ya que si bien los productos K y M sí cumplieron con este ensayo (K el test 3 y M el test 2), los productos restantes (J\* y L) no, ni podrían hacerlo en etapas posteriores.

Los productos analizados correspondientes a Fenitoína 100 mg, cápsulas rígidas de liberación inmediata, cumplieron con todos los controles de calidad realizados.



---

---

■ Capítulo 3

**Bioequivalencia media vs.  
individual: el caso de Fenitoína**





**E**l tratamiento moderno de la epilepsia comenzó con el bromuro de potasio. Su primera mención se encuentra en la edición de Lancet de mayo de 1857 en el trabajo presentado por el Dr. E. Sieveking en la Sociedad Real Inglesa de Medicina y Cirugía titulado “Análisis de 52 casos de epilepsia observados por el autor”. El presidente de dicha sociedad, Sir Charles Locock, obstetra de la reina Victoria, compartió con la audiencia su entusiasmo por el bromuro de potasio en mujeres jóvenes con “epilepsia histérica relacionada con el periodo menstrual”. Si bien no hay estudios aleatorizados con bromuro, hay evidencia clínica suficiente para apoyar su título de primera droga efectiva contra la epilepsia (Brodie, 2010). De hecho, el bromuro es hoy en día una droga de tercera elección para el tratamiento de niños con epilepsia (Korinthenberg et al., 2007).

La era farmacológica de la terapia con drogas antiepilépticas (AEDs) comenzó con el descubrimiento casual de las propiedades anticonvulsivas del fenobarbital (PB), que se comercializaba como hipnótico (Luminal) hasta que fue utilizado para sedar a pacientes epilépticos. No solo se observó que los pacientes tenían menos episodios durante esa noche, sino que tampoco convulsionaban al día siguiente. El PB continúa siendo uno de los AEDs más ampliamente prescritos y permanece como una primera opción en muchos países debido a su moderado costo (Kwan & Brodie, 2004).

Cuando en 1934 el Dr. Tracy Putnam fue designado director de la unidad neurológica en el Hospital de Boston se dedicó a buscar un AED menos sedativo que el PB. Ensayó numerosos fenil-derivados de PB y mediante experimentos en gatos encontró que la Fenitoína (PHT) era el único de esos compuestos que resultaba efectivo para proteger a los gatos de las convulsiones inducidas eléctricamente, con una toxicidad aceptable para su administración rutinaria. En 1936 la PHT se ensayó clínicamente, y actualmente continúa siendo el AED más ampliamente utilizado en EEUU (Brodie, 2010).

Su actividad antiepiléptica incluye convulsiones tónico-clónicas generalizadas y crisis parciales. No es eficaz frente a ausencias, mioclonías o convulsiones febriles. Inhibe los canales de sodio, bloqueando selectivamente las descargas de alta frecuencia. Regula la actividad de la ATPasa- $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y tiende a restablecer el desequilibrio iónico provocado por un exceso de despolarización. Afecta más las neuronas normales que propagan las descargas que las del foco epiléptico y las que descargan anormalmente más que la transmisión normal, careciendo de acción sedante (Armijo & Herranz, 1998).

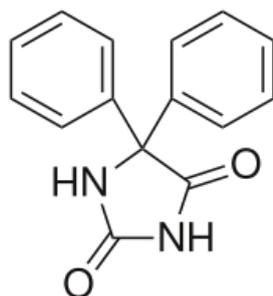


Figura 3-1. Estructura química de la PHT

Su absorción oral es completa (> 95%) pero lenta ( $T_{max} = 3 - 12$  horas, que puede llegar a 30 horas cuando se administran dosis altas), y los alimentos aumentan su absorción. Se une el 90% a la albúmina; su concentración en el líquido cefalorraquídeo, líquido intersticial del cerebro, y saliva se corresponde con la concentración libre (10%), aunque la concentración cerebral pueda resultar mayor debido a acumulación en componentes no acuosos de las células. No tiene metabolitos activos y se elimina casi totalmente por hidroxilación en el microsoma hepático (> 95%), reacción que se satura con concentraciones por encima de 10 mg/l dando lugar a una cinética dosis-dependiente tipo Michaelis-Menten. Como consecuencia, cuando se utilizan dosis altas se alcanzan concentraciones mayores a las esperadas (ver Figura 3-2), lo que dificulta el ajuste de la dosis, se alarga la semivida de eliminación (desde 15 horas a dosis bajas hasta 120 horas a dosis altas) y tarda más tiempo en alcanzarse el estado estacionario.

Por ello, se debe tener extremo cuidado cuando se intercambian formulaciones, ya que los niveles plasmáticos pueden modificarse considerablemente entre un producto y otro. Dichos intercambios deben estar siempre acompañados de monitoreos terapéuticos que garanticen la eficacia y seguridad del tratamiento (Goodman & Gilman, 2006). En estudios controlados con PHT se ha encontrado aumento (Mikati et al., 1992), disminución (Rosenbaum et al., 1994) o ningún cambio (Chen et al., 1982) en los niveles plasmáticos cuando se intercambió el producto líder por uno genérico. También se han reportado diferencias en el efecto de la comida sobre el producto de marca respecto a una FG: la comida producía una disminución significativa de la BD de la FG pero no del producto de marca (Wilder et al., 2001). Análogamente, otros investigadores encontraron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de PHT en pacientes epilépticos cuando éstos pasaban del producto de marca a una FG, tanto adultos (Burkhardt et al., 2004) como pediátricos (Hodges et al., 1986).

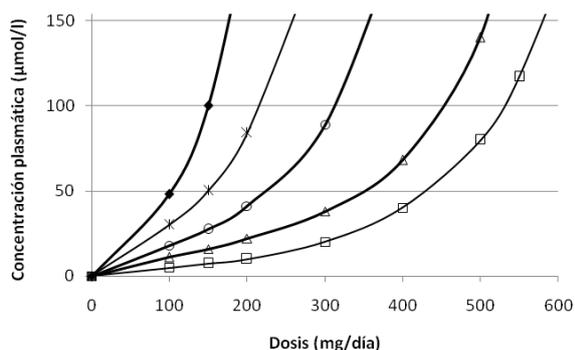


Figura 3-2. Gráfico de las concentraciones plasmáticas de PHT en función de la dosis administrada en cinco pacientes diferentes (cada curva representa un paciente). Se observa el aumento no-lineal de las concentraciones a dosis elevadas (pérdida de linealidad aproximadamente a partir de concentraciones > 10 mg/l = 40 μmol/l). Adaptado de Cohen & Pradeau, 1998

El ajuste de dosis de PHT también se torna difícil debido a la gran variabilidad individual en su metabolismo, junto con la cinética no lineal saturable. Estudios recientes han mostrado la influencia de la farmacogenética en el metabolismo de drogas, y más precisamente se cree que el polimorfismo en el gen que codifica para el citocromo P450 2C19 (CYP2C19) es el responsable de la mayoría de las variaciones inter individuales encontradas durante la terapéutica con PHT (Bergen, 2009). Por otro lado, se trata de una droga de estrecho margen terapéutico ya que el intervalo óptimo de niveles séricos habitualmente reconocido es de 10 a 20 mg/l, si bien hay muchos pacientes que responden a niveles de 5 a 10 mg/l cuando la PHT se utiliza como primera opción de tratamiento. Por el contrario, hay pacientes resistentes en los que se necesitan niveles de hasta 25 mg/l, aunque niveles por encima de 20 mg/l suelen producir efectos tóxicos inaceptables (Armijo & Herranz, 1998).

Debido a esto, la PHT fue una de las primeras drogas para las cuales las Agencias Regulatorias requirieron estudios de bioequivalencia (BE) como etapa previa a la introducción de una formulación en el mercado. Más aun, la PHT ha sido propuesta como candidata para estudios de BE Individual (BEI) ya que reúne todos los factores que afectan negativamente la equivalencia terapéutica y la BE: baja solubilidad en agua, farmacocinética no-lineal y estrecho margen terapéutico (Anderson, 2008). Por ello elegimos esta droga como modelo para evaluar el desempeño de dos diseños estadísticos para estudios de BE: BE media (BEM) y BEI.

Si bien estos diseños no son los únicos posibles para esta clase de estudios, según se estableció en el Capítulo 1, resulta interesante compararlos ya que la BEI fue el modelo propuesto inicialmente para asegurar la “intercambiabilidad” de medicamentos. Anderson y Hauck (Anderson & Hauck, 1990) como así también Sheiner (Sheiner, 1992) fueron los primeros en establecer la diferencia entre “recetabilidad” e “intercambiabilidad”, según si la nueva formulación es introducida al principio o durante el tratamiento con un determinado fármaco, respectivamente. En sus trabajos establecían que en el primer caso era suficiente que la nueva formulación fuera BEM respecto al producto de referencia para asegurar la eficacia y seguridad del tratamiento, mientras que en el segundo era necesario conocer la variabilidad intra individual de la respuesta a la droga, por lo que se requerían estudios de BEI (Endrenyi & Midha, 1998; Midha et al., 1999).

Como se discutió en el Capítulo 1, demostrar estadísticamente que dos formulaciones T y R son similares significa que cierta función comparadora de los parámetros de la distribución estadística de T y R,  $f(\theta_T, \theta_R)$  debe caer dentro de límites preestablecidos (ver Ecuación 1-1). En el caso de la BE media, el criterio toma la siguiente forma:

$$(\mu_T - \mu_R)^2 \leq \theta_M^2 \Rightarrow -\theta_M \leq (\mu_T - \mu_R) \leq \theta_M$$

■ Ecuación 3-1

Donde  $\mu_T$  y  $\mu_R$  son las medias de los parámetros farmacocinéticos ln-transformados de T y R, respectivamente, y  $\theta_M$  es el límite de BE, tal que  $\theta_M = \ln(1,25)$ .

En dicho capítulo también se introdujo el concepto de BEI, como aquel que permitía evaluar, además de las medias de T y R, las variabilidades intra individuales de ambas formulaciones junto con la interacción Individuo\*Formulación (I\*F). Este concepto fue inicialmente propuesto por Anderson y Hauck en 1990 (Anderson & Hauck, 1990) si bien luego se desarrollaron numerosos métodos de cálculo aplicables al mismo. Dichos procedimientos pueden clasificarse en: métodos basados en momentos estadísticos, que evalúan funciones de las distribuciones de los parámetros farmacocinéticos, y métodos basados en el cálculo de la probabilidad de que la diferencia entre las características farmacocinéticas de BD sea pequeña (Endrenyi & Midha, 1998). Se demostró luego que ambas clases de métodos presentaban gran correlación en sus resultados (Hauck & Anderson, 1994; Holder & Hsuan, 1993; Schall, 1995).

En el presente trabajo se aplica un método correspondiente a la primera categoría, y sólo se detallarán las ecuaciones y métodos de cálculo correspondientes al mismo. El criterio de BEI mencionado fue propuesto por Schall y Luus en 1993 (Schall & Luus, 1993) y fue el que adoptó la guía correspondiente de la FDA (FDA/CDER, 2001).

Matemáticamente, se puede expresar de la siguiente manera:

$$(\mu_T - \mu_R)^2 + \sigma_D^2 + (\sigma_{T,intra}^2 - \sigma_{R,intra}^2) \leq \Delta_I^2$$

■ Ecuación 3-2

Donde  $\mu_T$  y  $\mu_R$  son las medias de los parámetros farmacocinéticos ln-transformados mientras que  $\sigma_{T,intra}^2$  y  $\sigma_{R,intra}^2$  son las varianzas intra individuales de T y R, respectivamente;  $\sigma_D^2$  es la varianza debida a la interacción I\*F y  $\Delta_I^2$  es el límite de BE.

La Ecuación 3-2 representa un único criterio correspondiente al límite superior de un test unilateral, a diferencia de la BEM donde, como se ve en la Ecuación 3-1 (y como ya se comentó en el Capítulo 1), se deben comparar ambos extremos del intervalo para concluir BE entre las formulaciones estudiadas.

Si bien el criterio básico es el descrito por la Ecuación 3-2, la guía de la FDA lo adoptó en su forma “escalada”, es decir, normalizada por un valor determinado. Como a su vez también se estableció que este escalado podía realizarse de dos maneras, se llamó a todo el procedimiento “*mixed-scaled approach*”, es decir, “aproximación de escalado mixto”. Los dos posibles escalados son:

- respecto a la varianza intra individual del producto de referencia,  $\sigma_{R,intra}^2$  (*reference-scaled*):

$$\frac{(\mu_T - \mu_R)^2 + \sigma_D^2 + (\sigma_{T,intra}^2 - \sigma_{R,intra}^2)}{\sigma_{R,intra}^2} \leq \theta_I^2$$

■ Ecuación 3-3

- respecto a una constante,  $\sigma_{0,intra}^2$  (*constant-scaled*):

$$\frac{(\mu_T - \mu_R)^2 + \sigma_D^2 + (\sigma_{T,intra}^2 - \sigma_{R,intra}^2)}{\sigma_{0,intra}^2} \leq \theta_I^2$$

■ Ecuación 3-4

Se utiliza uno u otro tipo de escalado en función del valor de la relación entre  $\sigma_{R,intra}^2$  y  $\sigma_{0,intra}^2$ , si la primera es mayor se emplea el primer criterio, y viceversa. Es decir, el método de escalado tiene como consecuencia ensanchar o flexibilizar el criterio de aceptación de BEI para drogas altamente variables. Ahora bien, si la droga presentara baja variabilidad el criterio se volvería muy exigente, por ello se utiliza el escalado mixto: en el caso de drogas con baja variabilidad el denominador se convierte en una constante.

Por otro lado, a partir de las ecuaciones anteriores puede verse que la BEI se reduce a la BEM cuando los productos T y R presentan iguales variabilidades y no existe interacción I\*F, ya que en ese caso la Ecuación 3-2 se transforma en la 3-1. También se observa que si la formulación T presenta menor variabilidad que R ello es “recompensado” por el criterio, ya que la diferencia de las varianzas se vuelve negativa y por lo tanto es permitida una mayor diferencia entre las medias.

Resta establecer el valor de las constantes,  $\sigma_{0,intra}^2$  y  $\theta_I^2$ . La primera es el valor de corte a partir del cual se emplea un criterio u otro, y su valor numérico fue establecido de acuerdo al siguiente razonamiento: suponiendo un valor máximo de  $\theta_I^2$  de 1,25 (por analogía con la BEM), ¿cuánto debe valer  $\sigma_{0,intra}^2$  para dos formulaciones cuyo cociente de medias geométricas es 1,25 si las mismas no presentan interacción I\*F y las varianzas intra individuales de T y R son iguales? Eso arroja un valor de  $\sigma_{0,intra}^2 = 0,04$ , valor sugerido por la guía de la FDA (FDA/CDER, 2001).

$$\frac{(\mu_T - \mu_R)^2}{\theta_I^2} \cong \sigma_{0,intra}^2 \Rightarrow \frac{(\ln 1,25)^2}{1,25} \cong 0,04$$

■ Ecuación 3-5

Por lo tanto,  $\sigma_{0,intra} = 0,2$ . En cuanto a la determinación del valor del criterio de aceptación  $\theta_I^2$ , éste debe basarse en el criterio de la BEM más los términos debidos a la varianza (los que se agrupan bajo la denominación  $\varepsilon_I$ ). El valor recomendado para la diferencia de varianzas intra individuales entre T y R es de 0,02, mientras que para la interacción se acepta hasta 0,03 (FDA/CDER, 2001), lo que genera un valor  $\varepsilon_I = 0,05$ . El criterio queda definido por lo tanto según la siguiente expresión:

$$\theta_I^2 = \frac{(\ln 1,25)^2 + \varepsilon_I}{\sigma_{0,intra}^2} = \frac{(\ln 1,25)^2 + 0,03 + 0,02}{0,04} = 2,495$$

■ Ecuación 3-6

En la segunda parte de este capítulo (sección 3.2) se detalla un estudio de BEI del principio activo PHT realizado en voluntarios sanos y se comparan sus resultados y métodos de cálculo con los de las BEM que se pueden obtener a partir de los mismos datos experimentales. En la siguiente parte del capítulo (sección 3.3) se continúa el análisis mediante simulaciones de estudios de BEI que permitieron evaluar su desempeño cuando se modificaban diferentes variables. Finalmente, se analizan los resultados que permiten responder a la premisa planteada en la primera de nuestras hipótesis:

*Los estudios de bioequivalencia individual (BEI), si bien brindan mayor información que los de bioequivalencia media (BEM) al replicar la administración de los productos en los voluntarios, en la mayoría de los casos no presentan ventajas significativas que justifiquen su aplicación para la evaluación comparativa de la biodisponibilidad (BD) de dos medicamentos.*

## Ensayos realizados

### 3.1 Desarrollo y validación del método analítico

#### Método para la determinación de PHT en saliva de voluntarios sanos

Se aplicó un método por HPLC para la determinación de PHT en saliva de voluntarios sanos (*ver descripción del cromatógrafo en el Anexo I*).

##### ● Condiciones cromatográficas

Como fase estacionaria se utilizó una columna LiChrospher RP-18 (Merck, Darmstadt, Alemania), 125 x 4 mm d. i. y 5 µm de tamaño de partícula. La fase móvil consistió en una mezcla de metanol: acetonitrilo: isopropanol: agua (20:20:3:57) llevada a pH 3 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10%, desgasificada y filtrada por membrana de nylon de 0,45 µm. Se trabajó de manera isocrática y a temperatura ambiente, con un flujo de 1,3 ml/min y con detección UV a 210 nm. Se utilizó el área de pico como parámetro de integración.

##### ● Preparación de las soluciones de referencia

Las soluciones stock se prepararon en metanol, en el caso de PHT la concentración fue de 50 µg/ml y se preparó a partir de PHT Sustancia de Referencia (SR, título: 99,11% sdtc). En el caso del estándar interno (SI), Propilparabeno (PPB), la concentración fue 15 µg/ml. Dichas soluciones se conservaron refrigeradas hasta su uso (se mantienen estables durante once meses a -20 °C). Las soluciones de referencia utilizadas luego para la validación del método (así como también durante la valoración de las muestras) se prepararon por dilución de estas soluciones stock con saliva blanco y se almacenaron a -20 °C.

##### ● Preparación de las muestras

Sobre 1 ml de muestra salival se agregaron 30 µl de la solución stock de PPB (15 µg/ml, SI) y 2 ml de cloroformo. Se agitó en vortex durante 1 min y luego se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min. La fase orgánica se separó y se evaporó hasta sequedad bajo corriente de nitrógeno a 40 °C en un baño de agua. El residuo se resuspendió con 100 µl de metanol, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min y se inyectaron 20 µl en el cromatógrafo.

#### Validación del método analítico

##### ● Especificidad

El método es específico respecto a la matriz biológica ya que no se observaron picos cercanos (interferencias endógenas) a los tiempos de retención de PHT y PPB cuando se analizaron muestras de saliva blanco provenientes de ocho fuentes independientes. En la Figura 3-3 se muestran dos cromatogramas: uno correspondiente a saliva blanco y otro a la misma matriz inoculada con soluciones de referencia de PHT y PPB.

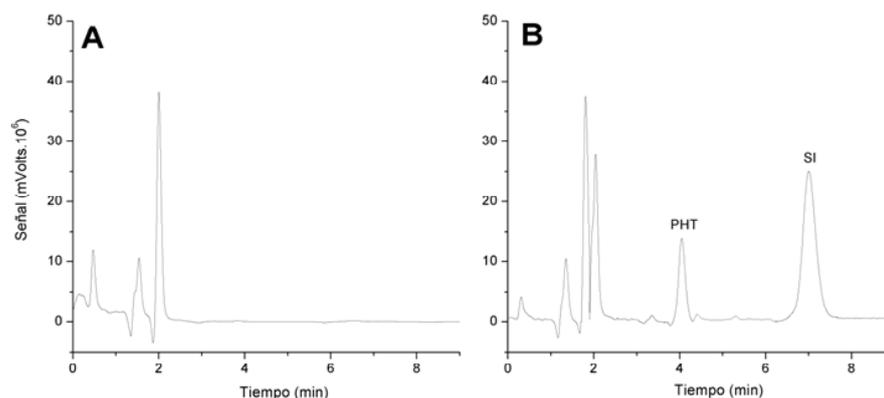


Figura 3-3. Ejemplos de cromatogramas obtenidos con saliva blanco (A) y saliva blanco más soluciones de referencia de PHT y PPB (estándar interno, SI) (B)

#### ● Linealidad

Para evaluar la linealidad del método se trabajó con muestras correspondientes a cinco niveles de concentración con tres replicados independientes a cada uno ( $N = 15$ ), dentro del rango  $0,0075$ - $1,00 \mu\text{g/ml}$ , preparadas inoculando saliva blanco con solución stock de PHT y de PPB.

El método ajustó al modelo lineal, con la concentración como variable independiente  $x$  y la relación de áreas de pico ( $Ra = A_{\text{pht}}/A_{\text{ppb}}$ ) como variable dependiente  $y$ , de acuerdo al test de Student ( $p < 0,0001$ ). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3-1.

Tabla 3-1. Resultados del ensayo de linealidad para muestras salivales inoculadas con soluciones de referencia de PHT y PPB. Se ensayaron tres réplicas independientes a cinco niveles diferentes de concentración ( $N = 15$ ) dentro del rango indicado. IC 95%: Intervalo del 95% de Confianza.  $R^2$ : coeficiente de determinación

Rango ( $\mu\text{g/ml}$ )	Ordenada (a) [IC 95%]	Pendiente (b) [IC 95%]	$R^2$	Suma de residuales
0,0075 - 1,00	0,0016 [-0,0064 - 0,0096]	2,3847 [2,3691 - 2,4003]	0,9999	$2,129 \cdot 10^{-13}$

Se considera como límite de cuantificación la concentración  $0,0075 \mu\text{g/ml}$  ya que para las muestras correspondientes se cumplieron las siguientes condiciones: la respuesta obtenida a ese nivel fue al menos 5 veces la respuesta del blanco, y el pico era identificable, discreto y reproducible con una precisión de al menos el 20% y una exactitud de entre el 80-120% (Shah et al., 1991).

#### ● Exactitud y precisión

Se prepararon muestras de PHT (adicionadas de PPB) a cinco niveles de concentración (los mismos de la linealidad), tres replicados independientes a cada nivel. Para ello se inoculó saliva blanco con cantidades adecuadas de soluciones de referencia. Las

concentraciones finales y los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 3-2, donde se observa que el método posee exactitud y precisión aceptables en todo el rango de concentraciones estudiado. Para el cálculo de la exactitud se utilizó el cociente de áreas (Ra) entre PHT/PPB.

Las muestras fueron preparadas, procesadas y analizadas el mismo día, de modo que la precisión obtenida es intra-día. Esto se hizo así para intentar simular la situación real de aplicación del método: procesar todas las muestras correspondientes a un voluntario en el mismo día.

**Tabla 3-2.** Exactitud y precisión (intra-día) obtenidas con muestras salivales inoculadas con soluciones de referencia de PHT y PPB. Se realizaron tres réplicas independientes a cada nivel de concentración (n = 3). CV: coeficiente de variación

Concentración (µg/ml)	Intra-día	
	Exactitud (%)	CV (%)
0,0075	100,50	2,50
0,050	99,58	1,49
0,250	100,40	1,24
0,500	100,67	0,65
1,000	99,79	0,87

● **Recuperación**

Los porcentajes recuperados luego de la etapa de extracción se evaluaron a tres niveles de concentración diferentes (el menor, medio y mayor de la curva de calibración), con tres réplicas a cada nivel, mediante la comparación del área de pico de PHT en las muestras procesadas (preparadas a partir de matriz blanco más solución de referencia) con el área obtenida con soluciones de referencia sin extraer, es decir, soluciones de igual concentración que las anteriores pero preparadas por simple dilución de la solución stock en metanol.

La Tabla 3-3 muestra los resultados: los porcentajes recuperados obtenidos fueron cercanos al 80% y relativamente constantes, lo que motivó el uso de SI ya que, como se observa en la Tabla 3-2, cuando en vez de áreas de pico los cálculos se realizan utilizando el parámetro Ra los porcentajes recuperados se aproximan al 100%.

**Tabla 3-3.** Exactitud y precisión (intra-día) obtenidas con muestras salivales inoculadas con solución de referencia de PHT. Se realizaron tres réplicas independientes a cada nivel de concentración (n = 3). CV: coeficiente de variación

Concentración (µg/ml)	Recuperación (%)	CV (%)
0,0075	80,04	1,67
0,250	82,01	4,67
1,000	81,78	1,37

### ● Estabilidad

Las soluciones stock de las SR de PHT y PPB resultaron estables durante al menos once meses a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Periódicamente, a lo largo de ese período, fueron re-testeadas comparando las áreas de pico obtenidas con las áreas correspondientes de soluciones de referencia preparadas el día del ensayo.

Por otro lado, también se determinó la estabilidad de muestras de saliva inoculadas con PHT y PPB (a dos niveles de concentración, tres réplicas independientes cada vez) frente a tres ciclos de congelamiento-descongelamiento (48 h) y durante 20 h a temperatura ambiente. Como se observa en la Tabla 3-4, las muestras resultaron estables en todas las condiciones ensayadas.

**Tabla 3-4.** Estabilidad de muestras salivales inoculadas con soluciones de referencia de PHT y PPB frente a un ciclo de 20 horas a temperatura ambiente y frente a tres ciclos de congelamiento-descongelamiento. CV: coeficiente de variación

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recuperación (%)	CV (%)
	(n = 3)	
<i>Estabilidad frente a un ciclo de 20 h a temperatura ambiente</i>		
0,05	100,76	1,80
0,50	99,71	0,93
<i>Estabilidad frente a tres ciclos de congelamiento-descongelamiento (48 h)</i>		
0,05	99,81	1,55
0,50	100,38	1,04

## 3.2 Estudio de BDR (BEI/BEM) de cápsulas de PHT 100 mg en voluntarios sanos

### Descripción y objetivos

#### ● Diseño del estudio

Se evaluó la biodisponibilidad relativa (BDR) de dos productos comerciales de PHT 100 mg, cápsulas de liberación inmediata (productos F y G), en voluntarios sanos, siguiendo un diseño aleatorizado y cruzado de cuatro períodos y dos secuencias, empleando saliva como fluido biológico. Las dos secuencias aplicadas fueron RTTR y TRRT: los voluntarios se dividieron al azar en dos grupos y a cada grupo se le asignó una secuencia por sorteo. Entre períodos se dejaron pasar 15 días de manera de asegurar un lavado de al menos 7 veces la vida media del fármaco, que se estima entre 7 y 42 h (*Clarke's analysis of drugs and poisons*, 2004).

Los productos evaluados fueron los mismos ensayados en el Capítulo 2:

- producto F: Fenitoína Denver Farma, Lab. Denver Farma SA (Lote: 090071, Vto.: 02/2011)
- producto G: Fenigramon, Lab. Gramon SAIC (Lote: 021T, Vto.: 07/2010)

Se fija arbitrariamente al producto G para ser denominado "Referencia", ya que la autoridad sanitaria de nuestro país establece como referencia para los estudios *in vivo* que involucren cápsulas rígidas de PHT 100 mg a una formulación extranjera, no

disponible comercialmente en nuestro país: Phenytoin Sodium Prompt cápsulas de 100 mg, Ivax Pharms, EE UU (ANMAT, 2002).

El estudio se llevó a cabo de acuerdo a los principios de la Declaración de Helsinki (World Medical Association, 2004) y a las Guías de Buenas Prácticas en Clínica de la Comisión Internacional de Armonización (*International Conference on Harmonization Guideline for Good Clinical Practice*, EMEA/CPMP, 2002). El protocolo del estudio fue previamente aprobado por el comité de ética del Hospital Italiano de La Plata y todos los voluntarios dieron su consentimiento informado por escrito, frente a un testigo (*ver Anexo III*).

En el primer día de cada período los voluntarios (con al menos ocho horas de ayuno) recibieron una única dosis 100 mg de PHT (de la marca correspondiente) a las 8 de la mañana, con aproximadamente 200 ml de agua. Durante ese primer día las comidas fueron estandarizadas y programadas para las 12, 16 y 20 horas.

#### ● Sujetos

El estudio incluyó un total de 24 voluntarios sanos (10 hombres y 14 mujeres) y todos ellos completaron el esquema de trabajo propuesto. Como criterios de inclusión se exigió una edad de entre 18 y 40 años y un peso dentro del 15% del peso ideal, que no fueran fumadores ni estuvieran bajo ningún tratamiento farmacológico, y en el caso de las mujeres que no estuvieran embarazadas. El peso ideal (PI) en kg se calculó como  $PI = 0,9 \times (H - 100)$  para las mujeres y  $PI = (H - 100)$  para los hombres, siendo H la altura en centímetros (Silva et al., 2010).

Para los 24 voluntarios la edad media [rango] fue de 29 años [22-37], el peso medio de 66,3 kg [52-86] y la altura media de 1,73 m [1,60-1,90]. Se les solicitó no tomar ninguna medicación en los 15 días previos al estudio, así como también evitar el consumo de bebidas alcohólicas o que contuvieran xantinas en las 48 horas previas al inicio de cada período del estudio.

En cada período se interrogó a los voluntarios respecto a la aparición de algún síntoma no habitual luego de la administración del producto correspondiente, y durante los dos días posteriores a dicha administración para detectar cualquier efecto adverso que pudiera presentarse.

#### ● Toma de muestras

Como las concentraciones salivales se equilibran instantáneamente con las arteriales en los capilares sanguíneos (Posti, 1982), los niveles salivales son más sensibles al ingreso de droga al organismo durante el proceso de absorción, resultando en una respuesta más variable y en perfiles C vs. T con más de un pico (esto se trata con más detalle en el Capítulo 6). Por lo tanto, cuando se trabaja con muestras salivales, el esquema de muestreo es un aspecto crítico del estudio: se debe elegir de tal manera que incluya el máximo real de ambas formulaciones, en todos los sujetos y los períodos.

Para elegir el mejor esquema de muestreo se seleccionaron seis voluntarios (no incluidos en el estudio principal), con el mismo criterio de inclusión descripto anteriormente, y se los dividió al azar en dos grupos. Luego de una toma de muestra de saliva pre-dosis (blanco o  $T_0$ ) cada grupo recibió una dosis (100 mg) de las formulaciones F y G, con 200 ml de agua. Luego de la administración de la cápsula correspondiente, la boca fue enjuagada exhaustivamente con agua (que se descartó), y se tomaron muestras cada media hora durante las primeras 12 horas post-dosis, luego de lo cual se tomaron muestras a las 24, 36 y 48 horas. Estas muestras se recogieron en recipientes

plásticos adecuados, y se permitió a los voluntarios masticar un trozo de parafilm para facilitar la producción de saliva. Luego de centrifugar la saliva colectada a 3500 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. El mismo se llevó a cabo mediante la técnica por HPLC descrita en la sección 3.1 del presente capítulo.

Finalizado el período de muestreo se construyeron los seis perfiles C vs. T de manera de obtener los valores de Tmax: 3; 4; 4; 4,5; 5 y 5,5 h (media  $\pm$  SD =  $4,33 \pm 0,88$ ), y también se calcularon las áreas bajo la curva desde cero hasta 48 h ( $ABC_{0-t}$ , media  $\pm$  SD =  $3,05 \pm 0,42$ ) y hasta infinito ( $ABC_{0-inf}$ , media  $\pm$  SD =  $3,36 \pm 0,47$ ) mediante el método de los trapecios. A continuación, se propusieron tres esquemas de muestreo posibles para el estudio principal, que diferían entre sí en el número y la ubicación de los muestreos cada media hora alrededor de Tmax. Para los tres esquemas se recalcularon los valores de  $ABC_{0-t}$  y  $ABC_{0-inf}$  y se compararon estadísticamente entre ellos y respecto del esquema completo. Como resultado, se seleccionó el siguiente esquema de muestreo: 0; 1; 2; 3; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 8; 9; 10; 12; 24; 36 y 48 h. Dicho esquema fue el que mejor describía los perfiles salivales y el más cómodo para los voluntarios, por su menor número de muestreos cada media hora. Los valores de  $ABC_{0-t}$  y  $ABC_{0-inf}$  (media  $\pm$  SD) fueron  $3,02 \pm 0,45$  y  $3,33 \pm 0,50$ , respectivamente. Luego de un ANAVA, se comprobó que dichos valores no diferían significativamente respecto a las ABC correspondientes del esquema completo ( $p > 0,05$ ).

Por lo tanto, para el estudio de BDR principal se aplicaron las mismas condiciones de toma de muestra, pre-tratamiento, almacenamiento y método de análisis que los recién descritos, siguiendo el esquema elegido.

#### ● Análisis estadístico y farmacocinético

Las áreas bajo la curva de concentración-tiempo ( $ABC_{0-t}$  y  $ABC_{0-inf}$ ) se calcularon mediante el método de los trapecios. La concentración salival máxima (Cmax) y el tiempo para alcanzar dicha concentración (Tmax) se obtuvieron directamente de los datos de concentración salival vs. tiempo. La constante de eliminación (Ke) se estimó como (-) la pendiente de la recta calculada por regresión lineal de los últimos puntos ln-transformados de cada curva, y la semivida de eliminación ( $t_{1/2}$ ) se calculó como  $0,693/Ke$ . Para obtener  $ABC_{0-inf}$  fue necesario sumar a  $ABC_{0-t}$  el tramo extrapolado desde 48 horas hasta infinito, calculado como la última concentración medida ( $C_{48}$ ) dividida por Ke.

Una vez que se calcularon los parámetros farmacocinéticos Cmax,  $ABC_{0-t}$ ,  $ABC_{0-inf}$  y  $Cmax/ABC_{0-t}$  para todos los voluntarios en todos los períodos, se realizó un ANAVA al 5% de significación con los datos ln-transformados. Como efectos fijos se consideraron: período, secuencia, individuos dentro de cada secuencia, formulación e interacción Individuo\*Formulación. A partir del ANAVA se estimaron las varianzas intra e inter individuales, sin distinguir por formulación.

A continuación se realizó el análisis de la Bioequivalencia Individual (BEI), mediante el método de escalado mixto recomendado por la FDA (FDA/CDER, 2001) y mencionado en la introducción de este capítulo. Este método consiste en referir los cálculos a la varianza intra individual del producto R ( $\sigma^2_{R,intra}$ ) o a una varianza constante ( $\sigma^2_{0,intra} = 0,04$ ), la que sea mayor. En nuestro caso, el análisis fue siempre escalado a la constante, ya que la varianza intra individual de R fue menor a 0,04 para todos los parámetros considerados. Por lo tanto, la ecuación correspondiente fue la Ecuación 3-4.

Como además se tiene que:

$$\sigma_D^2 = \sigma_I^2 - \frac{1}{2}(\sigma_{T,intra}^2 + \sigma_{R,intra}^2)$$

■ Ecuación 3-7

Reemplazando la Ecuación 3-7 en la Ecuación 3-4 y reordenando se llega a:

$$\eta_2 = (\mu_T - \mu_R)^2 + \sigma_I^2 + 0,5 \cdot \sigma_{T,intra}^2 - 1,5 \cdot \sigma_{R,intra}^2 - \sigma_{0,intra}^2 \cdot \theta_I^2 \leq 0$$

■ Ecuación 3-8

Donde  $\eta_2$  es lo que realmente se calcula, y se denomina “estima puntual del criterio lineal de BEI”,  $\mu_T$  y  $\mu_R$  son las medias de los parámetros farmacocinéticos ln-transformados mientras que  $\sigma_{T,intra}^2$  y  $\sigma_{R,intra}^2$  son las varianzas intra individuales de T y R, respectivamente;  $\sigma_I^2$  es la varianza debida a la interacción I\*F que se obtiene del ANAVA y  $\theta_I^2$  es el límite de BE, 2,495 (ver la introducción de este Capítulo).

Las varianzas intra individuales de T y R se calculan de la siguiente manera (se presentan las ecuaciones para T, las correspondientes a R resultan de reemplazar T por R):

$$\sigma_{T,intra}^2 = \frac{1}{2 \cdot (N-s)} \sum_{i=1}^s \sum_{j=1}^{n_i} (T_{ij} - \bar{T}_i)^2$$

■ Ecuación 3-9

Donde:

$$T_{ij} = Y_{ij,T_1} - Y_{ij,T_2}$$

Es decir, se calculan todas las diferencias  $T_{ij}$  en el parámetro farmacocinético deseado (Y) para un sujeto j dado, en una secuencia i dada, luego se suman los cuadrados y se dividen por  $2(N-s)$  de las diferencias entre dichas  $T_{ij}$  y el promedio de las mismas. Y análogamente para la formulación de referencia R.

Ahora bien, se dijo al inicio de este Capítulo que este método consistía en determinar el límite superior de un test unilateral, y eso es equivalente a calcular el límite superior del IC 95% de  $\eta_2$ . Si dicho valor es menor que cero, las formulaciones T y R se consideran BEI. A continuación, la Tabla 3-5 presenta las fórmulas correspondientes, y puede verse que para el cálculo lo que se hace es desglosar la Ecuación 3-8 en cada uno de sus términos (E), calcular el límite superior de sus IC 95% (H) y finalmente combinarlos en otro parámetro (U) que permita conocer el límite de confianza (U) total o de  $\eta_2$ .

**Tabla 3-5.** Método matemático empleado para el cálculo del límite superior del Intervalo de Confianza 95% de la estima puntual del criterio lineal –escalado a una constante– de BEI ( $\eta_2$ ) (FDA/CDER, 2001)

Términos de la ecuación	Estima (E <sub>i</sub> )	Límite de confianza (H <sub>i</sub> )	U <sub>i</sub> = (H <sub>i</sub> -E <sub>i</sub> ) <sup>2</sup>
Diferencia de medias (D)	$E_D = (\mu_T - \mu_R)^2$	$H_D = \left[  \mu_T - \mu_R  + t_{(0,95;N-s)} \left( \frac{1}{s^2} \sum_{i=1}^s \frac{\sigma_i^2}{n_i} \right)^{1/2} \right]^2$	U <sub>D</sub>
Interacción I*F (I)	$E_I = \sigma_I^2$	$H_I = \frac{(N-s) \cdot \sigma_I^2}{\chi_{(0,05;N-s)}^2}$	U <sub>I</sub>
Varianza intra individual de T	$E_T = 0,5 \cdot \sigma_{T,intra}^2$	$H_T = \frac{0,5 \cdot (N-s) \cdot \sigma_{T,intra}^2}{\chi_{(0,05;N-s)}^2}$	U <sub>T</sub>
Varianza intra individual de R	$E_R = -1,5 \cdot \sigma_{R,intra}^2$	$H_R = \frac{-1,5 \cdot (N-s) \cdot \sigma_{R,intra}^2}{\chi_{(0,95;N-s)}^2}$	U <sub>R</sub>
Término constante	$E_C = \sigma_{0,intra}^2 \cdot \theta_I^2$		

*Límite superior del 95% de confianza de  $\eta_2 = \sum E_i + \sqrt{\sum U_i}$*

En la tabla anterior,  $n_i$  es el número de voluntarios por secuencia,  $N$  el número total de voluntarios,  $s$  el número de secuencias y  $t_{(0,95;n-s)}$  y  $\chi_{(0,95;n-s)}^2$  son los estadísticos de Student y Chi-Cuadrada con  $(N-s)$  grados de libertad, respectivamente.

Por otro lado, se realizaron tres análisis de BEM diferentes: uno con todos los datos, promediando las dos administraciones de cada producto, y otros dos tomando solo los datos de los períodos 1-2 y 3-4, respectivamente. Al igual que para la BEI, fue necesario realizar previamente un ANAVA con los datos ln-transformados de los parámetros (con período, secuencia y formulación como efectos fijos) al 5% de significación. Se concluyó BEM si el IC 90% de la media geométrica del cociente de los parámetros estudiados se encontraba comprendido entre 80-125%, acorde a lo que establece la autoridad sanitaria de nuestro país.

La determinación del tamaño de muestra se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de la FDA (apéndice C de la guía FDA/CDER, 2001). Para ello fue necesario estimar las desviaciones estándar (SD) intra individual y de la interacción Individuo\*Formulación a partir de un estudio previo encontrado en bibliografía de BE de PHT en plasma (Schumaker & Metzler, 1998), según el cual ambas SD podían ser razonablemente estimadas como menores a 0,15. Asumiendo lo anterior, se tiene que para un estudio de BEI 4x2 son suficientes 24 voluntarios para proveer a los resultados de una potencia estadística del 80%. Una vez finalizado el estudio, los resultados obtenidos confirmaron que dichas estimas habían sido correctas.

### Resultados y discusión

Los parámetros farmacocinéticos promedio obtenidos luego de la administración oral de dos formulaciones de PHT 100 mg cápsulas de liberación inmediata empleando saliva como fluido de análisis se presentan en la Tabla 3-6. Los valores allí incluidos

son el promedio de dos períodos para cada formulación (N = 48). Por otro lado, no se observaron efectos adversos por la medicación administrada a lo largo del estudio. En todos los casos, los interrogatorios realizados a los voluntarios acerca de la aparición de síntomas no habituales luego de cada administración fueron satisfactorios.

**Tabla 3-6.** Parámetros farmacocinéticos obtenidos luego de la administración oral de dos formulaciones de PHT 100 mg, cápsulas de liberación inmediata a 24 voluntarios sanos. Los valores presentados son el promedio de dos períodos para cada producto (en el caso de Tmax se presenta la mediana en vez de la media de manera que el valor informado sea un punto realmente muestreado). SD: desviación estándar

<b>Parámetro</b>	<b>Producto F</b>	<b>Producto G*</b>
<b>Cmax (mg/l)</b>		
<i>Media (SD)</i>	0,205 (0,024)	0,210 (0,026)
<i>Rango</i>	0,138 - 0,239	0,141 - 0,253
<b>Tmax (h)</b>		
<i>Mediana</i>	5,0	4,0
<i>Rango</i>	2,0 - 8,0	2,0 - 6,0
<b>ABC<sub>0-t</sub> (mg.h/l)</b>		
<i>Media (SD)</i>	3,72 (0,66)	3,74 (0,70)
<i>Rango</i>	2,51 - 5,57	2,55 - 6,04
<b>ABC<sub>0-inf</sub> (mg.h/l)</b>		
<i>Media (SD)</i>	4,08 (0,91)	4,10 (0,98)
<i>Rango</i>	2,71 - 7,48	2,76 - 8,41
<b>Cmax/ABC<sub>0-t</sub> (1/h)</b>		
<i>Media (SD)</i>	0,056 (0,008)	0,057 (0,009)
<i>Rango</i>	0,039 - 0,076	0,039 - 0,076
<b>Ke (1/h)</b>		
<i>Media (SD)</i>	0,055 (0,009)	0,056 (0,010)
<i>Rango</i>	0,029 - 0,074	0,028 - 0,076
<b>t<sub>1/2</sub> (h)</b>		
<i>Media (SD)</i>	12,88 (2,62)	12,81 (2,68)
<i>Rango</i>	9,31 - 24,14	9,34 - 24,97

Las figuras presentadas a continuación muestran los perfiles de concentración vs. tiempo obtenidos para cada una de las especialidades ensayadas. La Figura 3-4 muestra los perfiles agrupados por secuencia (es decir, para cada formulación se promediaron los datos de dos períodos de manera de agruparlos por secuencia -RTTR y TRRT-, N = 24), mientras que la Figura 3-5 muestra los datos promedio de todo el estudio para cada formulación (N = 48).

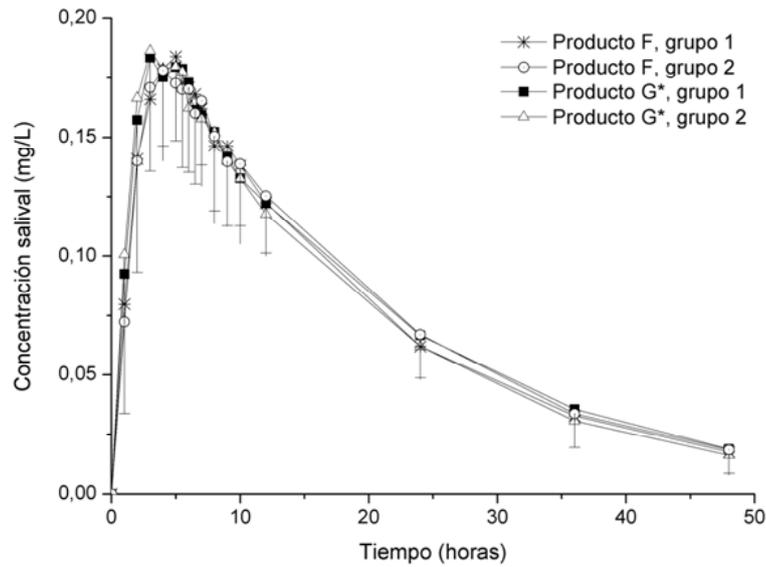


Figura 3-4. Perfiles de concentraciones salivales medias (N = 24) versus tiempo de cada grupo de voluntarios (promedio de dos períodos) luego de la administración oral de los productos F y G\*, ambas cápsulas de liberación inmediata conteniendo 100 mg de PHT. Las líneas verticales representan la desviación estándar de las concentraciones medias (sólo se muestra el tramo descendente, con -prod. F- o sin -prod. G- segmento horizontal en el extremo)

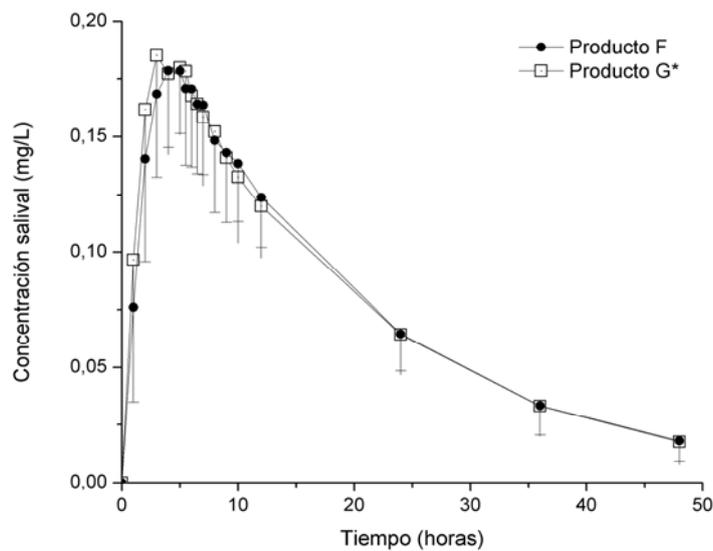


Figura 3-5. Perfiles de concentraciones salivales medias (N = 48) versus tiempo obtenidos para cada una de las dos formulaciones ensayadas (productos F y G\*), ambas cápsulas de liberación inmediata conteniendo 100 mg de PHT. Las líneas verticales representan la desviación estándar de las concentraciones medias (sólo se muestra el tramo descendente, con -prod. F- o sin -prod. G\*- segmento horizontal en el extremo)

La Tabla 3-7 muestra los valores de las varianzas obtenidas (y entre paréntesis el correspondiente *p-valor*) a partir del ANAVA realizado sobre los datos ln-transformados de los parámetros farmacocinéticos  $C_{max}$ ,  $ABC_{0-t}$ ,  $ABC_{0-inf}$  y  $C_{max}/ABC_{0-t}$ . Se observa que los factores considerados no presentaron efectos significativos con excepción del factor formulación, el cual tiene diferencias significativas cuando el parámetro considerado es  $C_{max}$  ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 3-7.** Varianzas (*p-valor*) obtenidas mediante el ANAVA de los parámetros farmacocinéticos ln-transformados Cmax, ABC<sub>0-t</sub>, ABC<sub>0-inf</sub> y Cmax/ABC<sub>0-t</sub> resultantes del estudio de BEI realizado. GL: grados de libertad. La varianza correspondiente a la interacción I\*F es la estima de  $\sigma_i^2$  empleada en las ecuaciones de cálculo. Las varianzas intra individuales de las formulaciones T y R se calcularon a partir del ANAVA acorde a la Ecuación 3-9

Fuente de Variación (GL)	Parámetros farmacocinéticos			
	Cmax	ABC <sub>0-t</sub>	ABC <sub>0-inf</sub>	Cmax/ABC <sub>0-t</sub>
<b>Inter individual (23)</b>	<b>0,0606</b>	<b>0,1101</b>	<b>0,1504</b>	<b>0,0613</b>
<i>Dentro de las secuencias (22)</i>	0,0633	0,1150	0,1572	0,0641
<i>Entre las secuencias (1)</i>	0,0029 (>0,05)	0,0003 (>0,05)	0,0006 (>0,05)	0,0013 (>0,05)
<b>Intra individual (72)</b>	<b>0,0026</b>	<b>0,0056</b>	<b>0,0073</b>	<b>0,0065</b>
<i>Entre formulaciones (1)</i>	0,0125 (<0,05)	0,00002 (>0,05)	0,0001 (>0,05)	0,0116 (>0,05)
<i>Entre períodos (3)</i>	0,0059 (>0,05)	0,0006 (>0,05)	0,0017 (>0,05)	0,0075 (>0,05)
<i>Individuo*formulación (22)</i>	0,0028 (>0,05)	0,0042 (>0,05)	0,0054 (>0,05)	0,0046 (>0,05)
<i>Residual (46)</i>	0,0022	0,0067	0,0087	0,0072
ANAVA-CV%	4,62	8,22	9,34	8,52
<i>Varianza Intra Individual de T (<math>\sigma_{T,intra}^2</math>)</i>	0,00255	0,00740	0,00892	0,00764
<i>Varianza Intra Individual de R (<math>\sigma_{R,intra}^2</math>)</i>	0,00171	0,00565	0,00763	0,00610

Los resultados de los tres estudios de BEM realizados (con todos los datos promediados entre períodos, con los datos de los períodos 1 y 2 solamente y con los datos de los períodos 3 y 4 solamente) se presentan en la Tabla 3-8, en la tercera, cuarta y quinta columna, respectivamente. La tabla incluye los valores de la media geométrica del cociente F/G\* de cada parámetro considerado y el IC 90%. Se puede ver que en todos los casos dichos intervalos se encuentran comprendidos dentro del rango 80-125%, por lo que se concluye BE entre las formulaciones F y G por cualquiera de las tres BEM realizadas.

**Tabla 3-8.** Análisis de Bioequivalencia. Se presenta la media geométrica de los cocientes F/G\* de los parámetros farmacocinéticos estudiados y sus respectivos IC 90%

Parámetro Farmacocinético	BE Individual: todos los datos (N = 48)	BE Media con el promedio de todos los datos (N = 24)	BE Media con los datos de los períodos 1 & 2 (N = 24)	BE Media con los datos de los períodos 3 & 4 (N = 24)
<b>Cmax</b>				
<i>Cociente T/R</i>	0,9774	0,9774	0,9817	0,9731
<i>IC 90%</i>	95,53 - 100,01	95,30 - 100,25	94,51 - 101,98	94,00 - 100,74
<b>ABC<sub>0-t</sub></b>				
<i>Cociente T/R</i>	0,9991	0,9991	0,9686	1,0305
<i>IC 90%</i>	95,93 - 104,06	96,76 - 103,16	92,26 - 101,70	98,52 - 107,79

<b>ABC<sub>0-inf</sub></b>				
Cociente T/R	1,0021	1,0021	0,9641	1,0416
IC 90%	95,68 - 104,65	96,63 - 103,92	91,23 - 101,88	98,81 - 109,79
<b>Cmax/ABC<sub>0-t</sub></b>				
Cociente T/R	0,9783	0,9783	1,0135	0,9443
IC 90%	93,79 - 102,04	94,61 - 101,16	95,57 - 107,48	91,07 - 97,91

El análisis de BEI fue escalado a una constante en todos los casos, ya que se verificó que  $\sigma_{WR} \leq \sigma_{W0}$  para todos los parámetros farmacocinéticos considerados (Cmax, ABC<sub>0-t</sub>, ABC<sub>0-inf</sub> y Cmax/ABC<sub>0-t</sub>). En la Tabla 3-9 se presentan los cálculos correspondientes al estudio de BEI: estimación de la diferencia media entre los productos F y G\* –de los parámetros ln-transformados–, la varianza de la interacción Individuo\*Formulación, la varianza intra individual de cada formulación, las especificaciones utilizadas para  $\sigma_{W0}^2$  y  $\theta_p$ , la estima de  $\eta_2$  y el límite superior de su IC 95%.

**Tabla 3-9.** Análisis de BEI. Para cada parámetro farmacocinético (ln-transformado) se presentan los valores de la diferencia media entre los productos F y G\*, la varianza de la interacción individuo\*formulación, la varianza intra individual de cada formulación, la estima de  $\eta_2$  y el límite superior de su IC 95%

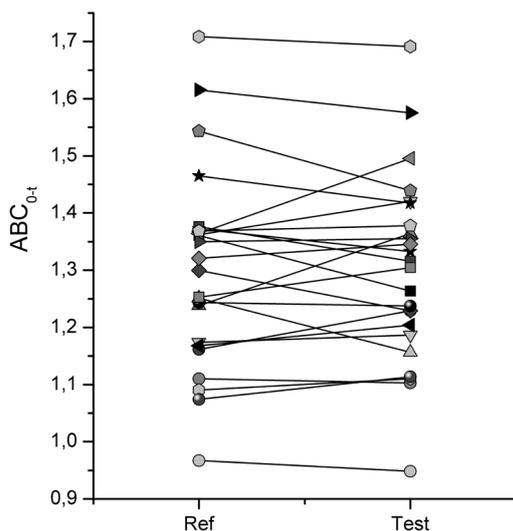
	<b>Cmax</b>	<b>ABC<sub>0-t</sub></b>	<b>ABC<sub>0-inf</sub></b>	<b>Cmax/ ABC<sub>0-t</sub></b>
Estima de $(\mu_T - \mu_R)^2$ (diferencia de las medias ln-transformadas de T y R)	5,21.10 <sup>-4</sup>	7,99.10 <sup>-7</sup>	4,35.10 <sup>-6</sup>	4,81.10 <sup>-4</sup>
Estima de $\sigma_I^2$ (varianza por la interacción I*F)	0,00262	0,00417	0,00539	0,00456
Estima de $\sigma_{R,intra}^2$ (varianza intra individual de la Referencia, G*)	0,00171	0,00565	0,00763	0,00610
Estima de $\sigma_{T,intra}^2$ (varianza intra individual del Test, F)	0,00255	0,00740	0,00891	0,00734
Estima de $\eta_2$ (estima puntual del criterio lineal de BEI escalado a una constante)	-0,09795	-0,10041	-0,10140	-0,10024
Límite superior del IC 95% de $\eta_2$	<b>-0,09545</b>	<b>-0,09510</b>	<b>-0,09456</b>	<b>-0,09462</b>

A partir de la tabla anterior se concluye BEI entre las dos formulaciones estudiadas, ya que el límite superior del IC 95% de la estima  $\eta_2$  fue menor a cero para todos los parámetros farmacocinéticos considerados.

Extensas discusiones, aunque principalmente teóricas, se han sostenido acerca de si los estudios de BEI eran o no necesarios, como así también en qué casos lo eran, qué criterio o especificación debía ser adoptado (escalado o no), el método de cálculo (basado en momentos estadísticos o en probabilidades), limitaciones, ventajas y desventajas (Benet, 1999; Endrenyi & Midha, 1998). Sin embargo, la mayoría de los autores coincidió en la propuesta de aplicar estudios de BEI en aquellos casos en los que se espera una interacción I\*F significativa (como sucede con los productos de liberación prolongada) y/o en el caso de formulaciones que contienen principios activos “críticos” (drogas altamente variables y/o de estrecho margen terapéutico) tales como Warfarina, Carbamazepina y Fenitoína (Anderson & Hauck, 1990; Schall & Williams, 1996), e in-

cluso apareció una guía de la FDA que contempla este diseño con gran detalle (FDA/CDER, 2001). Una droga se considera altamente variable cuando el coeficiente de variación (CV) calculado a partir del ANAVA es  $\geq 30\%$  (Endrenyi & Midha, 1998).

Por lo tanto, la PHT ha sido siempre considerada como candidata para estudios de BEI, y por ello fue la droga empleada en esta sección. Y más aún, como nuestro estudio fue realizado con saliva como fluido biológico, podía esperarse una mayor variabilidad de los datos. Sin embargo, trabajando según el diseño cruzado descrito y luego del cálculo de la variabilidad intra individual de cada formulación, como así también de la interacción I\*F, se encontró que los CV obtenidos fueron menores al 30% (calculados a partir del error residual del ANAVA correspondiente, ver Tabla 3-7) para todos los parámetros farmacocinéticos considerados. Incluso las variabilidades intra individuales fueron similares para las formulaciones Test y Referencia, y la interacción I\*F no fue significativa (ver Figura 3-6). Matemáticamente, esto se tradujo en una simplificación de la Ecuación 3-1 y/o la Ecuación 3-2, las que se convirtieron en las ecuaciones de BEM. Por lo tanto, en nuestro estudio la BE se demostró tanto mediante los cálculos correspondientes a la BEI como así también por las tres BEM realizadas.



**Figura 3-6.** Gráfico de la respuesta media obtenida (el parámetro elegido fue  $ABC_{0-t}$ ) para cada formulación. Cada segmento del gráfico representa un individuo y se promediaron los valores de las dos administraciones de R y T. El efecto conocido como interacción I\*F se observa gráficamente como líneas que se cruzan, ya que eso significa que no todos los individuos reaccionan de igual manera (o en igual "sentido") con R y T. En nuestro ejemplo, sin embargo, la interacción no fue estadísticamente significativa

Estos resultados son coherentes con los de Schumaker y Metzler (Schumaker & Metzler, 1998), ya que en su trabajo la PHT tampoco se comportó como altamente variable ( $CV < 20\%$  para  $C_{max}$ ) y no se encontró un efecto significativo para la interacción I\*F, por lo que la BE entre las dos formulaciones estudiadas fue demostrada por las dos metodologías aplicadas: BEM y BEI. Se pueden encontrar en bibliografía otros ejemplos de esta situación para otras drogas (Christians et al., 2000; Joukhadar et al., 2003; Yacobi et al., 2000), si bien los estudios experimentales de BEI no abundan, posiblemente porque ninguna autoridad sanitaria los ha exigido hasta el momento.

Como se mencionó al inicio de este ensayo, las dos formulaciones de PHT 100 mg, cápsulas de liberación inmediata estudiadas, eran las únicas dos disponibles en el mercado farmacéutico argentino al momento del inicio del estudio, y ninguna de ellas es el producto que ANMAT establece como referencia para los estudios de BE de formulaciones de PHT liberación inmediata. Sin embargo, ambas formulaciones son consideradas BE por los profesionales de la salud, ya que han demostrado ser BE al mismo producto de referencia. Esta situación, denominada “Principio de Transitividad” (presentada en el Capítulo 1 y sobre la que se discutirá con más detalle en el Capítulo 5), suele ser erróneamente asumida como válida a pesar de que se ha demostrado que este principio no siempre se aplica (Anderson & Hauck, 1996; Benet & Goyan, 1995; Midha et al., 1998). En este caso particular, sin embargo, los resultados apoyan al mencionado principio: los productos cuya BE fue probada contra una misma referencia, fueron BE entre sí, aunque no debemos olvidar que se trata de cápsulas, que suelen presentar menores problemas de BD (y por lo tanto mayores probabilidades de declarar BE) que los comprimidos.

Por otro lado, los resultados presentados son coherentes con estudios previamente publicados en los que se emplea plasma como fluido biológico (Melikian et al., 1977; Schumaker & Metzler, 1998), lo que sugiere que la saliva es un fluido comparable al plasma en cuanto a su aplicación en estudios de BDR de PHT. El Capítulo 6 está dedicado precisamente a esto, es decir, a la idoneidad de la saliva como fluido monitoreado durante estudios de BDR. Creemos que la saliva no sólo es apta para su uso en esta clase de estudios, sino que incluso puede resultar de elección, debido a que provee información análoga pero con grandes ventajas analíticas y éticas respecto al plasma.

### 3.3 Simulaciones de estudios de BEM vs. BEI

#### Descripción y objetivos

Se realizaron simulaciones por computadora de estudios de BEM y BEI tomando a PHT como droga modelo, de manera de poder estudiar el desempeño de ambos diseños en función de la modificación de dos variables: la biodisponibilidad relativa de las formulaciones ensayadas y la variabilidad intra individual de la droga contenida en dichas formulaciones. El objetivo fue determinar si la BEI presenta ventajas significativas respecto a la BEM a la hora de garantizar la intercambiabilidad entre dos medicamentos.

#### ● Diseño del estudio

Las simulaciones se llevaron a cabo con el programa Microsoft Office Excel 2007. Solamente se simuló el parámetro farmacocinético área bajo la curva (ABC), debido a su facilidad de cálculo y a que el mismo era suficiente para ejemplificar las situaciones estudiadas. En todos los casos ensayados se consideraron 24 voluntarios sanos.

En primer lugar, el programa simula las constantes farmacocinéticas volumen de distribución ( $V_d$ ) y constante de eliminación ( $K_e$ ) de los voluntarios mediante números aleatorios (número real entre 0 y 1) generados al azar por el programa, a partir de los valores bibliográficos de las constantes y de sus variaciones habituales. También se simulan los valores de biodisponibilidad ( $F$ ) de cada formulación en cada voluntario: en cada uno de los distintos escenarios estudiados, los valores de  $F$  para cada producto

( $F_T$  y  $F_R$ ) se aleatorizaron alrededor de diferentes números (por ejemplo, en el primer escenario ambos valores se variaron en torno a 1, es decir, ambos productos se absorbían totalmente, mientras que en otro caso se asignó el valor 1,05 a  $F_T$ , para estudiar el efecto de una variación del 5% en el cociente, y así sucesivamente). Cada voluntario quedaba descrito entonces como un conjunto de valores  $V_d$ ,  $K_e$ ,  $F_R$  y  $F_T$ .

Una vez que el programa asignaba valores aleatorios a las constantes descriptas, se calculó el  $ABC_R$  y  $ABC_T$  de acuerdo a  $ABC = F \cdot D / V_d \cdot K_e$ , donde  $D$  representa la dosis (igual a 100 mg en todos los casos) y  $F$  es el valor de  $F_R$  o  $F_T$  que el programa haya asignado a ese voluntario. Como se simuló un diseño replicado (cada voluntario recibe dos veces cada formulación), el segundo valor de  $ABC_R$  y  $ABC_T$  se generó a partir del primero, por asignación de distintas variabilidades intra individuales (factor que se quería estudiar). La Figura 3-7 presenta a continuación un ejemplo de la tabla obtenida en cada una de las simulaciones. Como la función "aleatorio" devuelve un número real nuevo cada vez que se actualiza la hoja de cálculo (ejecutando cualquier comando), simplemente con presionar una tecla se obtiene una nueva tabla, lo que equivale a un nuevo estudio de BE.

Por último, se obtuvieron los logaritmos naturales de las cuatro columnas finales ( $ABC$  de cada formulación en cada administración) y con los datos así transformados se calcularon los ANAVA y las BE media e individual correspondientes a cada tabla generada (en el caso de la BEM, se utiliza el promedio de los dos datos de área para cada voluntario, como si fuera una administración única).

Voluntarios	Simulados alrededor de un valor arbitrario (variable a estudiar)				D	Valores calculados según $=F_x \cdot D / V_d \cdot K_e$				
	Valores simulados a partir de datos poblacionales	$V_d$	$K_e$	$F_R$		$F_T$	$ABC_{R1}$	$ABC_{R2}$	$ABC_{T1}$	$ABC_{T2}$
1		48,963	0,070	0,731	1,008	100	21,22	18,641	29,24	12,821
2		74,418	0,040	1,081	1,079	100	35,95	39,525	35,91	18,642
3		96,084	0,050	0,847	1,021	100	17,59	14,461	21,20	18,695
4		56,885	0,032	1,024	0,855	100	56,22	52,772	46,97	52,568
5		58,571	0,062	0,954	0,830	100	26,12	24,272	22,73	20,145
...		...	...	...	...	...	...	...	...	...
22		96,216	0,071	1,038	0,909	100	15,19	21,495	13,31	8,890
23		63,781	0,058	0,980	0,741	100	26,70	25,862	20,18	23,956
24		94,736	0,052	0,726	0,879	100	14,80	11,365	17,91	9,946

Valores simulados a partir de datos poblacionales      Calculados a partir de  $ABC_{x1}$  por asignación de una varianza intra individual arbitraria (variable a estudiar)

Figura 3-7. Tabla obtenida durante las simulaciones. Cada fila representa un voluntario, determinado por un conjunto de valores  $V_d$ ,  $K_e$ ,  $F_R$  y  $F_T$ . La función "aleatorio" es un número entre 0 y 1 generado al azar por el programa. En el caso de la fórmula de cálculo de  $ABC_{R1}$  y  $ABC_{T1}$ , la constante  $F_x$  denomina al valor alrededor del cual se hizo la simulación (1/1, 0,9/1, etc.).

● Valores empleados

■ **Volumen de distribución (Vd):** en función de la información encontrada en bibliografía, se asigna al Vd de PHT el valor de  $0,90 \pm 0,20$  l/kg (*Clarke's analysis of drugs and poisons*, 2004), lo que corresponde a asignarle un CV de 22,2% ( $CV = (s/\mu) \cdot 100$ ). El IC 95% de un valor individual:

$$IC95\% = \bar{X} \pm z \cdot s \Rightarrow \left[ 1 \pm \frac{z \cdot CV}{100} \right] \cdot \bar{X}$$

$$\left[ 1 \pm \frac{1,96 \cdot 22,2}{100} \right] \cdot 0,90 \cong [0,6 - 1,4] \cdot 0,90$$

Por lo tanto, existe el 95% de probabilidades de que un valor de Vd caiga en dicho intervalo. Para generar un número real y aleatorio entre dos números a y b la fórmula que debe introducirse al programa es:

$$=ALEATORIO() \cdot (b-a) + a$$

En nuestro caso:

$$=(ALEATORIO() \cdot 0,8 + 0,6) \cdot 0,90 \cdot 70$$

Se multiplica por 70 kg ya que los valores bibliográficos empleados estaban referidos a 1 kg de peso, y se toman 70 kg como el peso de un individuo promedio.

■ **Constante de eliminación (Ke):** los valores bibliográficos que se pueden encontrar para la semivida de PHT varían considerablemente, ya que por su cinética saturable a altas dosis disminuye la eliminación y por lo tanto se disparan los valores de  $t_{1/2}$ . Es por ello que utilizamos el rango 10-16 horas, el que resulta adecuado para un estudio donde se trabaja muy por debajo de la concentración plasmática de saturación de PHT. Esos valores de  $t_{1/2}$  corresponden a un valor poblacional de Ke de  $0,055 \pm 0,011$  1/h (coherente con el informado en el ensayo anterior, ver Tabla 3-6).

Siguiendo el mismo razonamiento aplicado para Vd, el IC 95% correspondiente es:

$$\left[ 1 \pm \frac{1,96 \cdot 20,0}{100} \right] \cdot 0,055 \cong [0,6 - 1,4] \cdot 0,055$$

Y la fórmula introducida en el programa:

$$=(ALEATORIO() \cdot 0,8 + 0,6) \cdot 0,055$$

■ **Área bajo la curva (ABC):** las ABC, tanto del producto T como del producto R, se calcularon de la siguiente manera (la dosis se fijó en 100 mg en todos los casos):

$$ABC_R = \frac{F_R \cdot Dosis}{Vd \cdot Ke} \quad y \quad ABC_T = \frac{F_T \cdot Dosis}{Vd \cdot Ke}$$

Estas fórmulas son válidas para drogas de farmacocinética lineal (es decir, aumento monótono de ABC en función de la dosis). A pesar de la cinética saturable de PHT, en concentraciones menores a 10 mg/l se puede aproximar linealidad. La Tabla 3-6 muestra que los valores de Cmax obtenidos en saliva luego de la administración de una dosis única de 100 mg de PHT no superaron nunca los 0,21 mg/l. Suponiendo una relación Plasma/Saliva de PHT igual a 10 (*Clarke's analysis of drugs and poisons*, 2004), ese valor equivale a una concentración plasmática máxima de 2,1 mg/l, por lo que es correcta la aproximación lineal utilizada.

■ Biodisponibilidad (F): ésta es una de las variables que se desea estudiar, y por lo tanto le fueron asignados distintos valores a la F de cada formulación en los distintos escenarios planteados. Las fórmulas utilizadas fueron:

Producto Test: 
$$=(\text{ALEATORIO}) * 0,3 + 0,7 * F_T$$

Producto Ref.: 
$$=(\text{ALEATORIO}) * 0,3 + 0,7 * F_R$$

De esa manera, los valores generados nunca superan la unidad y tienen un CV = 10%.

Escenario 1: Dos productos con igual biodisponibilidad ( $F_T = F_R = 1$ )

Escenario 2: Diferencia T-R del 5% ( $F_T = 0,95$  y  $F_R = 1$ )

Escenario 3: Diferencia T-R del 10% ( $F_T = 0,90$  y  $F_R = 1$ )

Escenario 4: Diferencia T-R del 15% ( $F_T = 0,85$  y  $F_R = 1$ )

■ Varianza Intra Individual ( $\sigma_{intra}^2$ ): ésta es la otra variable que se desea estudiar, y por lo tanto le fueron asignados distintos valores a la  $\sigma_{intra}^2$  de cada formulación en los distintos escenarios planteados. Las fórmulas utilizadas fueron:

Producto Test: 
$$ABC_{T2} = (\text{ALEATORIO}) * X_1 + X_2 * ABC_{T1}$$

Producto Ref.: 
$$ABC_{R2} = (\text{ALEATORIO}) * X_1 + X_2 * ABC_{R1}$$

De esa manera, para simplificar los cálculos, se asigna igual  $\sigma_{intra}^2$  a ambas formulaciones (propiedad del principio activo). En cada uno de los cuatro escenarios descriptos anteriormente, se simularon a su vez las siguientes sub-situaciones:

$\sigma_{intra}^2 = 10\%$ : En ese caso,  $X_1 = 0,4$  y  $X_2 = 0,8$

$\sigma_{intra}^2 = 15\%$ : En ese caso,  $X_1 = 0,6$  y  $X_2 = 0,7$

$\sigma_{intra}^2 = 20\%$ : En ese caso,  $X_1 = 0,8$  y  $X_2 = 0,6$

$\sigma_{intra}^2 = 25\%$ : En ese caso,  $X_1 = 1,0$  y  $X_2 = 0,5$

$\sigma_{intra}^2 = 30\%$ : En ese caso,  $X_1 = 1,2$  y  $X_2 = 0,4$

$\sigma_{intra}^2 = 35\%$ : En ese caso,  $X_1 = 1,4$  y  $X_2 = 0,3$

$\sigma_{intra}^2 = 40\%$ : En ese caso,  $X_1 = 1,6$  y  $X_2 = 0,2$

Por último, y antes de pasar a los resultados, cabe destacar que el objetivo de estas simulaciones no estuvo centrado en la exactitud de los resultados (obtención de valores de ABC idénticos a los reales), sino en el estudio del método de cálculo, es decir, en cómo se modifica la conclusión de BEM y BEI en función del cociente de las medias geométricas del parámetro farmacocinético evaluado para ambos productos (T/R) y de la varianza intra individual de la droga en estudio. Sin embargo, los valores de ABC generados durante nuestras simulaciones fueron extremadamente similares a valores reales informados en la literatura (Melikian et al., 1977).

## Resultados y discusión

La Tabla 3-10 muestra de manera resumida los resultados obtenidos en los estudios de BE simulados según la metodología descrita (para cada relación T/R ensayada se realizaron 100 simulaciones por cada una de las varianzas intra individuales estudiadas).

**Tabla 3-10.** Resultados de las simulaciones (n=100 en cada caso). Se presentan, para cada uno de los escenarios de T/R ensayados, los valores medios (y el rango entre corchetes) del cociente T/R, el CV del ANOVA correspondiente a la BEM y los CV intra individuales de ambas formulaciones calculados durante la BEI. También se informa el número de ensayos donde se concluyó BE (BEM y BEI, esta última escalada a una constante o a la referencia [cte/ref])

	Varianza intra individual asignada (CV%)						
	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%
<b>T/R (1/1)</b>	1,010 [0,91-1,08]	1,005 [0,93-1,11]	1,010 [0,92-1,08]	0,995 [0,85-1,09]	1,009 [0,90-1,16]	1,011 [0,82-1,12]	0,998 [0,86-1,16]
CV BEM	11,53 [6,5-15,9]	13,25 [8,6-17,6]	15,05 [11,4-20,6]	17,46 [13,2-24,9]	20,38 [14,7-25,5]	22,13 [15,8-32,4]	26,78 [21,6-38,3]
CV intra-R	8,21 [6,0-10,3]	12,53 [9,6-15,4]	17,30 [14,0-20,9]	21,82 [17,0-26,1]	28,10 [19,8-34,5]	33,60 [23,2-43,1]	41,79 [25,1-50,6]
CV intra-T	8,29 [5,3-10,4]	12,49 [8,6-15,7]	17,06 [12,9-20,9]	21,93 [14,2-27,8]	26,82 [20,0-33,7]	33,18 [22,4-45,2]	41,12 [28,8-54,0]
BEM	100	100	100	99	95	88	85
BEI	100/2	99/10	92/45	71/64	40/80	33/81	8/83
<b>T/R (0,95/1)</b>	0,954 [0,86-1,02]	0,957 [0,89-1,03]	0,955 [0,84-1,05]	0,958 [0,86-1,09]	0,950 [0,86-1,08]	0,965 [0,80-1,11]	0,956 [0,81-1,18]
CV BEM	11,44 [8,4-15,8]	13,22 [10,2-16,1]	15,26 [9,7-18,4]	17,30 [11,8-24,9]	20,78 [15,3-26,2]	22,62 [14,4-31,7]	26,87 [21,1-38,4]
CV intra-R	8,08 [5,0-9,8]	12,32 [9,9-14,5]	17,14 [12,4-21,6]	21,65 [16,2-27,3]	27,09 [16,6-34,3]	32,82 [21,6-42,5]	41,51 [25,5-53,9]
CV intra-T	8,28 [6,1-10,3]	12,36 [10,0-15,1]	17,14 [13,5-21,3]	21,51 [16,0-26,8]	27,26 [21,0-39,2]	32,51 [22,2-41,2]	41,42 [23,9-53,4]
BEM	100	100	98	95	92	81	73
BEI	100/1	100/12	85/41	65/64	32/75	24/79	7/85
<b>T/R (0,90/1)</b>	0,899 [0,84-0,96]	0,898 [0,83-0,98]	0,890 [0,80-1,00]	0,907 [0,76-1,00]	0,906 [0,79-1,06]	0,889 [0,80-1,02]	0,910 [0,74-1,05]
CV BEM	11,35 [7,9-15,0]	13,43 [8,9-18,8]	15,56 [11,6-19,4]	18,20 [13,6-24,8]	20,07 [15,3-27,2]	23,54 [17,1-31,4]	26,06 [16,1-32,6]
CV intra-R	8,54 [6,3-11,4]	12,19 [9,4-16,1]	16,42 [12,8-20,7]	22,33 [15,7-28,6]	27,02 [16,2-33,3]	32,96 [21,7-43,1]	40,91 [30,2-52,8]
CV intra-T	7,96 [6,4-9,4]	12,13 [9,6-15,7]	17,15 [12,3-20,5]	21,87 [16,1-27,1]	27,94 [21,8-35,8]	33,99 [23,3-43,2]	40,01 [27,4-48,9]
BEM	98	88	82	75	67	39	45
BEI	100/2	98/2	71/23	53/51	35/70	12/67	11/79
<b>T/R (0,85/1)</b>	0,851 [0,78-0,91]	0,846 [0,77-0,90]	0,850 [0,78-0,92]	0,861 [0,75-1,01]	0,850 [0,76-0,99]	0,858 [0,77-0,98]	0,859 [0,71-1,02]
CV BEM	11,93 [8,7-15,2]	13,19 [10,1-17,9]	15,31 [12,1-19,3]	17,63 [12,1-25,7]	20,08 [14,7-26,1]	23,63 [18,0-30,9]	26,26 [19,1-40,9]
CV intra-R	8,24 [7,1-9,6]	12,20 [9,0-15,8]	17,05 [11,8-22,1]	21,68 [17,2-28,2]	27,38 [20,2-33,0]	33,56 [22,3-44,3]	42,46 [30,6-53,9]
CV intra-T	8,33 [6,7-9,6]	12,24 [9,0-15,1]	16,68 [12,2-21,3]	21,89 [14,9-29,1]	26,81 [18,9-35,3]	34,01 [23,1-43,9]	40,64 [27,1-54,5]
BEM	62	56	38	44	20	26	16
BEIcte/ref	90/0	70/0	60/20	58/36	24/66	12/76	10/84

La Figura 3-8 grafica los resultados de la tabla anterior. Cada relación R/T ensayada se presenta como un gráfico diferente, mientras que los CV intra individuales constituyen el eje x. En cada caso, se presenta el número de ensayos “positivos” (es decir, en los que se concluye BE entre R y T) según las tres metodologías de BE: BEI escalada a una constante (gris más claro, en el frente), BEI escalada al producto de referencia (gris intermedio) y BEM (gris oscuro, detrás).

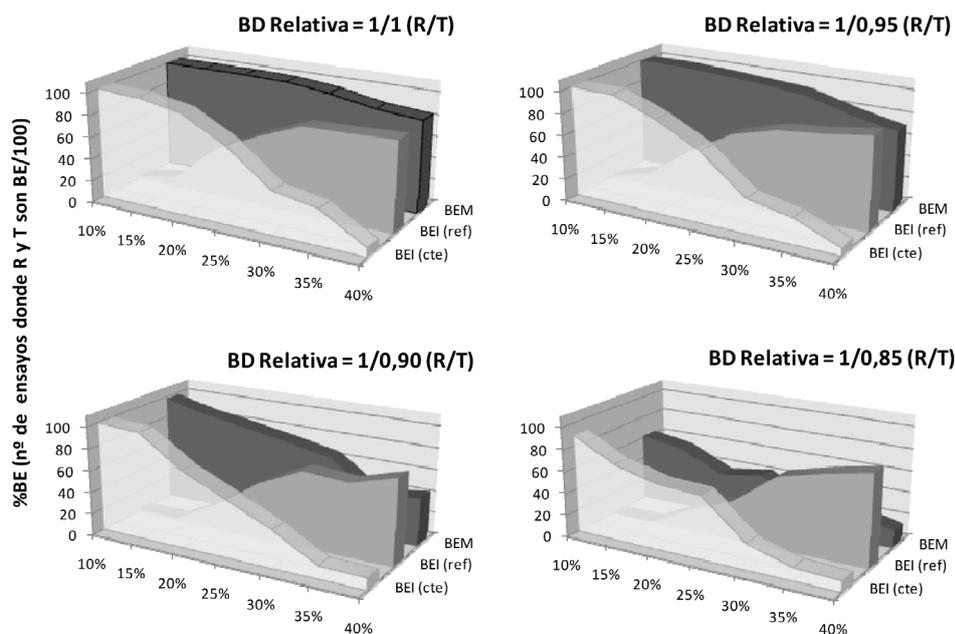


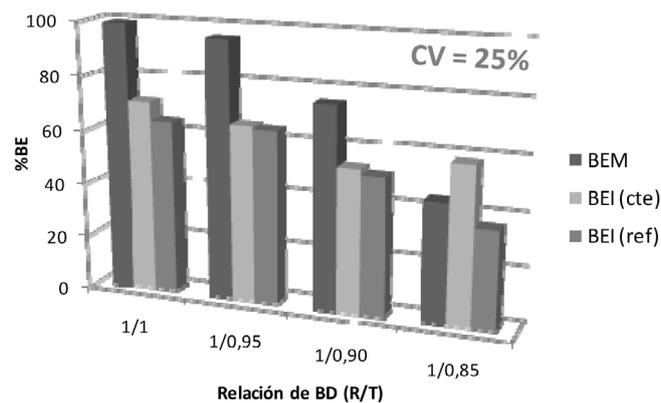
Figura 3-8. Comportamiento de los diferentes estudios de BE (BEM en gris oscuro, BEI escalada a una constante –gris más claro– y a la referencia –gris intermedio–) en función del coeficiente de variación intra individual de la droga ensayada (eje x) y de las distintas relaciones de BD R/T (cada una en un gráfico diferente). El eje y representa el número de ensayos donde se concluye BE entre los productos ensayados (sobre un total de 100 en todos los casos)

Si nos detenemos en el gráfico correspondiente a una BDR del 100% (R/T = 1/1 en la Figura 3-8), observamos que:

- cuando el CV de la droga es bajo ( $CV \leq 20\%$ ), se concluye BEI (con el criterio escalado a una constante) prácticamente en el mismo número de casos que BEM;
- cuando el CV de la droga es alto ( $CV \geq 30\%$ ) sucede lo mismo, pero empleando el criterio de BEI escalado a la referencia en vez de a una constante ( $BEI_{(ref)}$  en el gráfico);
- en la zona de CV entre 20% y 30% es donde se producen las mayores discrepancias: mientras que en dicha zona se concluye BEM en casi el 100% de los casos, hay una región donde ninguno de los dos criterios de BEI da positivo (en aproximadamente el 30% de los casos).

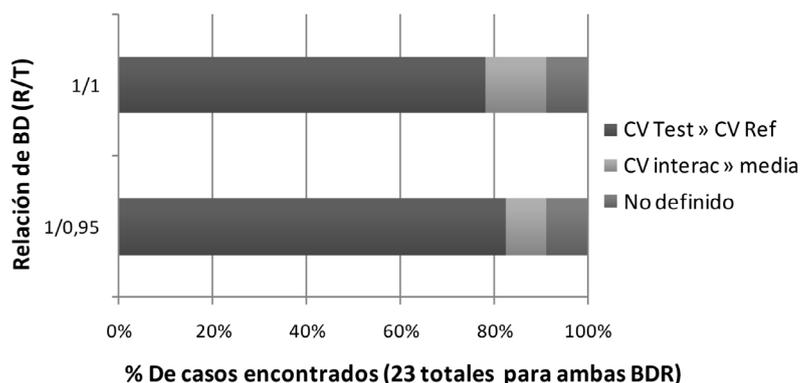
Por otro lado, en la Figura 3-8 también se observa que a medida que la BDR entre los productos R y T se aleja de la unidad las tendencias descritas anteriormente se mantienen, si bien disminuye el número total de casos donde se logra concluir BE entre R y T (disminución en el eje vertical). Esta disminución, a su vez, es más pronunciada para la BEM, por lo que cuando los productos comienzan a diferir más en su BD es más probable concluir BEI que BEM, y esto es más pronunciado a su vez a mayores CV (si recordamos la Ecuación 3-1, el criterio de la BEM recae exclusivamente en la diferencia de medias). El resultado es que, a mayores diferencias entre la BD de R y T, la BEM se convierte en una prueba más exigente que la BEI, y *mucho* más exigente en el caso de CV elevados.

Queda por establecer qué sucede en la región de CV intermedios. Para ello vamos a analizar el caso de  $CV = 25\%$ , ya que como se ve en las Figuras 3-8 y 3-9, alrededor de dicho valor es donde se observan las mayores discrepancias entre los resultados de BEM y BEI. La guía de la FDA establece que cuando el CV es cercano al valor de cambio de criterio (20%) pueden ensayarse ambos tipos de escalado (FDA/CDER, 2001). Por lo tanto, vamos a analizar los casos en los que ninguno de los dos criterios permite concluir BEI, mientras que sí se concluye BEM.



**Figura 3-9.** Resultados positivos de BEM, BEI-cte y BEI-ref en función del cociente R/T, cuando la varianza intra individual de la droga se fija en 25%. En la Figura 3-8 se veía que alrededor de  $CV=25\%$  se producían las mayores discrepancias entre los resultados de BEM vs. BEI. Aquí se observa que dichas discrepancias son aún mayores –y prácticamente iguales– para los casos en los que R/T se fija en 1/1 y 1/0,95

Dichos casos se presentan en la Figura 3-10. Allí se analizan las posibles causas por las que no se concluye BEI en aquellos casos en los que sí se concluyó BEM, en los escenarios representados por  $R/T = 1/1$  y  $1/0,95$  (ya que esos dos son aquellos que presentaron las mayores discrepancias entre BEM y BEI, como se veía en la Figura 3-9). Puede observarse que en aproximadamente el 80% de los casos donde no se concluye BEI pero sí BEM se debe a la situación en la cual el CV del producto T es mayor al de R. Esto no sería correcto porque si el CV de R es mayor al de T en igual proporción sí se puede concluir BEI. Y si pensamos en lo verdaderamente importante, los cambios que el paciente puede sufrir cuando intercambia T por R o R por T, resulta indistinto cuál de los dos productos tiene la mayor variación.



**Figura 3-10.** Análisis de las posibles causas de discrepancia entre los estudios de BEM vs. BEI. Se analizan los resultados donde se concluye BEM pero no BEI (en ninguno de los dos casos de escalado posible), para las relaciones R/T de 1/1 y 1/0,95 (donde las diferencias eran mayores y casi iguales). El eje de abscisas representa el porcentaje de dichos casos que pueden atribuirse a los motivos representados con diferentes tonos de gris

La otra causa que produce la falta de BEI en nuestras simulaciones es una varianza debida a la interacción I\*F por encima de la media, en aproximadamente el 9-14% de los casos. Debido a la metodología de las simulaciones, la interacción I\*F queda determinada al azar, lo que en la realidad no sucede, ya que en los casos en los que verdaderamente existe dicha interacción ésta tiene un sentido determinado. Se han reportado, por ejemplo, interacciones del tipo raza\*formulación o edad\*formulación. Sin embargo, existe consenso en la literatura en cuanto a que la interacción I\*F no suele ser importante para las formas de liberación inmediata, y que por el contrario tiene tendencia a ocurrir en el caso de productos de liberación modificada (Chen & Lesko, 2001).

La interacción I\*F puede interpretarse como el hecho de que el efecto observado por la formulación es afectado por el individuo, es decir, para algunos individuos  $R > T$  mientras que para otros,  $T > R$ . El análisis de la influencia de esa situación en la intercambiabilidad no es sencillo, pero lo que sí se observa fácilmente es que dicho factor sólo toma preponderancia en el resultado cuando los demás son elevados, lo que dicho de otro modo significa que cuando la BDR es cercana a la unidad y las varianzas bajas, se pueden presentar valores elevados de I\*F y aun así cumplir con el ensayo de BEI.

Si, como se dijo anteriormente, consideramos incorrecto penalizar que el producto Test tenga mayor varianza que R (en una proporción que si se invirtiera permitiría concluir BEI), las discrepancias entre BEM y BEI se reducen al 6%. De ellas, aproximadamente la mitad corresponde a una I\*F elevada, aunque con valores que serían permitidos si el cociente R/T o las varianzas fueran menores. Por lo tanto, en nuestro modelo simulado sólo existe un 3% de discrepancias reales e injustificadas entre BEM y BEI (sin explicación clara, tal vez debidas a una sumatoria de pequeños efectos).

No se puede dejar de reconocer que los resultados discutidos hasta aquí provienen de simulaciones, por lo que es posible que los porcentajes mencionados se modifiquen en la realidad. Sin embargo, creemos que lo discutido acerca de las tendencias de los resultados de estudios de BEM y BEI continuaría siendo válido. Una prueba de esto es que los estudios de BEI han sido propuestos como alternativa a los estudios de BEM en el caso de (Schall & Endrenyi, 2010):

- fármacos con cinéticas altamente variables (FAVs), es decir, cuya varianza intra individual supera el 30%;
- fármacos de estrecho margen terapéutico (FEMTs).

Como se señaló al inicio de este capítulo, al principio fueron pensados para asegurar la intercambiabilidad de medicamentos durante un tratamiento (independientemente de la droga en cuestión), pero paulatinamente se abandonó la idea de su aplicación en general para comenzar a proponerlos como alternativa en los dos casos recién mencionados, donde se pensaba que los estudios de BEM fallaban (por resultar muy exigentes o muy permisivos, respectivamente).

Por lo tanto, limitaremos el resto de nuestro análisis a estas dos situaciones. En la primera, y acorde a lo discutido hasta aquí, la recomendación de BEI sobre BEM es en realidad favorable al fabricante: en la zona de altas variabilidades intra individuales es más probable concluir BEI-ref que BEM. En este caso, el interés ya no está centrado en la seguridad del paciente sino en la facilitación experimental de la prueba: no es ético ni viable trabajar con un número excesivo de voluntarios. En la segunda situación, es decir, para productos conteniendo FEMTs, la recomendación de BEI surgió como un intento de ofrecer mayor seguridad a los pacientes que potencialmente intercambiarían los productos T y R.

Sin embargo, la BEI no fue la única alternativa para abordar las dos situaciones anteriores, también existieron otras propuestas, siendo la principal de ellas continuar con la BEM pero modificando los límites de aceptación, tanto de manera prefijada (más estrechos para FEMTs y más laxos para FAVs) como “escalada” a cierta varianza. Surge así la idea de “escalar” el criterio de la BEM: aplicar un algoritmo que modifique estos límites en función de la varianza intra individual de la droga.

El concepto de “escalado” surgió de la observación de las ecuaciones de BE (tanto BEM como BEI): cuanto menor era la variabilidad en las mismas, más alejado de la unidad podía estar el cociente de medias y aún cumplir con los requisitos de BE. A raíz de ello, Schall y Williams (Schall & Williams, 1996) clasificaron a los principios activos según su variabilidad intra individual y su rango terapéutico. De esa manera, se formaban cuatro categorías, como se ve en la Figura 3-11:

		Variabilidad intra individual			
		Baja	Alta		
Toxicidad	Baja	Sin escalar	Escalado	Amplio	Margen Terapéutico
	Alta	Escalado	Sin escalar		

■ **Figura 3-11.** Esquema de la clasificación de drogas propuesta por Schall y Williams en 1996, en función de la variabilidad intra individual y el margen terapéutico de las mismas (Schall & Williams, 1996)

Se sugería que para FEMTs el procedimiento para establecer la BE entre formulaciones debía ser más exigente que el comúnmente aplicado. Por lo tanto, proponían escalar los cálculos si la variabilidad era baja o no escalarlos si era alta. De esa manera, el criterio se vuelve más estricto para drogas de baja variabilidad y permanece constante para FAVs. Por el contrario, en el caso de principios activos de baja toxicidad y amplio

margen terapéutico el razonamiento era a la inversa: sólo se aplicaría el escalado en el caso de FAVs, de manera de flexibilizar el criterio y aumentar así las probabilidades de declarar BE.

En un trabajo realizado por Midha y col. (Midha et al., 1998) se proponía escalar los límites de la BEM de acuerdo a la expresión:

$$\text{Límites de BEM} = e^{\pm k \cdot \sigma}$$

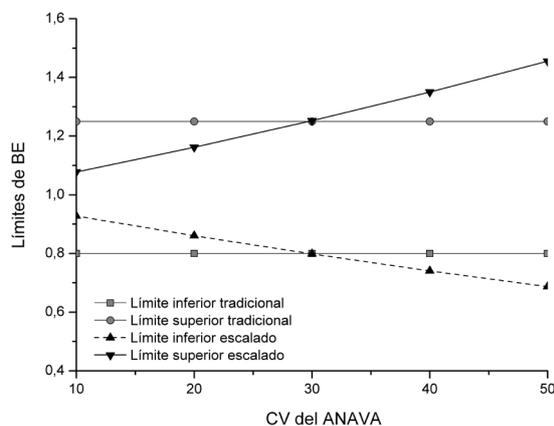
■ Ecuación 3-14

El valor de k se fijaba en 0,75 y  $\sigma = [\ln(s_e^2 + 1)]^{0,5}$ , de manera de obtener un límite superior igual a 1,25 (e inferior igual a 0,8) cuando  $\sigma=0,3$ . En la expresión anterior,  $s_e^2$  es el cuadrado medio residual obtenido en el ANAVA realizado a los datos ln-transformados, por lo que ( $\sigma \cdot 100$ ) representa el coeficiente de variación.

Los autores proponían aplicar este criterio en los siguientes casos:

- para drogas seguras, a partir de ANAVA-CV = 30%, así el criterio es más laxo;
- para drogas inseguras, por debajo de ANAVA-CV = 30%, así el criterio es más exigente;
- en los dos casos restantes, sugieren no escalar y utilizar los límites tradicionales y constantes de 80-125%.

La Figura 3-12 muestra comparativamente los límites obtenidos según la propuesta de los autores y los límites clásicos de los estudios de BE, ambos en función del CV del ANAVA.



■ **Figura 3-12.** Gráfico de los límites de los estudios de BE vs. el CV del ANAVA correspondiente. Las líneas horizontales representan los límites tradicionales y constantes 80-125%, mientras que las rectas con pendiente simbolizan los límites superior e inferior (línea llena y punteada, respectivamente) según el criterio de escalado propuesto

En otro trabajo, los mismos autores demuestran que el criterio de BEI resulta similar a la BEM en 2/3 de los casos presentados en su estudio. Cuando la variabilidad intra individual de la formulación R fue mayor a la de T el criterio de BEI escalado se volvió muy flexible. Más aún, la efectividad de la BEI para detectar una interacción

I\*F fue eliminada por la aplicación de  $\epsilon=0,05$  (valor estipulado por la FDA, ver Ecuación 3-6). Sobre la base de dichos resultados, los autores concluyen que el método de análisis recomendado por la FDA para la BEI no parece tener ninguna ventaja respecto a combinar los métodos actuales de BEM con un escalado, y que si bien el diseño replicado provee de mayor información, ésta no se utiliza efectivamente en el método actualmente recomendado para llegar a la decisión de BE (Midha et al., 1999).

Nuestros resultados están de acuerdo con lo anterior: la información extra que se obtiene al replicar la administración de los productos ensayados no brinda mayores ventajas a la hora de evaluar su BE. Para la mayoría de las drogas los clásicos estudios de BEM resultan satisfactorios para evaluar la similitud de dos medicamentos, mientras que en los casos (minoritarios) donde la BEM podría fallar (FEMTs, FAVs) existen alternativas para mejorar el criterio de aceptación y adecuarlo a cada situación.

Por lo tanto, creemos que los estudios de BEM son idóneos para evaluar comparativamente la calidad biofarmacéutica de los medicamentos (sin que esto signifique que son suficientes para garantizar la *intercambiabilidad* de los mismos, ver Capítulo 4), no justificándose la aplicación de una metodología más compleja, costosa y bioéticamente más cuestionable por implicar mayor número de voluntarios, de administraciones de medicamentos y de muestreos a dichos voluntarios.

## Discusión y conclusiones parciales

En 1992, con la publicación de la guía de BD/BE de la FDA (FDA/CDER, 1992) se podía pensar que finalmente se había llegado al consenso entre los investigadores y los organismos reguladores acerca del concepto central de la BE. Irónicamente, alrededor de ese año también surgió el nuevo concepto de BEI, lo que originó una nueva era de investigación y discusión, y probablemente más controversia que antes.

Anderson y Hauck, dos bio-estadistas de los EEUU, señalaron que el diseño clásico de BEM sólo garantizaba que la BD de los productos era similar *en promedio*. De esa manera surgió la pregunta: ¿será asegurada la equivalente BD de dos medicamentos en los pacientes individuales mediante la equivalencia en promedio de su BD? Lo que, dicho de otra manera, significa cuestionar que la BEM implique la intercambiabilidad de los medicamentos en los pacientes (Anderson & Hauck, 1990).

A partir de ese momento se publicaron numerosas aproximaciones estadísticas a la BEI (se pueden encontrar buenos reviews de dichos métodos: Chow & Liu, 2009; Schall, 1995). Algunos ejemplos son los trabajos de Wang y Hwang, quienes desarrollaron un test estadístico prácticamente insesgado (*nearly unbiased*) (Wang & Hwang, 2001), mientras que Kimanani y Potvin (Kimanani & Potvin, 1997) propusieron un intervalo de confianza paramétrico, diferente al de Schall y Williams (Schall y Williams, 1996) aunque derivado de éste y basado en el método de los momentos. Finalmente, en 2001 el concepto de BEI fue adoptado en una guía oficial de la FDA (FDA/CDER, 2001).

Sin embargo, posteriormente comenzaron los cuestionamientos a dicha normativa, principalmente acerca de si el nuevo criterio de BEI realmente poseía un valor agregado respecto a la BEM (Hauschke et al., 2007). Surge entonces la observación, crucial para iluminar la cuestión de la validez general de la BEM, de que “no ha existido evidencia probada ni publicada de fallos clínicos con formulaciones que probaron ser BEM respecto al producto de referencia” (Barrett et al., 2000; Gould, 2000). Más aún, la BEI fue llamada una solución “teórica” a un problema “teórico” (Patterson, 2001).

El presente capítulo tenía por objetivo evaluar comparativamente los dos diseños mencionados para los estudios de BE: BEM vs. BEI. Para ello se realizaron dos tipos de ensayos: uno experimental, en voluntarios sanos (sección 3.2) y otros simulados por computadora (sección 3.3). Tanto la aproximación experimental como la simulada permiten arribar a una conclusión similar: los estudios clásicos de BEM son adecuados para la evaluación comparativa de la BD de dos medicamentos en la mayoría de los casos (drogas), presentando ciertos inconvenientes cuando los fármacos en estudio pertenecen al grupo de los fármacos altamente variables (FAVs) y/o fármacos de estrecho margen terapéutico (FEMTs).

Ya en 1998, Endrenyi y Midha concluían que a pesar de las críticas a la BEM no era claro si dicho procedimiento era inadecuado al permitir la comercialización de productos que fueran ineficaces o inseguros (Endrenyi & Midha, 1998), y en un trabajo más reciente, Schall y Endrenyi llegan a una conclusión similar, destacando que el caso de los FAVs y los FEMTs constituyen casos especiales y opuestos que requieren consideraciones especiales (Schall & Endrenyi, 2010).

Es un hecho reconocido que puede ser muy difícil probar la BEM de FAVs mediante la aplicación del rango convencional de 80-125%. Para dichas drogas, pueden llegar a necesitarse muestras de hasta 100 voluntarios o más para poder probar BE. Un ejemplo de esta dificultad es el hecho de que, bajo condiciones de trabajo típicas, un medicamento que contiene un FAV puede no resultar BE consigo mismo (Tothfalusi et al., 2009). Ya en 1996, Tsang y colaboradores planteaban una serie de posibles soluciones al problema de los FAVs, entre ellas el ensanchamiento del IC de BE para C<sub>max</sub>, desde el clásico 80-125% hasta 70-143%, y/o la redefinición de los límites de BE basados en un criterio escalado a la variabilidad intra individual de la droga (Tsang et al., 1996), ambas soluciones potenciales en el caso de FAVs de amplio margen terapéutico.

En cuanto al ensanchamiento del IC para C<sub>max</sub>, la nueva guía de BD/BE elaborada por la EMEA –que aún permanece en su versión preliminar–, admite que en aquellos casos en los que C<sub>max</sub> posea menor importancia para la eficacia y seguridad clínica de un fármaco el criterio de aceptación puede ampliarse hasta 75-133%, siempre que dicha ampliación se encuentre debidamente justificada (y previamente definida) y que se haya replicado la administración del producto R de manera de demostrar que la variabilidad intra individual de C<sub>max</sub> para dicho producto es mayor al 30% (EMEA/CPMP, 2008). Por otro lado, se encuentran las propuestas de criterios de aceptación “escalados” cuyo origen –irónicamente– se encuentra en los estudios de BEI, discutidos en la sección 3.3. Al parecer, esta aproximación es actualmente la preferida por los científicos de la FDA y los investigadores en el tema (Haidar et al., 2008; Tothfalusi et al., 2009).

El caso opuesto lo representan los FEMTs, ya que si es razonable plantear un ensanchamiento del intervalo de BE para drogas FAVs, es igualmente razonable proponer un intervalo más estrecho para los FEMTs (los que a su vez suelen tener baja variabilidad). Dicho estrechamiento podría aumentar la confianza al garantizar la seguridad de los productos genéricos sin imponer estándares desmedidos, tanto experimentales como económicos, a los laboratorios que deben realizar los estudios de BEM para dichas drogas. Al igual que en el caso anterior, la nueva guía europea de BD/BE prevé que “en el caso en que el intervalo de aceptación deba ser ajustado, los límites para concluir BE deberán ser estrechados hasta 90-111% (EMEA/CPMP, 2008)”.

También han surgido propuestas de “escalado” de los límites de la BEM en el caso de FEMTs. En un trabajo reciente acerca de la intercambiabilidad de AEDs, Bialer y

Midha proponen escalar respecto a la varianza intra individual del producto R (Bialer & Midha, 2010). En dicho trabajo los autores fijan el punto de corte entre los criterios con y sin escalado en una varianza de 0,25 y proponen aplicar el escalado *por debajo* de ese valor, es decir, para volver más estricto al criterio de aceptación.

En este punto debemos hacer una distinción. Cualquiera sea el objetivo del escalado (ampliar o reducir el intervalo de BE), se plantean dos opciones:

- escalar en función del error residual del ANAVA previo al cálculo de la BEM, como en el método de escalado de Midha y col. descrito en la sección 3.3 (Midha et al., 1998);
- escalar en función de la variabilidad intra individual del producto R, como en el método de Bialer y Midha (Bialer & Midha, 2010).

Al establecer un límite para el error al azar de una BEM a partir del cual se puede escalar el criterio de aceptación de alguna manera se corre el riesgo de alentar estudios con altas dispersiones. El término del error en una BEM incluye, además de la varianza intra individual y una posible interacción, todos los demás errores y causas de dispersión del estudio. Por lo tanto, creemos que sólo es una opción válida en los casos en los que se demuestra fehacientemente que existe una alta variabilidad intra individual inherente a la droga, y mientras que las demás variables del estudio se hayan mantenido dentro de límites de dispersión aceptables.

Por el contrario, escalar respecto a la varianza intra individual de la referencia tiene la desventaja de requerir administraciones replicadas de dicho producto a los voluntarios, que era precisamente lo que se quería evitar mediante el empleo de BEM en vez de BEI. Si bien todavía no se ha llegado a una metodología definitiva de escalado, esta última aproximación parece ser el método más adecuado y prometedor para abordar el problema de los FAVs y los FEMTs (Schall & Endrenyi, 2010).

En conclusión, creemos que es válida la primera hipótesis planteada al inicio de este trabajo, y que si bien los estudios replicados brindan mayor información que otros diseños (lo que puede justificar su aplicación en ciertas circunstancias en las que se desee evaluar una interacción o una varianza intra individual específica), la BEI constituye una metodología más compleja, costosa, que requiere más tiempo y voluntarios (y mayor número de administraciones y muestreos a dichos voluntarios). Estas desventajas experimentales, económicas y bioéticas, sumadas a la falta de beneficios significativos de la BEI respecto a la BEM, y a la capacidad de ésta última para adaptarse a las situaciones especiales descritas para los FAVs y los FEMTs, mediante la modificación de los límites de aceptación (de manera fija o escalada), hacen que en la mayoría de los casos carezca de justificación la realización de estudios de BEI.

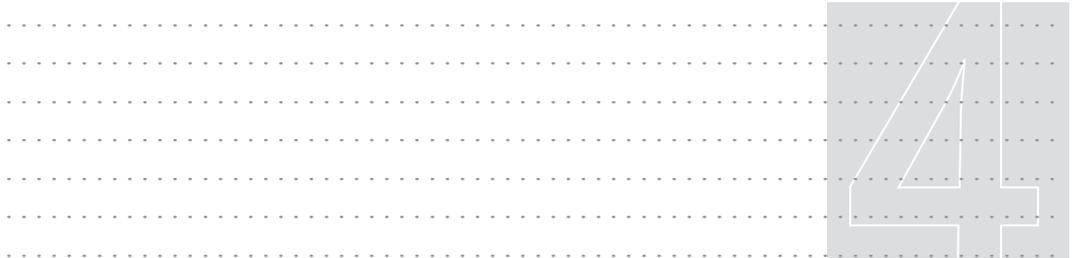


---

---

■ Capítulo 4

**Bioequivalencia vs.  
intercambiabilidad:  
el caso de Carbamazepina**





**C**arbamazepina (CBZ) es una droga del grupo de los iminoestilbenos químicamente relacionada con los antidepresivos tricíclicos. Fue sintetizada en laboratorios Geigy en 1953 como posible competidor del antipsicótico Clorpromazina. Su aplicación en pacientes epilépticos recién fue evaluada en 1963, después de lo cual fue rápidamente comercializada como anticonvulsivo en el Reino Unido en 1965 (Brodie, 2010). En los Estados Unidos, aunque se había utilizado desde la década del 60 para tratar la neuralgia del trigémino, su uso como anticonvulsivo se aprobó en 1974. En la actualidad se considera un medicamento de primera elección para el tratamiento de las crisis parciales y tónico-clónicas generalizadas (Goodman & Gilman, 2006).

CBZ se utiliza como antiepiléptico, analgésico y antimaniaco. Como antiepiléptico pertenece al grupo denominado de “segunda generación” y resulta eficaz frente a las convulsiones tónico-clónicas generalizadas y las crisis parciales, pero no frente a ausencias típicas, mioclonías y convulsiones febriles. Tanto la CBZ como su metabolito activo, 10,11-Epóxido de Carbamazepina (E-CBZ) inhiben la entrada de sodio bloqueando selectivamente las descargas de alta frecuencia. Afecta más a las neuronas normales que propagan la descarga que a las del foco epiléptico e inhibe, a su vez, las descargas paroxísticas más que la transmisión fisiológica, por lo que no interfiere con las funciones cognitivas ni tiene acción sedante. A dosis altas es posible que su acción presináptica reduzca la entrada de calcio e inhiba la liberación de neurotransmisores (Armijo & Herranz, 1998).

Sus características farmacocinéticas son complejas; dependen de su limitada solubilidad acuosa y de su capacidad para autoinducir el metabolismo hepático, incrementando su inactivación enzimática. Administrada por vía oral se absorbe con lentitud y de manera errática, su BD suele aproximarse al 70%. Se distribuye con rapidez por todos los tejidos y el tiempo para alcanzar la C<sub>max</sub> es muy variable, de 4 a 24 horas (Clarke's analysis of drugs and poisons, 2004). Alrededor de un 75% se fija a proteínas plasmáticas (50% para E-CBZ) y las concentraciones en el líquido cefalorraquídeo (LCR) parecen corresponder a la fracción libre en plasma. A causa de la inducción de las enzimas hepáticas, su vida media es mucho más larga en individuos que reciben sólo una dosis (promedio cercano a 40 horas) respecto a quienes reciben tratamiento crónico (alrededor de 20 horas. Ver Figura 4-1) [Florey, 1988].

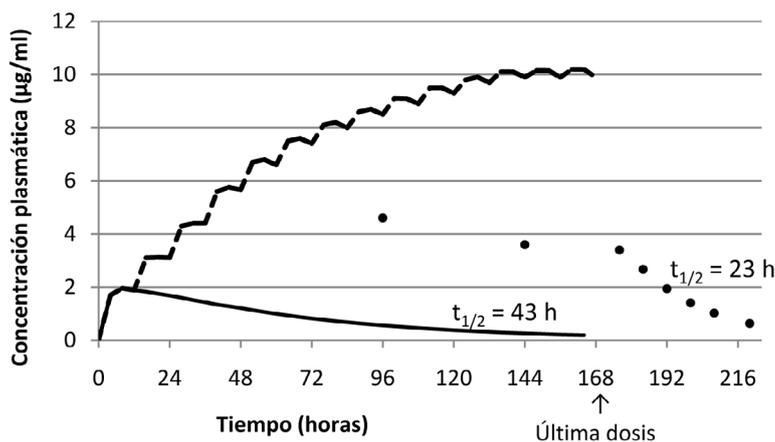


Figura 4-1. Concentraciones plasmáticas de CBZ. La línea entera corresponde a una dosis única de 200 mg ( $t_{1/2} = 43$  horas). La línea punteada corresponde a una simulación por computadora de una posología de 200 mg cada 12 horas con  $t_{1/2} = 43$  horas. Los círculos representan los puntos experimentales obtenidos para dicha posología ( $t_{1/2} = 23$  horas por inducción del propio metabolismo). Adaptado de Cohen Et Pradeau, 1998

Luego de la administración oral de CBZ, el 72% se elimina por orina. Dentro de ese porcentaje, el 80% son metabolitos correspondientes a las tres rutas principales esquematizadas en la Figura 4-2. La más importante es la conversión a 10,11-epóxido por el citocromo P450 CYP3A4. Este metabolito es tan activo como el compuesto original y su concentración puede llegar al 50% de la de CBZ. Es convertido casi completamente en el 10,11-trans-diol correspondiente y éste se elimina por orina en su forma libre o conjugados. Las otras dos rutas principales consisten en hidroxilaciones de los anillos aromáticos. Sólo un 2 ó 3% de la dosis oral se excreta como CBZ o E-CBZ sin metabolizar en la orina (Eichelbaum et al., 1985).

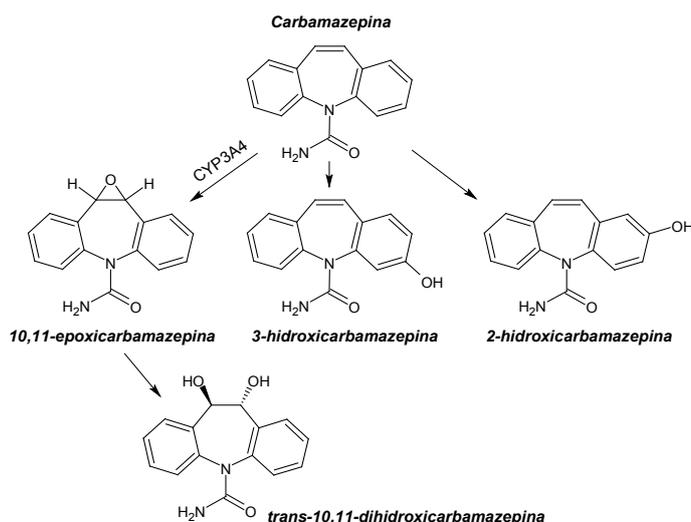


Figura 4-2. Principales vías metabólicas de la CBZ

Debido a su capacidad de inducción del metabolismo, la eliminación de CBZ es dosis-dependiente (Battino et al., 2003; Bernus et al., 1996). Sin embargo, al no poder determinar el clearance (Cl) sistémico de CBZ (por imposibilidad de administración intravenosa), la eliminación dosis-dependiente podría deberse tanto a un aumento del Cl como a una disminución de la BD (F) ( $Cl \text{ aparente} = Cl \text{ sistémico}/F$ ). Garg y colaboradores encontraron que la absorción de CBZ aumentaba cuando era administrada con jugo de pomelo (Garg et al., 1998), inhibidor de las enzimas responsables de la metabolización pre-sistémica de CBZ (CYP3A4) y de la proteína transportadora MRP2 (*multiple resistance protein*) responsable de sacar moléculas de CBZ desde los enterocitos hacia la luz intestinal. Ambas enzimas, CYP3A4 y MRP2 son autoinducidas durante el tratamiento crónico con CBZ (Giessmann et al., 2004). Por lo tanto, el CYP3A4 sería el responsable de la BD incompleta de la droga como así también de la formación presistémica de E-CBZ. De esta manera, no sólo el aumento del Cl sistémico es responsable de la farmacocinética no-lineal de CBZ, sino también su BD dosis-dependiente (Fagiolino et al., 2006).

Por lo tanto, el uso de CBZ presenta numerosas complicaciones: alta variabilidad intra e inter individual en cuanto a la relación dosis/concentraciones plasmáticas, autoinducción del metabolismo hepático, formación de un metabolito activo, estrecho margen terapéutico y múltiples interacciones con otros AEDs, sin contar la existencia de diversas formas polimórficas de CBZ, cada una con diferente velocidad de disolución (Rustichelli et al., 2000). Incluso empleando la misma dosis, las concentraciones plasmáticas de CBZ pueden variar con la edad, el género o la raza (Battino et al., 2003; Hundt et al., 1983; Suzuki et al., 1991). Durante la terapéutica con CBZ es necesario el monitoreo terapéutico (TDM) frecuente (Bourgeois, 2000). El intervalo terapéutico aceptado para CBZ en plasma se encuentra entre 4-12  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , si bien concentraciones cercanas a 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  se han asociado algunas veces con aparición de efectos tóxicos (*Clarke's analysis of drugs and poisons*, 2004).

No es sorprendente, entonces, que exista una historia de problemas relacionados con la terapéutica con CBZ, y particularmente con sus FG, de manera similar a lo que ocurre con los demás AEDs clásicos (como ya se discutió para PHT en el capítulo anterior). Se pueden encontrar numerosos reviews acerca del tema (Besag, 2000; Nuwer et al., 1990; Richens, 1997). La Tabla 4-1 resume algunos de los problemas que se han reportado durante el uso de FG de CBZ o como consecuencia del intercambio de la formulación líder (Tegretol, Lab. Novartis) por FG conteniendo CBZ.

Tabla 4-1. Reportes de problemas encontrados en la literatura que involucran productos conteniendo CBZ

Cita	Pacientes	Hallazgos
(Koch & Allen, 1978)	1 mujer	Aumento de las crisis al cambiar a genérico, con disminución de los niveles de CBZ. Normalización al volver a Tegretol
(Pedersen & Dam, 1985)	1 paciente de 16 años	Niño con epilepsia parcial secundaria a hemiatrofia cerebral controlada con Tegretol. Reaparecen las crisis al cambiar a FG

(Sachdeo & Belendiuk, 1987)	3 pacientes	Pérdida del control de las crisis al cambiar a FG. Normalización al volver a Tegretol
(Hartley et al., 1990)	2 pacientes	Aparición de crisis 3-7 días después de sustituir CBZ original por genérico
(Welty et al., 1992)	2 pacientes	Aparición de crisis y disminución de los niveles plasmáticos tras cambiar CBZ original por genérico
(Gilman et al., 1993)	2 niños de 6 años	Aumento de la Cmax de CBZ de 22 a 41% después de cambiar a genérico, apareciendo toxicidad que desapareció al volver a Tegretol. Un niño fue hospitalizado
(Bell et al., 1993)	1 paciente de 28 años	Aparición de convulsiones tres días después de que una FG de CBZ se mojó por la lluvia. Al ingreso al hospital la concentración plasmática del paciente era 3,8 µg/ml (monitoreos previos habían arrojado valores siempre dentro del intervalo 9-13 µg/ml)
(Mayer et al., 1999)	13 pacientes	Ensayo no-ciego para comparar una FG de liberación sostenida de CBZ con el mismo producto pero de marca líder: 9 de 13 sujetos experimentaron efectos adversos con la FG. Un paciente que sufrió los efectos adversos de CBZ con un aumento en la Cmax menor al 10%

Así como en el capítulo anterior, empleando a PHT como droga modelo, se evaluaron algunos de los distintos diseños estadísticos-experimentales aplicables a estudios de BE, sus beneficios, desventajas y, finalmente, su influencia en la intercambiabilidad de medicamentos, en este capítulo se estudia otra aproximación al problema de la intercambiabilidad: dada una prueba experimental para determinar BE entre dos medicamentos A y B, ¿es la misma capaz de asegurar que todos los pacientes estabilizados con uno de ellos pueden cambiarlo por el otro (A por B o B por A) manteniendo la eficacia y la seguridad de su tratamiento?

Para esto, se trabajó con CBZ como droga modelo y se analizó la intercambiabilidad de productos de CBZ 200 mg declarados BE según la metodología experimental actualmente exigida por los entes regulatorios (BEM), en pacientes estabilizados con un determinado medicamento (sección 4.2). Como dicho ensayo arrojó resultados inesperados (posible falta de BEM entre los productos) surgió la necesidad de corroborarla, lo que se presenta en la sección 4.3. Por último, en la discusión del capítulo, se analizan los resultados en su conjunto y su impacto sobre la intercambiabilidad, intentando demostrar lo que se planteó en la segunda de nuestras hipótesis:

*Ninguna prueba experimental puede asegurar idéntico desempeño terapéutico de dos medicamentos en la práctica clínica, por lo tanto no deben realizarse intercambios cuando el riesgo asociado es elevado, como en el caso del intercambio de fármacos antiepilépticos (AEDs) en pacientes estabilizados.*

## Ensayos realizados

### 4.1 Desarrollo y validación de métodos analíticos

#### A. Método para la determinación de CBZ y E-CBZ en plasma y saliva de pacientes

Se aplicó un método por HPLC para la determinación de CBZ y E-CBZ en plasma y saliva de pacientes (*ver descripción del cromatógrafo en el Anexo I*).

##### ● Condiciones cromatográficas

Como fase estacionaria se utilizó una columna LiChrospher 60 RP-Select B 250 x 4 mm, 5 µm (Merck, Darmstadt, Alemania). La fase móvil consistió en una mezcla de buffer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 mM, pH 7,0): Acetonitrilo: Tetrahidrofurano: Isopropanol (63:29:5:3 en volumen), desgasificada y filtrada por membrana de nylon de 0,45 µm. Los solventes eran calidad HPLC. Se trabajó de manera isocrática y a temperatura ambiente, con un flujo de 0,8 ml/min y con detección UV a 220 nm. Se utilizó el área de pico como parámetro de integración.

##### ● Preparación de las soluciones de referencia

Las soluciones stock de las diferentes sustancias de referencia (SR) fueron preparadas en metanol a las siguientes concentraciones: CBZ (125 µg/ml), E-CBZ (56 µg/ml) y Nitrazepam (NTZ, estándar interno, SI, 260 µg/ml). Dichas soluciones se conservaron refrigeradas hasta su uso (se mantienen estables durante al menos nueve meses a -20 °C). Las SR utilizadas luego se prepararon por dilución de estas soluciones stock con plasma blanco o saliva blanco, según correspondiera.

##### ● Preparación de las muestras

**Plasma:** sobre 0,5 ml de muestra plasmática se adicionaron 15 µl de la solución stock de SI (NTZ, 260 µg/ml) y 2 ml de Acetato de Etilo. Se agitó en vortex durante 1 min y se centrifugó a 3500 rpm 10 min. Se separó el sobrenadante y se evaporó hasta sequedad bajo corriente de nitrógeno a 40 °C en baño de agua. El residuo obtenido se resuspendió en 250 µl de fase móvil (sin tetrahidrofurano), se centrifugó 10 min a 13000 rpm y por último se inyectaron 20 µl en el cromatógrafo.

**Saliva:** se procedió igual que en el caso de plasma partiendo de 0,5 ml de muestra salival. Luego de evaporar hasta sequedad en iguales condiciones se resuspendió el residuo con 100 µl de fase móvil (sin Tetrahidrofurano).

#### Validación del método analítico

##### ● Especificidad

Se analizaron muestras de plasma y saliva blanco provenientes de ocho fuentes independientes en busca de interferencias endógenas. Un ejemplo de cromatograma para cada una de las dos matrices se muestra en la Figura 4-3. Para establecer la especificidad del método con respecto a otros principios activos comúnmente prescritos en politerapia anticonvulsivante, se inoculó una muestra de plasma blanco con soluciones de referencia de Lamotrigina (LTG), Valproato de Sodio (VP), Fenitoína (PHT), Fenobarbital (PB) y Clonazepam (CNZ). Los resultados se muestran en la Figura 4-4.

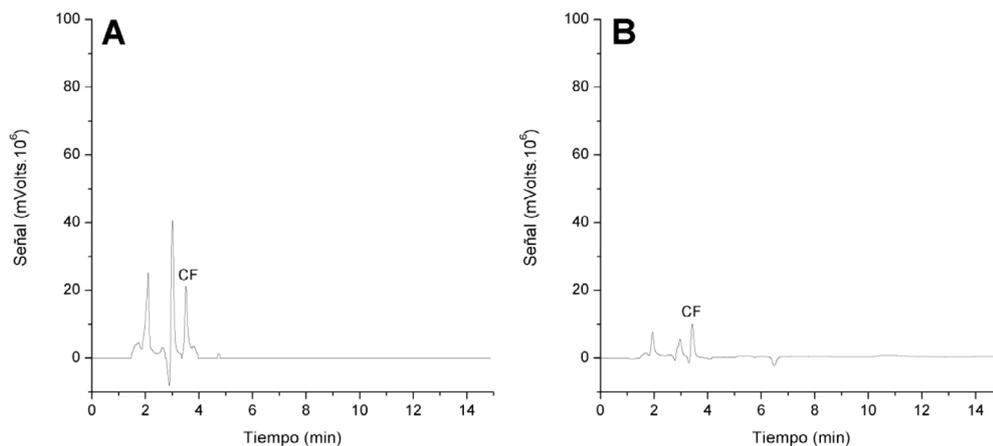


Figura 4-3. Ejemplos de cromatogramas obtenidos con saliva (A) y plasma (B) blanco. CF: Cafeína

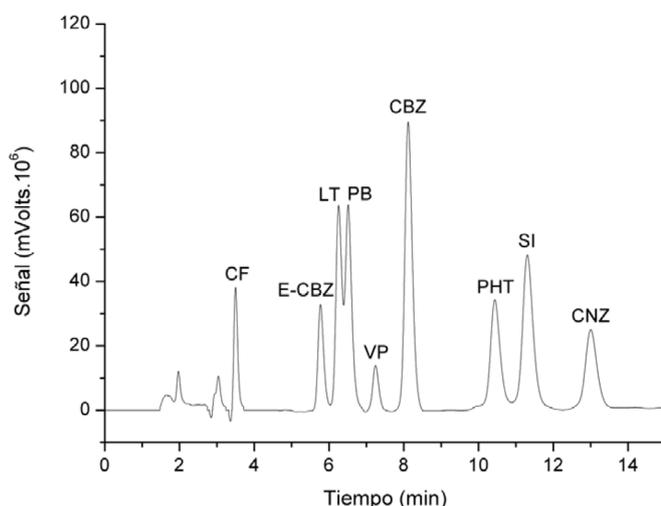


Figura 4-4. Cromatograma obtenido para plasma blanco inoculado con soluciones de referencia de Cafeína (CF), 10, 11-Epóxido de Carbamazepina (E-CBZ), Lamotrigina (LT), Fenobarbital (PB), Valproato de Sodio (VP), Carbamazepina (CBZ), Fenitoína (PHT), Nitrazepam (SI) y Clonazepam (CNZ)

El mismo procedimiento se realizó también para saliva, con idéntico resultado (no se muestra el cromatograma). También se estableció la especificidad del método respecto de la droga Cafeína (CF), por tratarse de una sustancia que suele estar presente en las muestras biológicas obtenidas tanto de pacientes como de voluntarios (Chros-cinska-Krawczyk et al., 2011).

La concentración de cada una de las drogas estudiadas en la muestra inyectada en el cromatógrafo se eligió de manera que estuviera dentro del intervalo terapéutico (IT) esperado para un paciente en tratamiento con dichas drogas. En el caso de CNZ se utilizó una concentración un poco mayor (situación analíticamente más desfavorable) para obtener un pico de área semejante a los demás y así verificar que no interfiriera con los analitos de interés. Las concentraciones utilizadas entonces (entre corchetes se indica el IT esperado) fueron: 3,5 µg/ml de E-CBZ [0,6-6,0]; 7,5 µg/ml de LT [4,0-

10,0]; 15,0 µg/ml de PB [2,0-30,0]; 80,0 µg/ml de VP [50,0-100,0]; 7,5 µg/ml de CBZ [2,0-12,0]; 15,0 µg/ml de PHT [10,0-20,0] y 0,5 µg/ml de CNZ [0,02-0,07]. En el caso de CF, se utilizó una concentración de 4,0 µg/ml, que es lo que suele encontrarse en los fluidos biológicos.

Como muestran las figuras anteriores, el método resultó ser específico tanto respecto de las dos matrices biológicas empleadas (plasma y saliva humanos) como de los otros principios activos ensayados.

#### ● Linealidad

Se evaluó la linealidad del método, tanto en plasma como en saliva, para CBZ y su metabolito activo. Para ello se analizaron cinco muestras independientes, a seis niveles diferentes de concentración (N = 30), dentro del rango 0,4-20,0 µg/ml para CBZ y 0,3-12,0 µg/ml para E-CBZ. La Tabla 4-2 muestra los resultados obtenidos. De acuerdo al test de Student, la correlación fue significativa en todos los casos ( $p < 0,0001$ ).

Las correlaciones se construyen como Ra vs. concentración, donde Ra es la relación de áreas de pico obtenidas para los analitos y el SI ( $A_{CBZ}/A_{SI}$  y  $A_{E-CBZ}/A_{SI}$  según corresponda).

Tabla 4-2. Resultados del ensayo de linealidad para muestras salivales y plasmáticas inoculadas con soluciones de referencia de CBZ y E-CBZ. En todos los casos, se ensayaron cinco réplicas independientes a seis niveles diferentes de concentración (N = 30) dentro del rango indicado. IC 95%: Intervalo de Confianza del 95%.  $R^2$ : coeficiente de determinación

	Rango (µg/ml)	Ordenada (a) [IC 95%]	Pendiente (b) [IC 95%]	$R^2$	Suma de residuales	p-valor
<b>Carbamazepina</b>						
Plasma	0,20 - 24,00	0,011 [-0,022 - 0,044]	0,1695 [0,1666 - 0,1724]	0,9980	-1,721.10 <sup>-15</sup>	< 0,0001
Saliva	0,08 - 12,00	-0,0033 [-0,0283 - 0,0217]	0,3817 [0,3773 - 0,3861]	0,9991	2,637.10 <sup>-15</sup>	< 0,0001
<b>10,11-Epóxido de Carbamazepina</b>						
Plasma	0,10 - 12,00	-0,0069 [-0,0151 - 0,0012]	0,1222 [0,1207 - 0,1236]	0,9991	-3,539.10 <sup>-15</sup>	< 0,0001
Saliva	0,04 - 6,00	-0,0059 [-0,0115 - 0,0004]	0,2692 [0,2672 - 0,2711]	0,9996	-1,284.10 <sup>-15</sup>	< 0,0001

Se consideran como límites de cuantificación para CBZ y E-CBZ las menores concentraciones de la curva de calibración en cada matriz, ya que en todos los casos se cumplieron las siguientes condiciones: la respuesta obtenida a ese nivel fue al menos 5 veces la respuesta del blanco, y los picos eran identificables, discretos y reproducibles con una precisión de al menos el 20% y una exactitud de entre el 80-120% (Shah et al., 1991).

#### ● Exactitud y precisión

Se prepararon muestras de referencia de CBZ y E-CBZ (con agregado de SI, NTZ) a seis niveles de concentración, cinco replicados independientes a cada nivel. Para ello se inoculó plasma y saliva blanco con cantidades adecuadas de soluciones stock. Las concentraciones finales y los resultados se muestran en la Tabla 4-3, donde se observa

que el método posee exactitud y precisión aceptables para ambos analitos, en ambas matrices biológicas, en todo el rango de concentraciones estudiado. Para el cálculo de la exactitud se utilizó la relación de áreas (Ra,  $A_{CBZ}/A_{SI}$  y  $A_{E-CBZ}/A_{SI}$  según corresponda).

Las muestras fueron preparadas, procesadas y analizadas en días diferentes intentando simular la situación real de aplicación del método: obtener muestras de pacientes en diferentes días. Por lo tanto, la precisión obtenida es inter día o precisión intermedia (FA 7, 2003).

**Tabla 4-3.** Exactitud y precisión (inter día) obtenidas para muestras salivales y plasmáticas inoculadas con soluciones de referencia de CBZ y E-CBZ. Se realizaron cinco réplicas independientes a cada nivel de concentración (n = 5). CV: coeficiente de variación

PLASMA			SALIVA		
Concentración (µg/ml)	Inter día		Concentración (µg/ml)	Inter día	
	Exactitud (%)	CV (%)		Exactitud (%)	CV (%)
<b>Carbamazepina</b>					
0,20	104,25	8,8	0,08	97,53	6,0
0,40	98,40	5,4	0,20	98,74	1,8
2,00	100,39	5,9	1,00	99,13	3,0
7,00	97,20	2,4	3,50	99,99	0,4
12,00	99,85	2,2	6,00	99,99	1,3
24,00	96,80	3,7	12,00	100,38	2,8
<b>10,11-Epóxido de Carbamazepina</b>					
0,10	98,03	7,7	0,04	98,64	5,5
0,30	100,88	6,0	0,15	98,68	3,6
1,00	97,72	1,7	0,50	99,01	3,2
3,50	99,26	1,0	1,50	100,00	2,5
6,00	100,58	0,7	3,00	100,39	1,3
12,00	103,33	2,5	6,00	100,92	0,9

● **Recuperación**

Los porcentajes recuperados luego de la etapa de extracción se evaluaron a tres niveles de concentración diferentes, con tres réplicas a cada nivel, mediante la comparación de las áreas de pico obtenidas para los analitos en las muestras procesadas (preparadas a partir de matriz blanco adicionada con solución de referencia) con las áreas obtenidas para los mismos analitos en soluciones de referencia sin extraer, es decir, soluciones de igual concentración que las anteriores pero preparadas por simple dilución en metanol de las soluciones stock.

La Tabla 4-4 muestra los resultados: los porcentajes recuperados obtenidos fueron cercanos al 80% en todos los casos y relativamente constantes, lo que motivó el uso de estándar interno, ya que como se ve en la Tabla 4-3, cuando en vez de áreas de pico se realizan los cálculos utilizando el parámetro Ra, los porcentajes recuperados se aproximan al 100%, a la vez que aumenta la precisión de los resultados.

Tabla 4-4. Recuperación para muestras salivales y plasmáticas inoculadas con soluciones de referencia de CBZ y E-CBZ. Se realizaron tres réplicas independientes a cada nivel de concentración (n = 3). CV: coeficiente de variación

PLASMA			SALIVA		
Concentración (µg/ml)	Recuperación (%)	CV (%)	Concentración (µg/ml)	Recuperación (%)	CV (%)
<b>Carbamazepina</b>					
0,40	87,62	7,5	0,20	81,38	8,0
7,00	87,25	3,0	3,50	82,74	4,6
24,00	83,59	4,0	12,00	81,33	4,1
<b>10,11-Epóxido de Carbamazepina</b>					
0,30	86,89	4,0	0,15	81,93	3,8
3,50	89,31	3,7	1,50	77,41	3,8
12,00	84,54	9,6	6,00	77,23	3,5

#### ● Estabilidad

Las soluciones stock de las SR de CBZ, E-CBZ y NTZ resultaron estables durante al menos nueve meses a -20 °C. A lo largo de ese tiempo, periódicamente fueron retesteadas, comparando las áreas de pico obtenidas con las áreas correspondientes de soluciones de referencia preparadas el día del ensayo.

Por otro lado, también se determinó la estabilidad de muestras de plasma y saliva inoculadas con CBZ, E-CBZ y NTZ SR (a dos niveles de concentración para cada matriz, tres réplicas independientes cada vez) frente a tres ciclos de congelamiento-descongelamiento (48 h) y durante 20 horas a temperatura ambiente. Las muestras resultaron estables en todas las condiciones ensayadas, como se ve en la Tabla 4-5.

Tabla 4-5. Estabilidad de muestras salivales y plasmáticas inoculadas con soluciones de referencia de CBZ y E-CBZ frente a un ciclo de 20 horas a temperatura ambiente y a tres ciclos de congelamiento-descongelamiento. CV: coeficiente de variación

PLASMA			SALIVA		
Concentración (µg/ml)	Recuperación (%) (n = 3)	CV (%)	Concentración (µg/ml)	Recuperación (%) (n = 3)	CV (%)
<i>- Estabilidad frente a un ciclo de 20 horas a temperatura ambiente</i>					
<b>Carbamazepina</b>					
0,40	94,76	3,56	0,20	95,49	3,18
12,00	95,71	2,54	6,00	100,91	2,17
<b>10,11-Epóxido de Carbamazepina</b>					
0,30	98,71	4,40	0,15	97,58	3,88
6,00	99,90	1,12	3,00	97,16	2,15

- Estabilidad frente a tres ciclos de congelamiento-descongelamiento

Carbamazepina					
0,40	97,36	2,75	0,20	95,39	3,20
12,00	98,53	1,66	6,00	99,78	3,35
10,11-Epóxido de Carbamazepina					
0,30	97,76	3,13	0,15	97,61	2,66
6,00	100,99	2,52	3,00	100,31	1,70

## B. Método para la determinación de CBZ y E-CBZ en saliva de voluntarios sanos

Se aplicó un método por HPLC para la determinación de CBZ y E-CBZ en plasma y saliva de voluntarios sanos (*ver descripción del cromatógrafo en el Anexo I*).

### ● Condiciones cromatográficas

Como fase estacionaria se utilizó una columna LiChrospher 60 RP-Select B, 250 x 4 mm, 5 µm de tamaño de partícula (Merck, Darmstadt, Alemania). La fase móvil consistió en una mezcla de buffer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 mM, pH 7,0): Acetonitrilo: Metanol (60:34:6 en volumen), desgasificada y filtrada por membrana de nylon de 0,45 µm. Se trabajó de manera isocrática a temperatura ambiente, con flujo 1 ml/min y detección UV a 220 nm. Se utilizó el área de pico como parámetro de integración.

### ● Preparación de las soluciones de referencia

Las soluciones stock de las diferentes SR utilizadas fueron preparadas en metanol, a las siguientes concentraciones: CBZ (125 µg/ml), E-CBZ (56 µg/ml) y NTZ (estándar interno, SI, 25 µg/ml). Dichas soluciones se conservaron refrigeradas hasta su uso (se mantienen estables durante al menos nueve meses a -20 °C). Todas las SR utilizadas luego para la validación del método y la valoración de las muestras se prepararon por dilución de estas soluciones stock con saliva blanco.

### ● Preparación de las muestras

Sobre 1 ml de muestra salival se agregaron 10 µL de la solución stock de NTZ (25 µg/ml, SI) y 3 ml de cloroformo. Se agitó en vortex durante 1 min y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min. La fase orgánica se separó y se evaporó hasta sequedad bajo corriente de nitrógeno a 40 °C en un baño de agua. El residuo se resuspendió con 100 µl de metanol, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min y 20 µl se inyectaron en el cromatógrafo.

## Validación del método analítico

### ● Especificidad

El método demostró ser específico respecto de la matriz biológica ya que no se observaron picos cercanos (interferencias endógenas) a los tiempos de retención de E-CBZ, CBZ y NTZ cuando se analizaron muestras de saliva blanco proveniente de ocho fuentes independientes. En la Figura 4-5 se muestra un ejemplo de un cromatograma blanco y de un cromatograma blanco inoculado con SR de E-CBZ, CBZ y NTZ.

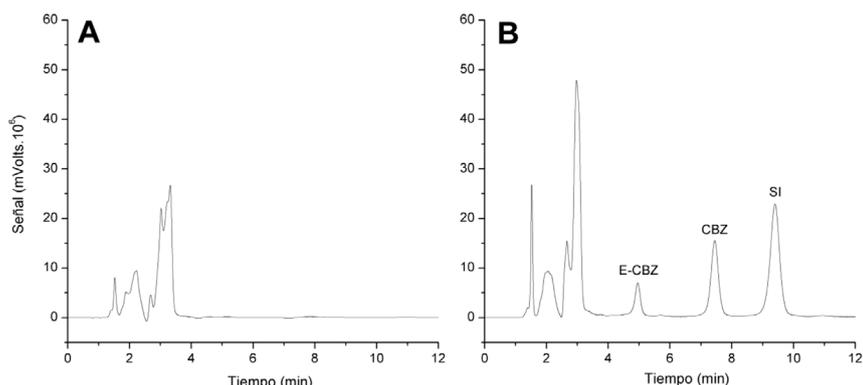


Figura 4-5. Ejemplos de cromatogramas obtenidos con saliva blanco (A) y saliva blanco más soluciones de referencia de E-CBZ, CBZ y NTZ (estándar interno, SI) (B)

### ● Linealidad

Para evaluar la linealidad del método se analizaron tres muestras de SR independientes, a cinco niveles diferentes de concentración ( $N = 15$ ), dentro del rango 0,02-3,00  $\mu\text{g/ml}$  para CBZ y 0,01-1,50  $\mu\text{g/ml}$  para E-CBZ (preparadas inoculando saliva blanco con soluciones stock).

Las correlaciones se construyen como  $R_a$  vs. concentración, donde  $R_a$  es la relación de áreas de pico obtenidas para los analitos y el SI ( $A_{\text{CBZ}}/A_{\text{SI}}$  y  $A_{\text{E-CBZ}}/A_{\text{SI}}$  según corresponda). Para ambos analitos, el método ajustó al modelo lineal de acuerdo al test de Student ( $p < 0,0001$ ), y en la Tabla 4-6 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4-6. Resultados del ensayo de linealidad para muestras salivales inoculadas con SR de CBZ y E-CBZ. Se ensayaron tres réplicas independientes a cinco niveles diferentes de concentración ( $N = 15$ ) dentro del rango indicado. IC 95%: Intervalo de Confianza del 95%.  $R^2$ : coeficiente de determinación

Rango ( $\mu\text{g/ml}$ )	Ordenada (a) [IC 95%]	Pendiente (b) [IC 95%]	$R^2$	Suma de residuales	p-valor
<b>Carbamazepina</b>					
0,02 - 3,00	-0,0076 [-0,0595 - 0,0444]	1,5974 [1,5651 - 1,6297]	0,9990	$2,109 \cdot 10^{-15}$	< 0,0001
<b>10,11-Epóxido de Carbamazepina</b>					
0,01 - 1,50	-0,0076 [-0,0187 - 0,0035]	1,2528 [1,2389 - 1,2668]	0,9997	$2,77 \cdot 10^{-15}$	< 0,0001

Se consideran los límites de cuantificación de 0,02 y 0,01  $\mu\text{g/ml}$  para CBZ y E-CBZ respectivamente (menor concentración de la curva de referencia), ya que se cumplieron las siguientes condiciones: la respuesta obtenida a ese nivel fue al menos 5 veces la respuesta del blanco, y además los picos eran identificables, discretos y reproducibles con una precisión de al menos el 20% y una exactitud de entre el 80-120% (Shah et al., 1991).

● **Exactitud y precisión**

Se prepararon muestras de referencia de CBZ y E-CBZ más NTZ a cinco niveles de concentración (los mismos de la linealidad), tres replicados independientes a cada nivel. Para ello se inoculó saliva blanco con cantidades adecuadas de soluciones stock. Las concentraciones finales y los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 4-7, donde se observa que el método posee exactitud y precisión aceptables para ambos analitos, en todo el rango de concentraciones estudiado. Para el cálculo de la exactitud se utilizó la relación de áreas ( $Ra$ ,  $A_{CBZ}/A_{SI}$  y  $A_{E-CBZ}/A_{SI}$  según corresponda).

Las muestras fueron preparadas, procesadas y analizadas el mismo día, de modo que la precisión obtenida es intra día. Esto se hizo así para intentar simular la situación real de aplicación del método: procesar todas las muestras correspondientes a un voluntario en el mismo día.

■ **Tabla 4-7.** Exactitud y precisión (intra día) obtenidas para muestras salivales inoculadas con soluciones de referencia de CBZ y E-CBZ, más SI. Se realizaron tres réplicas independientes a cada nivel de concentración (n = 3). CV: coeficiente de variación

Concentración (µg/ml)	Intra día	
	Exactitud (%)	CV (%)
<b>Carbamazepina</b>		
0,020	96,83	3,26
0,250	96,12	0,47
0,875	100,03	1,23
1,50	99,90	2,39
3,00	100,86	2,75
<b>10,11-Epóxido de Carbamazepina</b>		
0,010	95,18	4,65
0,125	94,60	1,77
0,375	99,09	2,13
0,750	99,90	1,86
1,50	101,55	1,05

● **Recuperación**

Los porcentajes recuperados luego de la etapa de extracción se evaluaron a tres niveles de concentración diferentes (el menor, medio y mayor de la curva de calibración), con tres réplicas a cada nivel, mediante la comparación de las áreas de pico obtenidas para CBZ y E-CBZ en las muestras procesadas (preparadas a partir de matriz blanco adicionada con solución de referencia) con el área obtenida con soluciones de referencia sin extraer, es decir, soluciones de igual concentración que las anteriores pero preparadas por simple dilución en metanol de las soluciones stock.

La Tabla 4-8 muestra los resultados obtenidos: en todos los casos, los porcentajes recuperados fueron cercanos al 90% y relativamente constantes, lo que motivó el uso de estándar interno, ya que como se ve en la Tabla 4-7, cuando en vez de áreas de pico se realizan los cálculos utilizando el parámetro Ra (cociente de áreas), los porcentajes recuperados se aproximan al 100% y también aumenta la precisión de los resultados.

**Tabla 4-8.** Recuperación para muestras salivales inoculadas con soluciones de referencia de CBZ y E-CBZ, calculada respecto a soluciones de referencia en metanol. Se realizaron tres réplicas independientes a cada nivel de concentración (n = 3). CV: coeficiente de variación

Concentración (µg/ml)	Recuperación (%)	CV (%)
<b>Carbamazepina</b>		
0,020	90,91	7,21
0,875	90,07	5,29
3,00	90,62	8,73
<b>10,11-Epóxido de Carbamazepina</b>		
0,010	85,31	9,13
0,375	88,67	8,18
1,50	89,81	10,21

#### ● Estabilidad

No se realizaron estudios de estabilidad adicionales ya que los resultados obtenidos son aplicables para la técnica anterior (determinación de CBZ y E-CBZ en plasma y saliva de pacientes). Si bien ambas técnicas difieren en la preparación de las muestras y las condiciones cromatográficas, se trata de los mismos analitos en la misma matriz (saliva).

Por lo tanto, los resultados del estudio pueden verse en el apartado “Estabilidad” de la técnica anterior.

## **4.2** Monitorización de niveles plasmáticos y salivales de CBZ en pacientes

Este ensayo fue inicialmente planteado para ser realizado en cuatro etapas, cada una de las cuales incluiría alrededor de 10 pacientes. Como se mencionó en la presentación, no fue posible avanzar más allá de la primera; sin embargo, esta etapa mostró resultados interesantes y dio lugar a estudios posteriores. A continuación se describe el estudio, el modo en que se realizó y los resultados que se obtuvieron.

### Descripción y objetivos

#### ● Diseño del estudio

Se trabajó con pacientes del Servicio de Neurología del Hospital Interzonal General de Agudos Prof. Dr. Rodolfo Rossi de la ciudad de La Plata, medicados con Carbamazepina (CBZ), no necesariamente en monoterapia, siendo éste el único criterio de inclusión del estudio. El protocolo de trabajo fue previamente aprobado por el comité de ética del Hospital Italiano de La Plata (*ver Anexo III*).

Antes de iniciar el estudio se realizó una reunión informativa con pacientes y médicos. Allí se explicaron las características del estudio y se entregó a cada paciente una copia con toda la información pertinente. Se aclararon las inquietudes que surgieron después de analizar la documentación y se firmaron los correspondientes formularios de consentimiento informado, en presencia de un testigo. Luego, cada paciente fue evaluado por un profesional médico, y dicha evaluación se sumó a su historia clínica, además de la información correspondiente a sus hábitos alimenticios, actividades y medicación concomitante, colaterales que se mantuvieron constantes a lo largo del estudio.

Los pacientes comenzaron recibiendo los tratamientos prescritos por sus médicos (mono o politerapia) durante un mes con una marca determinada, seguido de otro mes con otra marca comercial del mismo medicamento.<sup>1</sup> En ambas ocasiones, se tomaron muestras plasmáticas y salivales de cada paciente durante las últimas dos semanas (una muestra por semana), a fin de asegurar que se haya alcanzado el estado estacionario.

Al efectuar el cambio de marcas se preguntó a cada paciente si había manifestado algún síntoma relacionado a dicho cambio, y se registraron las respuestas. Por otro lado, los pacientes (su familiar más cercano o su tutor) registraron apropiadamente la ocurrencia de crisis convulsivas (día, hora, forma de expresión y duración) a lo largo de todo el tiempo que estuvieron afectados al estudio. Al momento de la obtención de muestras, y cuando los pacientes acudieron a la consulta médica para cambiar de medicación o para finalizar su participación en el estudio, se tomó nota de los registros domiciliarios y se realizó un control clínico para identificar la aparición de alguna reacción adversa.

El día de la monitorización los pacientes concurrieron al hospital por la mañana, antes de la toma de la dosis correspondiente, con un ayuno de 8 horas (para cada paciente la toma de muestra se realizó siempre a la misma hora). En todas las ocasiones se extrajeron 5 ml de sangre (en el laboratorio de análisis clínicos del Hospital) que se colocaron en tubos heparinizados, los que inmediatamente se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos. El plasma separado se transfirió a tubos de vidrio, que se conservaron a -20 °C hasta su traslado. En forma simultánea se colectaron las muestras de saliva. Para ello, se permitió a los pacientes masticar un trozo de parafilm de manera de estimular la salivación, luego de lo cual se tomó la muestra en recipientes plásticos adecuados, que también se conservaron a -20 °C hasta su traslado.

Las muestras obtenidas en el Hospital fueron llevadas al lugar de procesamiento (Cátedra Control de Calidad de Medicamentos, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP) en recipientes térmicos con refrigerantes adecuados para su conservación. Allí fueron nuevamente colocadas en freezer a -20 °C, hasta su análisis. El mismo se llevó a cabo mediante la técnica por HPLC, descrita en la sección 4.1 del presente capítulo.

## Resultados y discusión

Se comenzó el ensayo con un grupo de 10 pacientes epilépticos, medicados con comprimidos de CBZ 200 mg. Luego de la reunión informativa y la evaluación clínica (descriptas en el diseño del estudio) se les entregaron los comprimidos de la marca elegida para comenzar: Carbamazepina Denver Farma (Lote: 50105, Vto.: 01/2008). Esta marca, a la que denominaremos de aquí en más “Test”, es la que los pacientes tomaron durante un mes.

En las últimas dos semanas de ese mes, los pacientes debían acudir al hospital para la toma de las muestras plasmáticas y salivales en los días previamente acordados para los muestreos. En ambas ocasiones, solo acudió un pequeño grupo de los diez pacientes, mientras que a los demás fue necesario llamarlos, recordarles y reprogramar una fecha de muestreo dentro de la semana correspondiente. Aún así, solo siete de los diez pacientes cumplieron esta etapa.

Luego del último muestreo, a esos pacientes se les entregaron los comprimidos de la marca elegida para continuar (“Referencia”): Tegretol (Lote: 343362, Vto.: 10/2008).

---

<sup>1</sup> En la primera etapa se evaluaron solo dos marcas de productos de CBZ 200 mg y una misma secuencia: TR. La secuencia inversa, RT, así como la evaluación de otras marcas comerciales, estaba pautada para las siguientes etapas, que no se llegaron a realizar.

Al igual que en el primer período del estudio, los pacientes debían acudir para el muestreo llegadas las dos últimas semanas del primer mes de tratamiento con esta marca. Nuevamente, fue muy difícil obtener las muestras, y solo seis pacientes de los diez iniciales completaron todo el esquema. La Tabla 4-9 muestra las características antropométricas de dichos pacientes y la dosis de tratamiento.

**Tabla 4-9.** Características antropométricas de los seis pacientes que completaron el esquema de trabajo propuesto. También se detalla la dosis (mg/día) de CBZ prescrita para cada paciente y si la misma es en mono o politerapia (y entre paréntesis la medicación concomitante)

ID Paciente	Sexo	Edad (años)	Peso (k)	Altura (m)	Dosis (mg/día)	Mono (M) / Poli (P) Terapia
#1	F	40	49	1,65	600	P (+ Clonazepam)
#2	F	22	50	1,70	400	M
#3	M	17	65	1,78	400	M
#4	M	36	75	1,85	400	M
#5	F	25	53	1,61	600	M
#6	F	38	64	1,68	600	M

La Tabla 4-10 muestra las concentraciones, tanto en plasma como en saliva, de CBZ encontradas en cada muestreo de los seis pacientes que completaron el esquema. Los mismos resultados, pero para el metabolito activo E-CBZ, se presentan en la Tabla 4-11.

Durante el tiempo que estuvieron afectados al presente estudio, no se registraron crisis convulsivas para ningún paciente y ninguno declaró haber experimentado algún síntoma relacionado con el cambio de marca.

**Tabla 4-10.** Resultados obtenidos en seis pacientes medicados con CBZ 200 mg. Se presentan las concentraciones plasmáticas y salivales de CBZ obtenidas en cada una de las cuatro extracciones, su cociente (S/P) y el promedio por marca. También el porcentaje de unión a proteínas plasmáticas (% UPP), estimado de acuerdo a la expresión  $\% \text{ UPP} = (1 - (S/P)) * 100$ . En blanco están las filas correspondientes al producto Test (T) y en gris a la Referencia (R)

Carbamazepina							
ID Paciente	Marca - Extracción	PLASMA (P)		SALIVA (S)		Cociente S/P	% UPP estimado
		Conc. (µg/ml)	Prom x marca	Conc. (µg/ml)	Prom x marca		
#1 <sup>†</sup>	T - 1	6,3202		1,2837		0,2031	79,7
	T - 2	5,9057	6,1129	1,0804	1,1821	0,1830	81,7
	R - 3	8,8819	8,3276	1,4679	1,4812	0,1653	83,5
	R - 4	7,7733		1,4945		0,1923	80,8
#2 <sup>‡</sup>	T - 1	2,4466		0,7724		0,3157	68,4
	T - 2	3,0084	2,7275	0,7794	0,7759	0,2591	74,1
	R - 3	5,5272	4,9662	1,4530	1,3528	0,2629	73,7
	R - 4	4,4051		1,2527		0,2844	71,6

#3†	T - 1	4,2214	3,2856	0,8656	0,7303	0,2051	79,5	
	T - 2	2,3499		0,5950		0,2532	74,7	
	R - 3	4,6773	4,5198	1,0012		1,0038	0,2141	78,6
	R - 4	4,3623	1,0064	0,2307		76,9		
#4‡	T - 1	2,3490	2,7525	0,7096	0,8330	0,3021	69,8	
	T - 2	3,1560		0,9563		0,3030	69,7	
	R - 3	4,7896	4,9784	1,0587		1,1330	0,2210	77,9
	R - 4	5,1672	1,2073	0,2336		76,6		
#5†	T - 1	6,9417	7,1685	1,4351	1,3922	0,2067	79,3	
	T - 2	7,3952		1,3493		0,1825	81,8	
	R - 3	8,5769	8,7064	1,5572		1,6058	0,1816	81,8
	R - 4	8,8359	1,6543	0,1872		81,3		
#6†	T - 1	5,1281	5,4156	1,0973	1,1667	0,2140	78,6	
	T - 2	5,7030		1,2360		0,2167	78,3	
	R - 3	8,3849	8,3951	1,6082		1,1821	0,1918	80,8
	R - 4	8,4053	1,4670	0,1745		82,5		
<b>Promedio =</b>						<b>0,2243</b>	<b>77,57%</b>	

† Dosis diaria: 600 mg - ‡ Dosis diaria: 400 mg

**Tabla 4-11.** Resultados obtenidos en seis pacientes medicados con CBZ 200 mg. Se presentan las concentraciones plasmáticas y salivales del metabolito activo E-CBZ obtenidas en cada una de las cuatro extracciones, su cociente (S/P) y el promedio por marca. También el porcentaje de unión a proteínas plasmáticas (% UPP), estimado de acuerdo a la expresión  $\% \text{ UPP} = (1 - (S/P)) * 100$ . En blanco están las filas correspondientes al producto Test (T) y en gris a la Referencia (R)

#### 10,11-Epóxido de Carbamazepina

ID Paciente	Marca - Extracción	PLASMA (P)		SALIVA (S)		Cociente S/P	% UPP estimado	
		Conc. (µg/ml)	Prom x marca	Conc. (µg/ml)	Prom x marca			
#1†	T - 1	1,7000	1,7373	0,8124	0,8005	0,4778	52,2	
	T - 2	1,7746		0,7887		0,4444	55,6	
	R - 3	2,4493	2,2081	1,2347		1,0252	0,5041	49,6
	R - 4	1,9668	0,8158	0,4148		58,5		
#2‡	T - 1	0,7309	0,7823	0,4034	0,3944	0,5520	44,8	
	T - 2	0,8337		0,3854		0,4623	53,8	
	R - 3	1,0872	1,0057	0,6801		0,6392	0,6256	37,4
	R - 4	0,9241	0,5982	0,6473		35,3		
#3‡	T - 1	0,4968	0,4305	0,3492	0,2489	0,7029	29,7	
	T - 2	0,3641		0,1486		0,4081	59,2	
	R - 3	0,4548	0,4135	0,2935		0,2781	0,6452	35,5
	R - 4	0,3722	0,2628	0,7062		29,4		
#4‡	T - 1	0,5833	0,6253	0,2760	0,2918	0,4732	52,7	
	T - 2	0,6672		0,3076		0,4610	53,9	
	R - 3	1,2507	1,3058	0,5670		0,5821	0,4533	54,7
	R - 4	1,3608	0,5972	0,4389		56,1		
#5†	T - 1	1,8433	1,8471	0,9066	0,8717	0,4918	50,8	
	T - 2	1,8508		0,8367		0,4521	54,8	
	R - 3	2,3561	2,3775	1,0397		1,0791	0,4413	55,9
	R - 4	2,3988	1,1184	0,4662		53,4		
#6†	T - 1	1,4280	1,4759	0,6431	0,7224	0,4504	55,0	
	T - 2	1,5237		0,8017		0,5262	47,4	
	R - 3	2,1087	2,0565	0,9642		0,9565	0,4572	54,3
	R - 4	2,0042	0,9487	0,4734		52,7		
<b>Promedio =</b>						<b>0,5073</b>	<b>49,28%</b>	

† Dosis diaria: 600 mg - ‡ Dosis diaria: 400 mg

La última fila de las dos tablas anteriores muestra el promedio general (todos los pacientes, todos los periodos) obtenido para el cociente S/P y para el % UPP. Este último valor, calculado como  $(1 - (S/P)) * 100$ , coincide con los valores bibliográficos citados al inicio de este capítulo, donde se estableció un porcentaje de unión a proteínas plasmáticas aproximado al 75% para CBZ y al 50% para E-CBZ (*Clarke's analysis of drugs and poisons, 2004*).

Los resultados comparativos entre los dos productos evaluados, T y R, se presentan en las Figuras 4-6 y 4-7. La primera compara los niveles plasmáticos promedio de CBZ y E-CBZ, de cada paciente en cada período, mientras que la segunda representa lo mismo pero utilizando los niveles salivales.

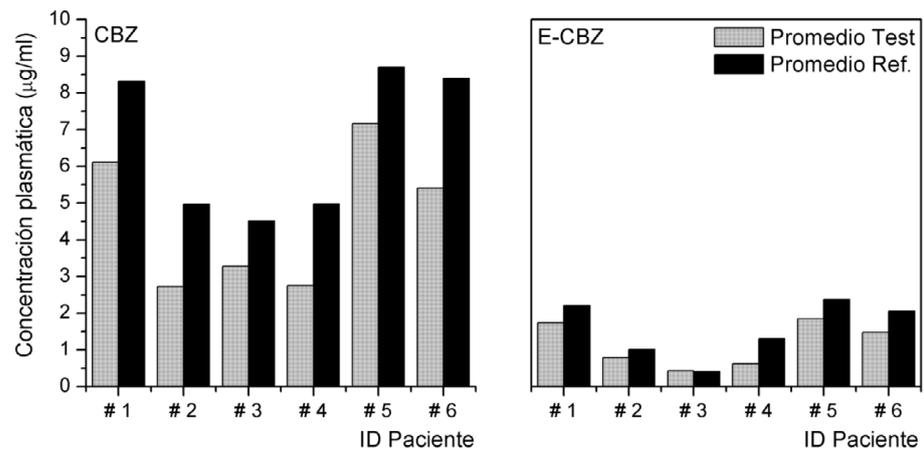


Figura 4-6. Niveles plasmáticos promedio encontrados en los seis pacientes en cada período. El gráfico de la izquierda corresponde a niveles de CBZ y el de la derecha a los de E-CBZ. En ambos casos, las barras grises representan al producto T y las negras al de referencia (R, Tegretol)

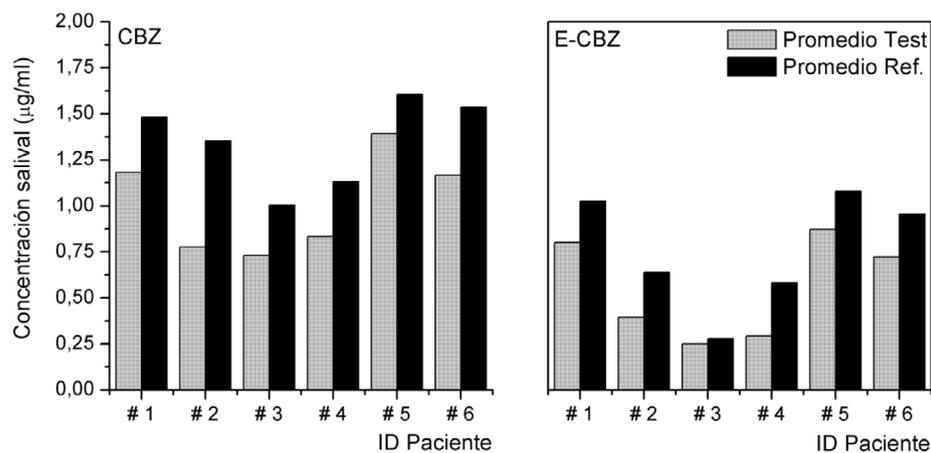


Figura 4-7. Niveles salivales promedio encontrados en los seis pacientes en cada período. El gráfico de la izquierda corresponde a niveles de CBZ y el de la derecha a los de E-CBZ. En ambos casos, las barras grises representan al producto T y las negras al de referencia (R, Tegretol)

Para analizar estadísticamente los datos que se muestran en las Tablas 4-10 y 4-11 previamente fue necesario normalizarlos por las dosis, ya que los distintos pacientes se encontraban recibiendo diferentes dosis. Dicha normalización se calculó como C/D, es decir, las concentraciones medidas (C, plasmática o salival, de CBZ o de E-CBZ, según correspondiera) divididas por la dosis (D, expresada en g/día). Para los pacientes #1, #5 y #6, D = 0,6 mientras que para los pacientes #2, #3 y #4, D = 0,4.

Con los datos así normalizados, se llevó a cabo un ANAVA, en el que cada producto (Test y Referencia) se consideró un tratamiento, con dos réplicas para cada individuo (cada una de las dos extracciones), y considerando a los individuos como único criterio de bloque. En total se realizaron cuatro ANAVA que se presentan en la Tabla 4-12: para CBZ y para E-CBZ, tanto en plasma como en saliva. Por último, y para reforzar los resultados obtenidos, en la Tabla 4-13 se comparan las medias para cada tratamiento (Test vs. Referencia) mediante los test estadísticos de Fisher (o prueba LSD, *least significant difference*) y de Tukey (o prueba HSD, *honestly significant difference*).

**Tabla 4-12.** Análisis de Varianza de las concentraciones medidas en los seis pacientes, en plasma y saliva, tanto de CBZ como de E-CBZ. Se consideran dos tratamientos, Test y Referencia, y a los individuos como bloques. Un p-valor < 0,01 indica diferencias significativas entre los niveles del factor en cuestión

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F-valor	p-valor
<b>PLASMA</b>					
<b>Carbamazepina</b>					
Tratamientos	108,095	1	108,095	61,234	4,92.10 <sup>-7</sup>
Individuos	46,137	5	9,227	5,227	0,0044
Error	30,010	17	1,765		
<b>10,11-Epóxido de Carbamazepina</b>					
Tratamientos	2,792	1	2,792	10,883	0,0042
Individuos	11,816	5	2,363	9,211	0,0002
Error	4,362	17	0,257		
<b>SALIVA</b>					
<b>Carbamazepina</b>					
Tratamientos	3,183	1	3,183	37,807	1,07.10 <sup>-5</sup>
Individuos	7,470	5	1,494	17,745	3,25.10 <sup>-6</sup>
Error	1,431	17	0,084		
<b>10,11-Epóxido de Carbamazepina</b>					
Tratamiento	1,201	1	1,201	20,910	0,0003
Individuos	7,386	5	1,477	25,728	2,28.10 <sup>-7</sup>
Error	0,976	17	0,057		

Tabla 4-13. Comparaciones pareadas de las concentraciones promedio, de CBZ y E-CBZ, tanto en plasma como en saliva, con cada uno de los dos tratamientos T y R. Se aplican dos métodos de comparación: test de Fisher (o prueba LSD) y de Tukey (o prueba HSD). Un p-valor < 0,01 significa que las medias comparadas difieren significativamente. IC 95%: intervalo del 95% de confianza

	Carbamazepina		10,11-Epóxido de Carbamazepina	
	PLASMA	SALIVA	PLASMA	SALIVA
Diferencia promedio  T - R	4,245	0,728	0,682	0,447
$\Delta$ LSD	1,145	0,250	0,437	0,206
p-valor	<b>4,92.10<sup>-7</sup></b>	<b>1,07.10<sup>-5</sup></b>	<b>0,0042</b>	<b>0,0003</b>
IC 95%	3,100 - 5,389	0,478 - 0,978	0,245 - 1,119	0,241 - 0,653
$\Delta$ HSD	1,143	0,249	0,436	0,205
p-valor	<b>1,34.10<sup>-5</sup></b>	<b>2,32.10<sup>-5</sup></b>	<b>0,0043</b>	<b>0,0003</b>
IC 95%	3,102 - 5,388	0,479 - 0,977	0,246 - 1,118	0,242 - 0,652

Como puede verse en las tablas anteriores, los tratamientos produjeron resultados significativamente diferentes en todos los casos o, dicho de otro modo, las concentraciones de CBZ y E-CBZ encontradas luego de cada uno de los tratamientos, Test y Referencia, pueden considerarse estadísticamente diferentes, sea que se determinen en plasma o en saliva.

Si bien puede parecer que estos resultados avalan la hipótesis inicial de que los estudios de BE promedio en voluntarios sanos no son suficientes para garantizar la intercambiabilidad en pacientes estabilizados, también podrían ser indicativos de otro hecho: que los productos ensayados no eran BE promedio. Y precisamente esto último era lo más probable, dada la (gran) magnitud de la diferencia encontrada en las concentraciones logradas con uno y otro tratamiento y el hecho de que la tendencia ( $R > T$ ) se manifestó invariante en todos los casos.

Si hubiera sido cierta la hipótesis planteada, el resultado esperado era inequivalencia en *algunos* pacientes, para quienes el estudio BE promedio no hubiera logrado garantizar la intercambiabilidad de los productos R y T. Los resultados obtenidos no solo mostraron una gran diferencia estadística entre los tratamientos, sino que *todos* los pacientes mostraron la *misma* tendencia para los dos analitos en ambos fluidos.

Por lo anterior, se decidió suspender este ensayo y plantear el que se describe a continuación, ya que de ser cierto que los productos T y R no eran BE promedios en voluntarios sanos, los resultados obtenidos al trabajar con pacientes sólo reflejarían ese hecho, sin permitir ninguna conclusión acerca de la idoneidad o no de los estudios de BE promedio para garantizar la eficacia y la seguridad de los intercambios de medicamentos en pacientes en tratamiento con un fármaco determinado.

### 4.3 Estudio de BDR de comprimidos de CBZ 200 mg en voluntarios sanos

#### Descripción y objetivos

##### ● Diseño del estudio

Se evaluó la biodisponibilidad relativa de cuatro productos comerciales de comprimidos de CBZ 200 mg, liberación inmediata (productos A\*, B, C y D), en voluntarios sanos, siguiendo un diseño aleatorizado y cruzado de cuatro períodos, empleando saliva como fluido biológico. Entre períodos se dejó pasar 15 días de manera de asegurar un lavado de al menos 7 veces la vida media del fármaco, estimada entre 18 y 50 horas (*Clarke's analysis of drugs and poisons*, 2004).

Los productos evaluados fueron:

- producto A (Referencia): Tegretol, Lab. Novartis Argentina SA (Lote: 343362, Vto.: 10/2008)
- producto B: Carbamazepina Denver Farma, Lab. Denver Farma SA (Lote: 50105, Vto.: 01/2008)
- producto C: Carbamazepina Bouzen, Lab. Bouzen SACIFIAF (Lote: 0243, Vto.: 02/2010)
- producto D: CMP 200, Lab. Klonal SRL (Lote: 1637, Vto.: 12/2008)

El estudio se llevó a cabo de acuerdo a los principios de la Declaración de Helsinki (World Medical Association, 2004) y a las *Guías de Buenas Prácticas en Clínica de la Comisión Internacional de Armonización* (EMEA/CPMP, 2002). El protocolo del estudio fue previamente aprobado por el comité de ética del Hospital Italiano de La Plata (*ver Anexo III*) y todos los voluntarios dieron su consentimiento, informado por escrito y frente a un testigo.

En el primer día de cada período, los voluntarios (con al menos ocho horas de ayuno) recibieron a las 8 de la mañana una única dosis de 200 mg de CBZ (de la marca correspondiente), con aproximadamente 200 ml de agua. Durante ese primer día las comidas fueron estandarizadas y programadas para las 12, 16 y 20 horas, respectivamente.

##### ● Sujetos y toma de muestras

Los voluntarios participantes del estudio debían cumplir las siguientes condiciones: edad entre 18 y 40 años, peso dentro del 15% del peso ideal, no fumadores y en el caso de las mujeres no debían estar embarazadas. El peso ideal (PI) en kg se calculó como  $PI = 0.9 \times (H - 100)$  para las mujeres y  $PI = (H - 100)$  para los hombres, siendo H la altura en centímetros (Silva et al., 2010).

Por otro lado, los voluntarios no debían estar bajo ningún tratamiento farmacológico y no debían poseer antecedentes de alergia a medicamentos. Se les indicó que no tomaran ningún tipo de medicación desde 15 días antes y hasta la finalización del estudio, y también debieron abstenerse de ingerir bebidas alcohólicas o bebidas conteniendo xantinas durante las 48 horas previas y durante cada período del estudio.

Luego de la administración del producto correspondiente y durante los dos días posteriores a dicha administración se interrogó a los voluntarios para detectar cualquier efecto o reacción adversa que pudiera presentarse.

Al iniciar cada período, antes de la administración ( $T_0$  o pre-dosis) se tomó una muestra salival de cada voluntario. Luego cada voluntario recibió una dosis única del producto correspondiente de CBZ 200 mg a las 8 de la mañana. A continuación, las muestras fueron recolectadas a los siguientes tiempos: 1; 2; 3; 4; 5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 10; 12; 24; 36; 48 y 84 horas post-dosis.

Luego de la administración del comprimido correspondiente, la boca fue enjuagada exhaustivamente con agua. Para la toma de muestra, que se colectó en recipientes plásticos adecuados, se permitió a los voluntarios masticar un trozo de parafilm a fin de estimular la salivación. La saliva colectada se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. El mismo se llevó a cabo mediante la técnica por HPLC descrita en la sección 4.1 del presente capítulo.

#### ● Análisis farmacocinético

El área bajo la curva de concentración vs. tiempo de cada voluntario en cada período se calculó según el método de los trapecios, desde cero hasta 84 horas ( $ABC_{0-t}$ ). A partir de allí, el área desde cero a infinito ( $ABC_{0-inf}$ ) se calculó sumando a  $ABC_{0-t}$  el término resultante de la extrapolación desde 84 h hasta infinito (calculado dividiendo la concentración del último tiempo por la constante de eliminación,  $K_e$ ).

La concentración salival máxima ( $C_{max}$ ) y el tiempo correspondiente a dicha concentración ( $T_{max}$ ) se obtuvieron por inspección directa de los perfiles.  $K_e$  se calculó (-) como la pendiente de la recta obtenida haciendo la regresión lineal por cuadrados mínimos de los últimos puntos de cada curva, ln-transformados, vs. tiempo.

### Resultados y discusión

El estudio comenzó con un grupo de diez voluntarios sanos, de ambos sexos, pero sólo ocho (3 mujeres y 5 hombres) lo completaron; dos abandonaron por razones personales no relacionadas al estudio. Para esos ocho voluntarios, la edad, peso y altura promedio [rango] fueron: 31,8 [27-33] años, 73,3 [52-86] kg y 1,75 [1,60-1,90] m, respectivamente.

Durante el interrogatorio realizado luego de la administración de cada producto (y durante los dos días posteriores), solo en una oportunidad un voluntario declaró sentir el ritmo cardíaco acelerado (taquicardia), pero no fue necesario tomar ninguna medida ya que dicho efecto remitió al poco tiempo (30 minutos aproximadamente). Este episodio no se consideró en el análisis posterior por no tratarse de un efecto adverso típico de CBZ.

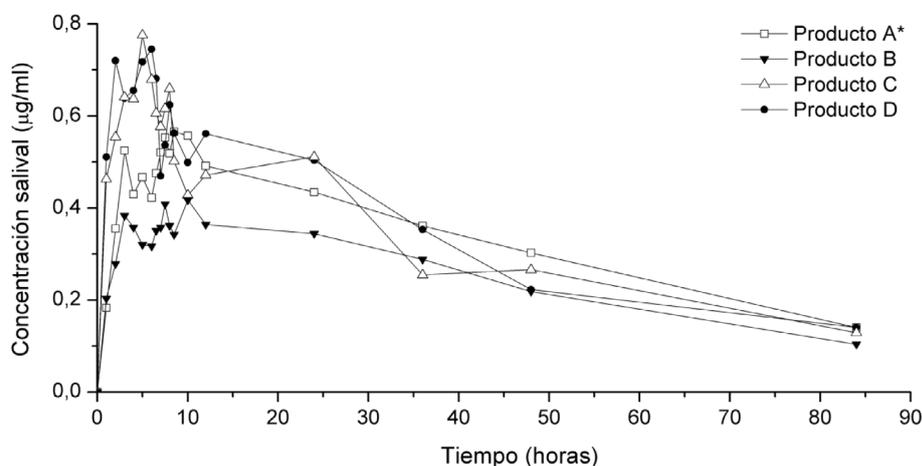
La Tabla 4-14 muestra los parámetros farmacocinéticos en saliva (promedio de los ocho voluntarios) obtenidos para cada una de las cuatro formulaciones ensayadas: concentración máxima lograda ( $C_{max}$ ), tiempo correspondiente a dicha  $C_{max}$  ( $T_{max}$ ), área bajo la curva desde cero hasta 84 horas ( $ABC_{0-t}$ ), área bajo la curva desde cero hasta infinito ( $ABC_{0-inf}$ ), constante de eliminación ( $K_e$ ) y semivida de eliminación ( $t_{1/2}$ ).

**Tabla 4-14.** Parámetros farmacocinéticos obtenidos luego de la administración oral de cuatro formulaciones de CBZ 200 mg comprimidos de liberación inmediata a ocho voluntarios sanos (producto A\* -Referencia, Tegretol- B, C y D). Los valores presentados para cada producto son el promedio de todos los voluntarios (en el caso de Tmax se presenta la mediana en vez de la media de manera que el valor informado sea un punto realmente muestreado). SD: desviación estándar

Parámetro	Producto A*	Producto B	Producto C	Producto D
<b>Cmax (mg/L)</b>				
Media (SD)	0,684 (0,181)	0,499 (0,224)	0,970 (0,217)	0,899 (0,183)
Rango	0,452 - 0,975	0,242 - 0,904	0,716 - 1,312	0,662 - 1,187
<b>Tmax (h)</b>				
Mediana	7,5	10,0	4,5	6,25
Rango	3,0 - 10,0	3,0 - 24,0	2,0 - 6,5	2,0 - 8,0
<b>ABC<sub>0-t</sub> (mg.h/L)</b>				
Media (SD)	27,61 (6,66)	20,80 (7,78)	28,49 (5,25)	27,26 (5,91)
Rango	18,27 - 37,12	10,65 - 35,52	24,09 - 40,51	20,83 - 35,70
<b>ABC<sub>0-inf</sub> (mg.h/L)</b>				
Media (SD)	35,76 (10,27)	26,23 (9,89)	39,34 (15,14)	34,38 (8,94)
Rango	21,86 - 49,74	13,13 - 42,43	28,73 - 75,09	23,19 - 36,59
<b>Cmax/ABC<sub>0-t</sub> (1/h)</b>				
Media (SD)	0,025 (0,006)	0,024 (0,007)	0,034 (0,008)	0,033 (0,005)
Rango	0,018 - 0,034	0,016 - 0,035	0,026 - 0,049	0,025 - 0,042
<b>Ke (1/h)</b>				
Media (SD)	0,020 (0,005)	0,022 (0,005)	0,021 (0,008)	0,024 (0,007)
Rango	0,012 - 0,028	0,012 - 0,026	0,006 - 0,033	0,012 - 0,033
<b>t<sub>1/2</sub> (h)</b>				
Media (SD)	37,40 (11,59)	34,09 (10,57)	42,39 (15,80)	32,11 (11,95)
Rango	24,94 - 56,69	25,32 - 58,87	20,79 - 84,97	21,03 - 55,55

En la Figura 4-8 se muestran los perfiles promedio de cada una de las especialidades ensayadas.

**Figura 4-8.** Perfiles promedio de concentración salival vs. tiempo obtenidos luego de la administración de cuatro especialidades medicinales diferentes (A\*, B, C y D) de CBZ 200 mg, comprimidos de liberación inmediata (el asterisco denota el producto de referencia, Tegretol)



Se calcularon los IC del 90% para los cocientes Test/Referencia de los parámetros farmacocinéticos (ln-transformados)  $C_{max}$ ,  $ABC_{0-t}$ ,  $ABC_{0-inf}$  y  $C_{max}/ABC_{0-t}$ . Para cada parámetro estudiado, se hizo primero un ANAVA con los datos ln-transformados de cada uno de los tres pares de productos (B/A, C/A y D/A), discriminando así los efectos debidos a los Tratamientos, Individuos y Períodos ensayados, y calculando a partir de allí la varianza residual empleada en el cálculo de los IC del 90%. También se evaluó el efecto Secuencia, pero no se tuvo en cuenta en los ANAVA definitivos debido a que la suma de cuadrados era despreciable respecto a los demás efectos, mientras que la pérdida de un grado de libertad en el error (el número total de grados de libertad es ocho) resultaba en un aumento excesivo de la varianza residual. Dichos resultados se muestran en la Tabla 4-15.

**Tabla 4-15.** Análisis de Bioequivalencia. Se presentan los cocientes Test/Referencia obtenidos con los valores ln-transformados de los parámetros farmacocinéticos y sus respectivos Intervalos de Confianza (IC) del 90%

Parámetro	Prod. B / Prod. A (N = 8)	Prod. C / Prod. A (N = 8)	Prod. D / Prod. A (N = 8)
<b>C<sub>max</sub> (mg/L)</b>			
Cociente T/R	0,730	1,418	1,314
IC 90%	48,8 - 98,1	125,7 - 162,9	106,7 - 166,1
<b>ABC<sub>0-t</sub></b>			
Cociente T/R	0,753	1,032	0,987
IC 90%	52,4 - 100,8	91,2 - 120,1	84,6 - 116,6
<b>ABC<sub>0-inf</sub></b>			
Cociente T/R	0,734	1,100	0,961
IC 90%	51,6 - 98,6	86,1 - 138,2	80,6 - 117,0
<b>C<sub>max</sub>/ABC<sub>0-t</sub></b>			
Cociente T/R	0,967	1,363	1,322
IC 90%	80,0 - 113,5	109,4 - 170,9	105,3 - 170,6

De la Tabla 4-15 se concluye, en primer lugar, que ninguna de las tres especialidades ensayadas es BE al producto de Referencia. Si bien para algunos de los parámetros farmacocinéticos evaluados los IC 90% caen dentro de la zona de aceptación (80-125%), ningún producto tiene todos sus parámetros dentro de dicha zona, o al menos uno de velocidad y uno de cantidad de manera simultánea. La Figura 4-9 muestra en forma esquemática los resultados anteriores.

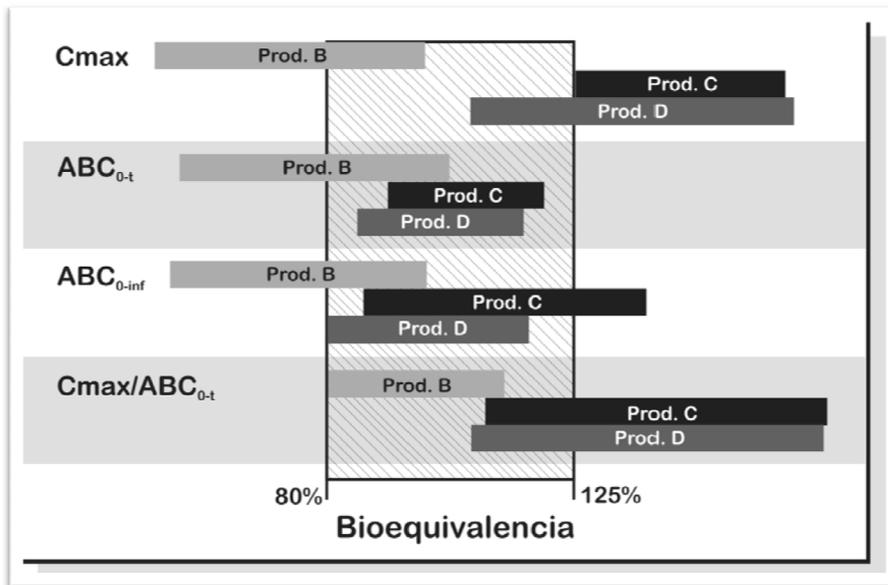


Figura 4-9. Resultados del estudio de BE entre tres productos (B, C y D) de CBZ 200 mg contra el producto de referencia, Tegretol (A). El rectángulo limitado por los valores 80-125% (rayas oblicuas en la figura) indica la zona de BE. Las barras horizontales, denominadas con los nombres de los productos ensayados, representan los IC 90% obtenidos para dichos productos, para cada uno de los parámetros farmacocinéticos evaluados (se indican a la izquierda del gráfico)

Con el producto B se obtuvieron valores de  $C_{max}$  y ABC (ambas ABC) significativamente menores que los de la referencia. Sin embargo, cuando  $C_{max}$  es dividido por  $ABC_{0-t}$ , convirtiéndose en un parámetro indicativo de velocidad, el producto B resultó BE a la referencia. Considerado a un nivel fisiológico, esto indicaría que la cinética de absorción es similar –la  $C_{max}$  se logra a un tiempo similar–, sin embargo la cantidad disponible al individuo es menor, y por eso los menores valores de  $C_{max}$  y de ABC.

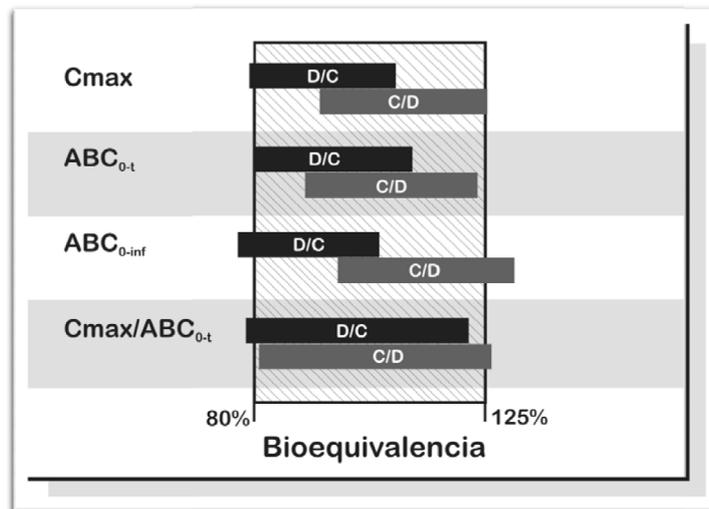
Con los productos C y D se observa exactamente lo contrario: en los parámetros indicadores de velocidad,  $C_{max}/ABC_{0-t}$  y  $C_{max}$  (este último se considera un parámetro mixto, indicador tanto de tiempo/velocidad como de cantidad), ambos productos produjeron resultados significativamente mayores al producto de referencia. Sin embargo, en cuanto a los parámetros de cantidad (ABC), el resultado fue diferente: el producto D resultó BE a la referencia para ambas ABC, mientras que C lo fue solo para  $ABC_{0-t}$ .

Cuando se repitieron los cálculos de BE, pero solamente entre los productos C y D, tomando alternativamente a cada uno como referencia, se obtuvieron los resultados que muestra la Tabla 4-16.

**Tabla 4-16.** Análisis de BE entre los productos C y D. En cada caso, se presentan los cocientes Test/Referencia obtenidos con los valores ln-transformados de los parámetros farmacocinéticos y sus respectivos IC 90%

Parámetro	Test = Prod. C Ref. = Prod. D (N = 8)	Test = Prod. D Ref. = Prod. C (N = 8)
<b>C<sub>max</sub> (mg/L)</b>		
Cociente T/R	1,079	0,927
IC 90%	92,2 - 125,3	79,8 - 108,5
<b>ABC<sub>0-t</sub></b>		
Cociente T/R	1,045	0,957
IC 90%	89,8 - 123,7	80,8 - 111,4
<b>ABC<sub>0-inf</sub></b>		
Cociente T/R	1,144	0,874
IC 90%	96,1 - 131,3	76,1 - 104,0
<b>C<sub>max</sub>/ABC<sub>0-t</sub></b>		
Cociente T/R	1,031	0,970
IC 90%	81,4 - 127,8	78,2 - 122,9

Si bien los productos C y D no resultan BE entre sí, independientemente de cuál de ellos es considerado referencia, es evidente una gran semejanza en sus desempeños, como muestra esquemáticamente la Figura 4-10.



**Figura 4-10.** Resultados del estudio de BE entre los productos C y D. El rectángulo limitado por los valores 80-125% (rayas oblicuas en la figura) indica la zona de BE. Las barras horizontales negras corresponden a los IC 90% calculados para el parámetro correspondiente (indicado a la izquierda del gráfico) cuando se toma al producto C como la Referencia. Las barras horizontales grises son el caso contrario, D como Referencia

## Discusión y conclusiones parciales

Este capítulo, dedicado al principio activo Carbamazepina, comenzó con el ensayo planteado en pacientes: monitoreos en estado estacionario cuando se administraban dos especialidades medicinales diferentes. Los resultados, expresados como concentraciones plasmáticas y salivales, tanto de CBZ como de su metabolito activo E-CBZ, fueron significativamente diferentes entre los productos estudiados. Pero dicha diferencia, más que avalar la hipótesis de que productos BE promedio no son intercambiables en todos los pacientes estabilizados, parecía estar indicando otro hecho: que los productos ensayados no eran BE promedio. Por ello se planteó el ensayo en voluntarios que, entre otras cosas, demostró que los productos administrados a los pacientes no cumplían con la prueba de BE promedio.

La bioinequivalencia encontrada entre los productos analizados podría tener múltiples explicaciones, entre ellas:

- falta de homogeneidad entre lotes, lo que puede causar que los lotes empleados aquí de cualquiera de los cuatro productos de CBZ 200 mg difieran respecto a los lotes utilizados para los ensayos de BE pre-comercialización;
- modificación de alguna etapa/materia prima en el proceso de producción;
- procesos de biocaducidad.

Muchos de los problemas con formulaciones de CBZ que se encuentran en la literatura se deben al efecto inesperado de la humedad sobre los comprimidos. El reporte de Bell y colaboradores, presentado en la Tabla 4-1, es un ejemplo de la pérdida de potencia de una FG de CBZ por efecto de la humedad (Bell et al., 1993). Otro ejemplo clásico es el informado por Meyer y colaboradores: en 1988 aparecieron reportes acerca de problemas (aparición de convulsiones y hasta un caso de muerte) relacionados a una FG de CBZ, y cuando los productos se retiraron para su análisis (algunos fueron encontrados en el gabinete del baño de los pacientes) se comprobó que no sólo no cumplían con el ensayo de disolución, sino que dos de ellos presentaban una BD muy inferior al producto de referencia, mientras que otro superaba en BD a la referencia (Meyer et al., 1992). Si bien las FG habían demostrado su BE respecto al líder, con posterioridad se habían producido dos modificaciones: cambio del origen de la materia prima CBZ y reducción del tamaño de partícula de la misma.

A raíz de lo anterior, la FDA realizó el estudio del efecto de la humedad sobre los comprimidos de CBZ. Wang y colaboradores demostraron que éstos pueden perder hasta un 33% de su efectividad si son almacenados en condiciones húmedas, típicas de la mayoría de los cuartos de baño (Wang et al., 1993). Este estudio también demostró que la formulación de los comprimidos influye en su sensibilidad a la humedad. Para CBZ, se ha reportado la existencia de cuatro polimorfos (I-IV) y una forma dihidratada (Gosselin et al., 2003). Termodinámicamente, las formas anhidras se disuelven más rápido, pero en contacto con la humedad del ambiente se transforman en la forma dihidratada, más estable y menos soluble (Young & Suryanarayanan, 1991).

¿Podría ser lo anterior la causa de algunos de los resultados presentados en este capítulo? El estudio de Wang se llevó a cabo con comprimidos almacenados en frascos plásticos multidosis, que eran periódicamente abiertos en ambientes de alta humedad relativa (HR). Los comprimidos ensayados aquí permanecieron en los blíster originales

hasta el momento de su administración. Los blíster empleados en la industria farmacéutica pueden ser elaborados empleando diferentes tipos de plásticos [policloruro de vinilo (PVC), cloruro de polivinilideno (PVDC), polipropileno (PP), entre otros] siendo PVC el elegido en casi todos los casos (Pilchik, 2000). Si bien este tipo de envase brinda a los comprimidos una mayor protección contra la humedad, en comparación con un frasco o botella multidosis, posee un cierto grado de permeabilidad al vapor de agua (medida por medio del WVTR: *water-vapor transmission rate*) [Wilches et al., 2003]. Estudios han demostrado que los comprimidos envasados en blíster de PVC y PVDC con el tiempo absorben agua de manera directamente proporcional a la HR del ambiente donde son conservados (Corveleyn & Remon, 1999).

Es difícil saber si la menor BD demostrada por el producto B puede deberse al efecto de la humedad, ya que se necesitarían estudios adicionales. Pero es una hipótesis válida, sobre todo si se tiene en cuenta que, al igual que en el caso reportado por Meyer en 1992, el producto B demostró su BE respecto al producto líder Tegretol frente a la Autoridad Sanitaria Argentina (ANMAT, 2011). Además, según lo reportado por Wang en 1993, distintas formulaciones pueden presentar distinta sensibilidad a la humedad, lo que explicaría por qué solo el producto B hubiera sido afectado (ya que todos se conservaron en iguales condiciones).

Pero independientemente de la causa, el efecto fue bioinequivalencia, tanto en los voluntarios sanos como en los pacientes. Si un paciente epiléptico hubiera estado estabilizado con la formulación de referencia (A\*, o con los productos C o D) y la misma hubiese sido intercambiada por el producto B, tendría altas probabilidades de desarrollar una convulsión por falta de efecto terapéutico. Por el contrario, si hubiera estado consumiendo el producto B y éste se hubiera cambiado por A\*, C o D, posiblemente experimentaría efectos adversos relacionados al aumento de las concentraciones plasmáticas de CBZ. Existen múltiples resultados similares a éstos en la bibliografía: estudios de BE promedio entre el producto líder y una o más FG donde el resultado es de inequivalencia. La Tabla 4-17 muestra algunos ejemplos, limitándose solo a CBZ:

**Tabla 4-17.** Estudios de biodisponibilidad relativa encontrados en la literatura que involucran productos conteniendo CBZ

Cita	Descripción	Resultados principales
(Glende et al., 1983)	Dosis única (8 voluntarios) Dosis múltiple (5 pacientes)	Se observó mayor velocidad de absorción del producto genérico aunque la magnitud de la absorción fue similar en general
(Neuvonen, 1985)	Estudio cruzado en 9 voluntarios sanos	Se analizaron 5 productos de CBZ: hubo diferencias significativas de hasta 7 veces en la BD total y efectos adversos (mareos, ataxia) generados por los productos de rápida absorción
(Hartley et al., 1990)	Estudio cruzado doble ciego en 23 niños	Los niños fueron tratados con Tegretol y una FG de CBZ por 6 semanas. No cambió el control de las convulsiones, pero la FG produjo significativamente más efectos neurológicos adversos, aunque sin diferencias en los niveles plasmáticos

<i>(Reunanen et al., 1992)</i>	Estudio cruzado en 21 pacientes	BD comparativa en dosis múltiple de productos de liberación prolongada. Se encontraron diferencias significativas en la BD (la FG 11% mayor a Tegretol Retard). Más convulsiones con el producto de marca, aunque la diferencia no fue significativa
<i>(Wolf et al., 1992)</i>	Estudio cruzado en 10 pacientes en monoterapia con CBZ	Se compararon tres FG. Pequeñas diferencias en los valores medios de los parámetros farmacocinéticos, pero grandes diferencias entre individuos. Con una de las FG se redujeron las convulsiones en un paciente pero aumentó la toxicidad
<i>(Meyer et al., 1992)</i>	Estudio cruzado en 24 voluntarios sanos	Se encontró un amplio rango de BD entre FG retiradas del mercado por denuncias de fallas clínicas. Respecto a Tegretol, la Cmax media fue del 61-74% en dos FG y de 142 en otra. Las ABC medias fueron entre el 60-113% respecto a Tegretol
<i>(Silpakit et al., 1997)</i>	Estudio cruzado en 18 pacientes	Se compararon los parámetros farmacocinéticos de tres FG respecto a Tegretol. Una FG no resultó BE (IC 90% para ABC fuera del 80-125% de Tegretol)
<i>(Jung et al., 1997)</i>	Estudio cruzado en 12 voluntarios sanos	Se analizaron tres productos del mercado mejicano respecto al líder Tegretol. Respecto a Tegretol, la Cmax de los demás productos fue entre un 13-40% mayor ( $p < 0,05$ ) y las ABC entre un 7-24% mayores también a Tegretol ( $p < 0,05$ )
<i>(Meyer et al., 1998)</i>	Estudio cruzado en 18 voluntarios sanos	Se compararon tres FG contra Tegretol. Los IC 90% para la Cmax de los FG estuvieron entre el 111-126% y para ABC entre el 97-108%. Las FG se absorbieron más rápido que Tegretol
<i>(Olling et al., 1999)</i>	Estudio en 18 voluntarios sanos	Se analizaron los parámetros farmacocinéticos de tres FG más Tegretol y se compararon con la incidencia de efectos adversos. El efecto principal (mareo, vértigo) fue proporcional a la variación en la velocidad de absorción

La tabla resume ejemplos de situaciones de no equivalencia entre productos de CBZ, es decir, situaciones de riesgo para los pacientes por consumir productos no BE. Pero también resulta interesante analizar otro aspecto riesgoso para los pacientes medicados con FEMT: las diferencias en la BD manifestadas en algunos individuos, aun cuando el resultado global entre los productos analizados sea de BE. Por ejemplo, en un estudio de BE en el que se demostró BEM trabajando con un grupo de 40 pacientes, se observó que un cuarto de ellos (25%) presentaba variaciones de ABC mayores al 20%, llegando a diferencias tan grandes como el 53% (Crawford et al., 2006).

Para analizar esas situaciones de no-equivalencia individuales se realizaron simulaciones de estudios de BEM para productos de CBZ 200 mg, aplicando la misma metodología descrita en la sección 3.3 del capítulo anterior. Se simularon los valores de  $ABC_{0-inf}$  (calculados según  $ABC = F \cdot D / Vd \cdot Ke$ ), y para ello se aleatorizaron los valores del volumen de distribución (Vd), la constante de eliminación (Ke) y la fracción absorbida (F). En todos los casos la dosis (D) fue 200 mg. Para cada estudio de BEM simulado el programa arrojó doce valores aleatorios (correspondientes a 12 voluntarios) de Vd, Ke,  $F_R$  y  $F_T$ , con los que se calcularon 24 valores ABC (12 con  $F_R$  y 12 con  $F_T$ ).

Se simularon cuatro situaciones diferentes:

- caso 1: Igual BD de R y T ( $F_R = F_T = 0,85$ ;  $\Delta F_{R-T} = 0$ )
- caso 2:  $F_T = 0,9$ ,  $F_R = 0,85$  ( $\Delta F_{R-T} = 0,05$ )
- caso 3:  $F_T = 0,9$ ,  $F_R = 0,80$  ( $\Delta F_{R-T} = 0,10$ )
- caso 4:  $F_T = 0,9$ ,  $F_R = 0,75$  ( $\Delta F_{R-T} = 0,15$ )

En cada caso se permitió una variación del 10% de los valores de F. El Vd se aleatorizó alrededor del valor población 1,4 L/kg (se consideró un peso promedio de 70 kg) con un CV = 20%, y la Ke alrededor de 0,022 h<sup>-1</sup> también con un CV del 20% (Clarke's analysis of drugs and poisons, 2004; Armijo et Herranz, 1998). Para cada BEM simulada se realizó el ANAVA con los valores de ABC y se calculó el IC 90% de la media geométrica. En cada simulación se registraron los valores de: ABC<sub>T</sub> y ABC<sub>R</sub> medios, error cuadrático medio ( $S^2_{error}$ ), límite superior e inferior del IC 90% y número de voluntarios con diferencias en sus valores de ABC > al 20, 30 y 40%. Como una forma de corroborar los valores empleados, se verificó que tanto las ABC como los CV de las mismas, calculadas a partir de dichos valores, fueran del orden de valores experimentales reales (Jung et al., 1997; Meyer et al., 1992; Olling et al., 1999). En la Tabla 4-18 se presentan los resultados finales, luego de realizar 250 simulaciones para cada situación planteada:

**Tabla 4-18.** Estudios simulados por computadora de biodisponibilidad relativa de comprimidos conteniendo 200 mg de CBZ. Se informa el número de voluntarios con diferencias de ABC > al 20, 30 y 40% encontrados en las simulaciones BE y en las no-BE (entre paréntesis se indica el % que representan sobre el total de situaciones de BE/no-BE)

	<b>Caso 1</b> $\Delta F_{R-T} = 0$	<b>Caso 2</b> $\Delta F_{R-T} = 0,05$	<b>Caso 3</b> $\Delta F_{R-T} = 0,1$	<b>Caso 4</b> $\Delta F_{R-T} = 0,15$
<b>Simulaciones</b>	<b>250</b>	<b>250</b>	<b>250</b>	<b>250</b>
<i>Bioequivalentes</i>	248(99,2%)	229 (91,6%)	174 (69,6%)	91 (36,4%)
<i>No bioequivalentes</i>	2(0,8%)	21 (8,4%)	76 (30,4%)	159(63,6%)
<i>IC 90% (límites prom)</i>	91,55 - 110,38	95,17 - 115,27	100,81 - 121,60	106,03 - 128,00
<i>S<sup>2</sup><sub>error</sub> promedio</i>	0,0165	0,0174	0,0167	0,020
<b>Referencia</b>				
<i>ABC promedio</i>	83,07	83,40	77,25	73,58
<i>CV promedio</i>	36,8	36,7	36,2	35,8
<i>Rango</i>	17,9 - 53,7	21,4 - 60,9	14,9 - 54,6	14,0 - 69,9
<b>Test</b>				
<i>ABC promedio</i>	83,27	87,28	85,49	85,55
<i>CV promedio</i>	36,6	37,1	36,5	35,7
<i>Rango</i>	14,6 - 58,9	13,6 - 59,5	18,2 - 61,3	17,5 - 63,3

**Voluntarios**

$\Delta ABC > 20\%$	BE	870 ( <b>29,2%</b> )	844 ( <b>30,7%</b> )	633 ( <b>30,3%</b> )	320 ( <b>29,3%</b> )
	No BE	12 (50%)	124 (49,2%)	413 (45,3%)	920 (48,2%)
$\Delta ABC > 30\%$	BE	290 (9,7%)	365 (13,3%)	260 (12,4%)	121 (11,1%)
	No BE	1 (4,2%)	45 (17,9%)	185 (20,3%)	524 (27,5%)
$\Delta ABC > 40\%$	BE	35 (1,2%)	30 (1,1%)	65 (3,1%)	47 (4,3%)
	No BE	-	10 (4,0%)	75 (8,2%)	234 (12,3%)

Puede verse en la tabla anterior que los porcentajes de voluntarios con diferencias de  $ABC > 20\%$  encontrados en aquellas situaciones donde se concluye BE global (indicados con negrita en la tabla) se asemejan al 25% reportado por Crawford y colaboradores (Crawford et al., 2006).

La intercambiabilidad de medicamentos siempre se discute en términos de la prueba estadística/experimental utilizada para garantizarla o asegurarla. Extensísimas discusiones se han entablado respecto a la prueba empleada para inferir equivalencia terapéutica (discutidas con más detalle en los Capítulos 1 y 3) y, por lo tanto, certeza en el intercambio de productos. Sin embargo, independientemente del método empleado para definir intercambiabilidad, siempre van a existir situaciones de no-equivalencia, donde el intercambio esté asociado a un fracaso en la efectividad o la seguridad del tratamiento seguido por el paciente.

Cuando se trata de productos conteniendo fármacos de amplio margen terapéutico, los cambios de concentraciones plasmáticas asociados al intercambio de productos que por algún motivo no fueran BE posiblemente no serían notados por el paciente en la mayoría de los casos. Sin embargo, cuando hablamos de FEMT y más precisamente de AEDs, lo que se pone en riesgo supera con creces cualquier ahorro económico que hubiera implicado el intercambio. No sólo por el gasto ocasionado como consecuencia de la falta de efectividad/seguridad del producto introducido, como se discutió en el Capítulo 1, sino por las consecuencias no cuantificables sobre la calidad de vida del paciente.

Las consecuencias negativas de las crisis epilépticas se extienden más allá del daño que pueden causar sobre el sistema nervioso central. Los ataques tienen riesgo de causar accidentes y la ausencia de control se ha relacionado con un incremento en la mortalidad. Los pacientes con epilepsia no controlada tienen dificultades en su integración social y laboral, sufren una importante pérdida de autonomía, pierden el permiso de conducir y el temor ante la posibilidad de sufrir un ataque con frecuencia genera ansiedad, depresión y pérdida de la autoestima (García et al., 2008).

Por otro lado, las diferencias en la presentación de los medicamentos de distinto origen hace que los pacientes interpreten que se ha hecho algún cambio en su tratamiento habitual. Esto en ocasiones puede generar ansiedad, confusión y desconfianza y es difícil de cuantificar el impacto que tiene esta situación en el control de la enfermedad (García et al., 2008; Meredith, 2003). Ciertos estudios ponen de manifiesto que tanto neurólogos como pacientes desconfían de los genéricos y no tienen la percepción de que sean terapéuticamente iguales (Berg et al., 2008; Ganther & Kreling, 2000).

Todo lo anterior nos lleva a la principal conclusión de este capítulo: que no deberían intercambiarse productos conteniendo FEMT (y en particular AEDs) en pacientes estabilizados, ya que:

- a pesar de los controles establecidos por las autoridades sanitarias para asegurar la calidad biofarmacéutica de los medicamentos, es probable que siempre se puedan encontrar en el mercado productos no BE (que tal vez nunca lo fueron o que habiendo sido BE dejaron de serlo);
- siempre van a existir personas (pacientes) que experimenten diferencias en la eficacia y/o la seguridad de su tratamiento, asociadas al intercambio de un producto por otro, a pesar de que éstos hayan probado su BE según el criterio estadístico/experimental exigido;
- ninguna prueba experimental podría asegurar que dos productos se van a comportar biofarmacéutica y terapéuticamente igual frente a todas las posibles situaciones a los que sean sometidos (de conservación, de uso, estado fisio-patológico y emocional del paciente), como tampoco asegurar la misma reacción de los pacientes a la medicación.



---

---

■ Capítulo 5

**El principio de Transitividad.  
Métodos para comparar  
perfiles de disolución**





**A**corde a lo establecido en el Capítulo 1, el “Principio de Transitividad” entre medicamentos es la consecuencia (aunque no necesariamente deseable) de ensayar la bioequivalencia entre diversos productos respecto a un único producto de referencia, ya que si todos los productos ensayados demuestran su BE respecto a la referencia, se permite su comercialización y su consecuente intercambio, a pesar de que dichos intercambios no siempre serán entre una marca dada y la referencia, sino que pueden involucrar productos que no han probado ser BE entre sí. Esquemáticamente, esto significa que si B y C son BE con A, los tres podrán ser intercambiados indistintamente (A por B, A por C o B por C), a pesar de que B y C pueden no ser BE (Anderson & Hauck, 1996; Benet & Goyan, 1995; Midha et al., 1998).

En la primera parte de este capítulo (sección 5.1) se provee evidencia acerca de la falta de aplicabilidad general del principio de transitividad para definir la intercambiabilidad entre equivalentes farmacéuticos, sobre la base de una comparación exhaustiva de perfiles de disolución *in vitro* de distintos productos del mercado farmacéutico argentino. En esta primera sección, el análisis comparativo se hace mediante el cálculo del factor de similitud  $f_2$ , por ser el método aceptado por las agencias regulatorias de la mayor parte del mundo.

La hipótesis fundamental en la cual se basó dicho análisis es que, al menos para drogas pertenecientes a la clase II del BCS (Amidon et al., 1995), para las cuales la velocidad de disolución en el medio biológico es el factor limitante de la velocidad final del proceso de absorción, hay una elevada probabilidad de que si no se demuestra similitud entre los perfiles de liberación *in vitro* de dos productos no se encuentre luego BE *in vivo*. Esto está de acuerdo con muchos estudios recientes que promueven la extensión del concepto de bioexención a drogas de las clases II y III del BCS.

En la segunda parte de este capítulo (sección 5.2) se analizan los diversos métodos existentes para la comparación de perfiles de disolución. Estos métodos pueden clasificarse en tres categorías:

- **Métodos independientes del modelo:** son aquellos que permiten comparar perfiles de disolución sin necesidad de ajustar los datos a un modelo preestablecido que los represente. Incluyen los métodos matemáticos de cálculo de índices de diferencia/similitud, como los factores  $f_1$  y  $f_2$  (Moore & Flanner, 1996) o los índices  $\xi_i$  de Rescigno (Rescigno, 1992), y la comparación de parámetros obtenidos a partir de los perfiles, como el área bajo la curva (ABC) y/o la eficiencia de disolución (ED).

- **Métodos estadísticos basados en ANAVA:** son aquellos que tratan al porcentaje disuelto como variable aleatoria y la someten a un análisis de varianza, tomando a

la formulación como única variable de clase (monofactorial) y comparando tiempo a tiempo, o considerando a la formulación y el tiempo (bifactorial) en forma simultánea, bajo la hipótesis nula de similitud. Sin embargo, su aplicación no es estrictamente correcta ya que se viola la hipótesis de independencia debido a la correlación entre el % Disuelto y el tiempo (O'Hara et al., 1998).

- **Métodos dependientes del modelo:** son aquellos que incluyen diferentes formas estadísticas de comparación de perfiles, con el denominador común de precisar, todas ellas, una etapa previa de modelado de los datos, de manera de ajustarlos a ecuaciones que describan su evolución temporal. El criterio de selección del modelo y la interpretación de sus parámetros son desventajas de estos métodos. Luego de ajustados, los datos pueden compararse de diversas maneras, tales como la prueba  $T^2$  de Hotelling (Saranadasa, 2001) o mediante "regiones de similitud" (Sathe et al., 1996).

La clasificación anterior no pretende ser exhaustiva y es posible encontrar en la literatura otras propuestas aplicables a la comparación de perfiles de disolución (Adams et al., 2001; Bartoszynski et al., 2001; Berry & Likar, 2007; Crowder, 1996; Chow & Ki, 1997; Mauger et al., 1986). Sin embargo, se eligieron los métodos anteriormente descriptos por ser los más aplicados y discutidos en la bibliografía del tema.

Luego de presentarlos y explicarlos, en la sección 5.2 cada uno de estos métodos de cálculo se aplica a la comparación de perfiles de disolución, mientras que en la discusión correspondiente se analizan sus aplicaciones, ventajas y limitaciones. De esa manera, se intentó responder a lo planteado en la tercera y cuarta hipótesis:

*El principio de transitividad, inevitablemente asociado a la prueba de bioequivalencia (BE) "Test (múltiples productos) vs. Referencia (un mismo producto)" no tiene validez, y por lo tanto no debería asumirse como cierto;*

*De los distintos métodos posibles para comparar perfiles de disolución, el factor de similitud  $f_2$  ofrece la mejor performance cuando se trata de comparar diferentes productos de un mismo principio activo (distintas marcas), si bien por sus limitaciones es conveniente que se complemente con otro método.*

## Ensayos realizados

### **5.1** Análisis del principio de transitividad mediante perfiles de disolución *in vitro*

#### Descripción y objetivos

En esta sección se analizan comparativamente los perfiles de disolución de todos los productos farmacéuticos (marcas) disponibles en el mercado argentino conteniendo los principios activos Ranitidina, Furosemida, Ibuprofeno y Cefalexina. Para cada caso, los perfiles de disolución de todos los pares posibles de equivalentes farmacéuticos fueron comparados mediante el cálculo del factor de similitud  $f_2$  (FDA/CDER, 1997). Dicho factor es proporcional al logaritmo de la inversa de la raíz cuadrada de la suma del error cuadrático, y es una medida de la similitud en el porcentaje de disolución entre dos curvas dadas:

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[ 1 + (1/n) \sum_{t=t_1}^{t_n} (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

■ Ecuación 5-1

Donde  $R_t$  y  $T_t$  representan el % Disuelto al tiempo  $t$  para los productos Referencia (R) y Test (T), respectivamente. Dos productos se consideraron similares si sus perfiles de disolución resultaron similares, y dos perfiles de disolución se consideran similares cuando el valor del factor  $f_2$  calculado entre ellos es mayor o igual a 50.

Si bien la falta de similitud *in vitro* (falta de similitud entre los perfiles de disolución de dos productos) no necesariamente refleja una diferencia *in vivo* (falta de bioequivalencia) se puede afirmar que al menos para cierta clase de drogas (las pertenecientes a la clase II del BCS: muy permeables, poco solubles) una diferencia significativa encontrada entre los perfiles de disolución va a significar en una biodisponibilidad diferente, ya que la disolución es la etapa limitante de la velocidad en el proceso de absorción.

Por lo tanto, el objetivo de este ensayo fue, en primer lugar, detectar si se producían desviaciones al principio de transitividad entre medicamentos conteniendo los principios activos seleccionados y, en segundo, lugar proponer soluciones a dicha situación en función del análisis de los resultados obtenidos.

## Materiales y métodos

### ● Equipos y materiales

Todos los medicamentos ensayados (Ranitidina 300 mg, Furosemida 40 mg, Ibuprofeno 400 y 600 mg y Cefalexina 500 mg comprimidos) fueron adquiridos en farmacias locales. Las sustancias de referencia fueron encargadas al Instituto Nacional de Medicamentos (INAME, República Argentina). Los demás reactivos utilizados fueron grado analítico: fosfato de potasio monobásico, ácido clorhídrico e hidróxido de sodio.

En todos los casos se determinó el perfil de disolución de seis comprimidos de cada producto ensayado y la cantidad disuelta se determinó mediante espectrofotometría UV-Visible (*ver descripción de ambos equipos –disolutor y espectrofotómetro– en el Anexo I*).

### ● Ensayos de disolución

Se obtuvieron los perfiles de disolución de todas las marcas disponibles en el mercado farmacéutico argentino correspondientes a los siguientes productos: Ranitidina comprimidos 300 mg (21 marcas), Furosemida comprimidos 40 mg (11 marcas), Ibuprofeno comprimidos 400 mg (33 marcas), Ibuprofeno comprimidos 600 mg (12 marcas) y Cefalexina comprimidos 500 mg (17 marcas).

Todos los test de disolución se llevaron a cabo de acuerdo a las condiciones establecidas por la USP 31 (USP 31/NF 24, 2008). Antes de cada ensayo, el medio de disolución fue filtrado y desgasificado a través de una membrana de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. En todos los casos, la temperatura del baño se fijó en  $37 \pm 0.5$  °C. A cada tiempo de muestreo, se tomaron 10 ml de cada vaso y se repusieron con 10 ml de medio fresco mantenido en las mismas condiciones. Las muestras así obtenidas se centrifugaron inmediatamente a 3500 rpm, se diluyeron adecuadamente y se leyeron espectrofotométricamente.

Todos los ensayos se realizaron sobre seis comprimidos de manera simultánea y para el análisis posterior se utilizaron los valores medios obtenidos para cada tiempo. La Tabla 5-1 resume las condiciones de los ensayos realizados para cada producto (para las dos dosis ensayadas de comprimidos de Ibuprofeno, 400 y 600 mg, se emplearon las mismas condiciones experimentales).

**Tabla 5-1.** Condiciones utilizadas para el ensayo de disolución de cada uno de los productos analizados de acuerdo con la USP 31 (USP 31/NF 24, 2008). Todos los ensayos se realizaron sobre seis comprimidos de manera simultánea a  $37 \pm 0.5$  °C

	Medio de Disolución - Volumen	Aparato - Velocidad de agitación	Tiempos de muestreo	Cuantificación ( $\lambda$ , nm)
Ranitidina	Agua - 900 ml	2 (paleta) - 50 rpm	5, 15, 30, 45, 60 & 90 min	314 nm
Furosemida	Buffer fosfato pH 5,8 - 900 ml	2 (paleta) - 50 rpm	5, 15, 30, 45, 60 & 90 min	271 nm
Ibuprofeno	Bufferfosfato pH 7,2 - 900 ml	2 (paleta) - 50 rpm	5, 15, 30, 60 & 90 min	222 nm
Cefalexina	Agua - 900 ml	1 (canastillo, malla40) - 100 rpm	5, 15, 30, 45 & 60 min	262 nm

Para cada uno de los cuatro métodos espectrofotométricos empleados para la determinación del porcentaje disuelto se realizó un esquema abreviado de validación: se evaluó linealidad, precisión y especificidad para cada combinación medio/longitud de onda.

● **Análisis de los datos**

Acorde a lo establecido al inicio del presente capítulo, los perfiles de disolución se compararon en base al factor de similitud  $f_2$  (FDA/CDER, 1997), y se consideraron similares todos aquellos pares para los que  $f_2 \geq 50$ . Los factores  $f_2$  fueron calculados con todos los puntos de los perfiles de disolución hasta que en cada comparación el producto considerado “referencia” superaba el 85% disuelto, luego de lo cual se tomó un tiempo más como último punto. Por lo tanto, las matrices resultantes no fueron simétricas, ya que dependiendo de qué producto actuara como referencia, en cada par considerado (y se consideraron *todos* los pares posibles), fue distinto el número de puntos tomados para el cálculo del  $f_2$ . O dicho de otra manera, para un par de productos dados se puede obtener distinto valor de  $f_2$  cuando uno u otro es considerado referencia.

En el análisis de los resultados se consideraron dos tipos posibles de desviaciones al principio de transitividad: desviaciones de tipo I, correspondientes a dos productos B y C que, habiendo probado su similitud *in vitro* con el producto de referencia A (innovador o líder del mercado), no fueron similares entre ellos ( $f_{2BA}$  y  $f_{2CA} \geq 50$ , pero  $f_{2CB} < 50$ ); y desviaciones de tipo II, correspondientes a la situación en la cual un producto dado C no es equivalente al producto de referencia A ( $f_{2CA} < 50$ ) pero es, sin embargo, similar a otro producto B el cual sí resultó similar a la referencia A ( $f_{2CB} \geq 50$  y  $f_{2BA} \geq 50$ ).

De estas dos posibles situaciones, la desviación tipo I representa el mayor riesgo, ya que puede llevar a la sustitución del producto B por el producto –no similar– C (o viceversa) sobre la base de que ambos demostraron su bioequivalencia respecto al producto A. Sin embargo, B y C no son similares en términos de sus perfiles de disolución y, como ya se dijo, para ciertas drogas esto puede reflejar diferencias en su biodisponibilidad. La desviación tipo II sólo significa que dos productos que podrían ser intercambiables no se consideran para una potencial sustitución por no haber cumplido uno de ellos con la prueba de BE respecto al producto de referencia.

Por lo tanto, la desviación tipo I implica cierto grado de riesgo para la salud del paciente (un producto puede no ser tan efectivo o seguro como otro), mientras que la desviación tipo II sólo tiene implicancias económicas.

## Resultados y discusión

La Tabla 5-2 muestra los resultados de las linealidades evaluadas para cada uno de los métodos espectrofotométricos empleados para la cuantificación de los porcentajes de droga disueltos. La especificidad se determinó para cada producto en particular, relacionando la absorbancia a dos longitudes de onda ( $\lambda$ ) de la solución de referencia respecto a la solución muestra. Los datos no se muestran porque hay tantos resultados como marcas analizadas para cada producto, pero en todos los casos el método resultó ser específico para el producto analizado.

Otra verificación indirecta de la especificidad se realizó durante el ensayo de identificación: en cada caso, para cada marca se graficó la primera derivada del espectro de absorción y se superpuso dicha curva con la correspondiente de la solución de referencia. La superposición de los ceros entre ambas curvas se utilizó como criterio de identificación, además de corroborar la falta de interferencia por parte de los excipientes de la formulación.

■ **Tabla 5-2.** Resultado del ensayo de linealidad de cada uno de los métodos espectrofotométricos empleados para la cuantificación de los porcentajes de droga disueltos

	Rango ( $\mu\text{g/ml}$ )	Ordenada (a) [IC 95%]	Pendiente	$R^2$	Suma de residuales
<i>Ranitidina</i>	4,00 - 20,00	0,0032 [-0,0145 - 0,0498]	0,0440	0,9997	8,327.10 <sup>-17</sup>
<i>Furosemida</i>	4,00 - 15,00	-0,0020 [-0,0231 - 0,0271]	0,0577	0,9994	2,770.10 <sup>-16</sup>
<i>Ibuprofeno</i>	5,00 - 15,00	-0,0032 [-0,0266 - 0,0202]	0,0451	0,9990	-2,775.10 <sup>-17</sup>
<i>Cefalexina</i>	8,00 - 34,00	0,0031 [-0,0179 - 0,0242]	0,0453	0,9997	2,220.10 <sup>-16</sup>

La precisión del método y del sistema se evaluó como coeficiente de variación a tres niveles de concentración: el menor, medio y mayor de la curva de calibración. En todos los casos, la precisión del sistema resultó menor al 1% y la del método menor al 2%.

Las figuras que se presentan a continuación muestran los perfiles de disolución de los productos ensayados. Cada gráfico consta de dos partes: los gráficos más pequeños presentan los perfiles de disolución de todos los productos ensayados para cada droga;

mientras que los gráficos más grandes muestran ejemplos de desviaciones al principio de transitividad. En dichos ejemplos se muestran: el perfil de disolución del producto R (denotado por un asterisco), el perfil de un producto involucrado en una desviación de tipo I (denotado con el superíndice †) y los perfiles de los demás productos involucrados en la desviación con él (similares a R pero no al producto †).

En el caso de Ibuprofeno 600 mg (Figura 5-5), como no se observó ninguna desviación de tipo I, el gráfico muestra la única desviación de tipo II que se encontró. Por ejemplo, la Figura 5-1 muestra el perfil de disolución del producto de Ibuprofeno 400 mg denominado AB ( $AB-Ibu4^{\dagger}$ ), junto al del producto de referencia ( $A-Ibu4^*$ ) y los de todos los productos involucrados en desviaciones de tipo I con  $AB-Ibu4^{\dagger}$  ( $E-Ibu4$ ,  $F-Ibu4$ ,  $O-Ibu4$ ,  $T-Ibu4$ ,  $Y-Ibu4$ ,  $AC-Ibu4$  y  $AF-Ibu4$ ).

Cabe destacar que en todos los ejemplos presentados los perfiles involucrados en las desviaciones son, circunstancialmente, de productos que se disuelven bien en el medio considerado (más del 85% disuelto en los primeros 30 minutos). Esto es una consecuencia del hecho de que, en todos los casos, el producto de referencia se disolvió bien. Sin embargo, si para una droga dada el producto de referencia se hubiera disuelto en menor medida las desviaciones al principio de transitividad habrían involucrado productos con perfiles cercanos, es decir, de disolución más lenta. Esto es lógico ya que si recordamos las definiciones anteriores de desviaciones tipo I y II ambas implican que al menos uno de los dos productos genéricos involucrados en la desviación sea similar al producto de referencia.

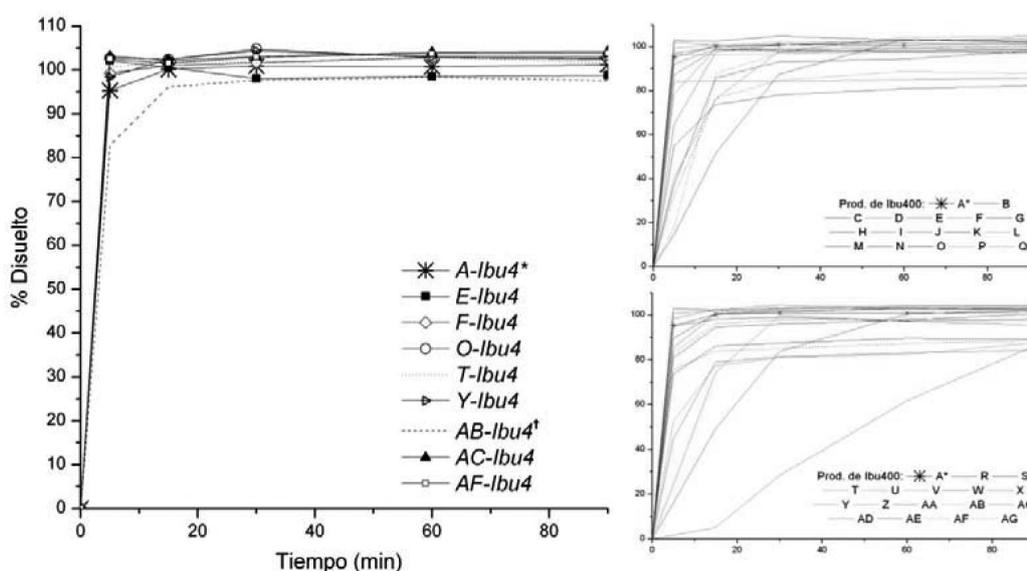


Figura 5-1. Perfiles de disolución de productos de Ibuprofeno 400 mg. A la derecha se muestran todos los productos ensayados y a la izquierda, más grande, un ejemplo de desviación del principio de transitividad. El asterisco denota al producto de referencia y el superíndice (†) al producto elegido, involucrado en una desviación de tipo I con todos los demás productos mostrados

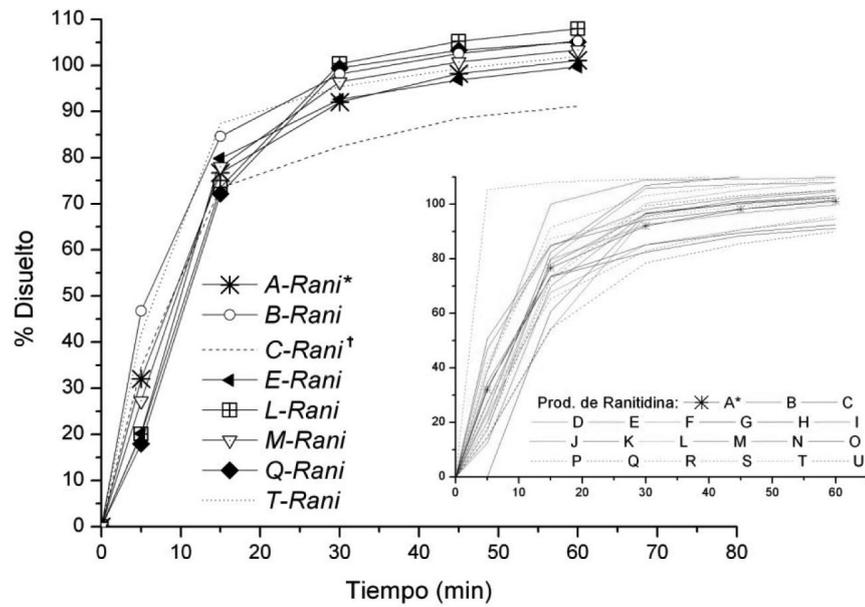


Figura 5-2. Perfiles de disolución de productos de Ranitidina 300 mg. A la derecha se muestran todos los productos ensayados y a la izquierda, más grande, un ejemplo de desviación del principio de transitividad. El asterisco denota al producto de referencia y el superíndice (†) al producto elegido, involucrado en una desviación de tipo I con todos los demás productos mostrados

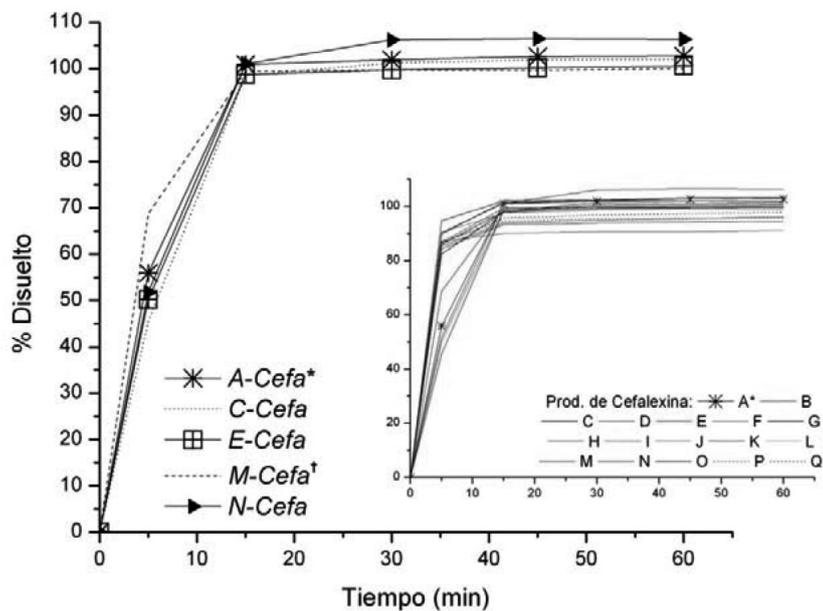


Figura 5-3. Perfiles de disolución de productos de Cefalexina 500 mg. A la derecha se muestran todos los productos ensayados y a la izquierda, más grande, un ejemplo de desviación del principio de transitividad. El asterisco denota al producto de referencia y el superíndice (†) al producto elegido, involucrado en una desviación de tipo I con todos los demás productos mostrados

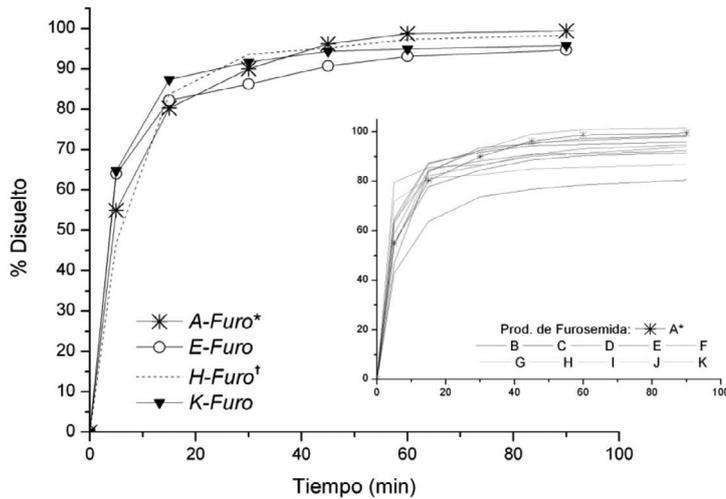


Figura 5-4. Perfiles de disolución de productos de Furosemida 40 mg. A la derecha se muestran todos los productos ensayados y a la izquierda, más grande, un ejemplo de desviación del principio de transitividad. El asterisco denota al producto de referencia y el superíndice (†) al producto elegido, involucrado en una desviación de tipo I con todos los demás productos mostrados

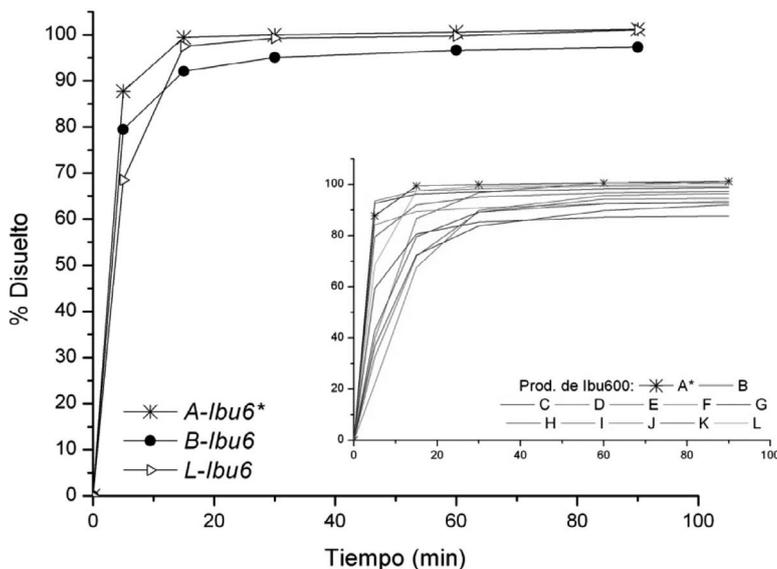


Figura 5-5. Perfiles de disolución de productos de Ibuprofeno 600 mg. A la derecha se muestran todos los productos ensayados y a la izquierda, más grande, un ejemplo de desviación del principio de transitividad. El asterisco denota al producto de referencia. Como para este producto no se encontraron desviaciones de tipo I, en el gráfico se presenta la única desviación de tipo II que se observó (el producto B es similar a A, mientras que L es similar a B pero no a A)

A continuación, las tablas desde la 5-3 hasta la 5-7 presentan los valores de los  $f_2$  calculados para todos los pares de productos posibles. Como las tablas son de doble entrada, cada par de productos A-B se encuentra dos veces: la fila de A con la columna de B y luego la fila de B con la columna de A. El producto en la fila se consideró como referencia. De esta manera, se puede modificar ligeramente el valor del  $f_2$  calculado

para un par dado, ya que para su cálculo se tomó solamente un punto más luego de que la referencia se disolvió el 85%, lo que puede modificarse según A o B sean considerados referencia. De todas maneras, en las tablas puede verse que en la mayoría de los casos esto no sucede y los resultados son simétricos. Esta forma de elegir la referencia es solamente para el cálculo del  $f_2$ , ya que para la determinación posterior de las desviaciones se computaron los valores de dichos factores de similitud respecto a un único producto de referencia preestablecido.

La primera fila de cada tabla (indicada con el texto en negrita) corresponde al producto de referencia establecido por la autoridad sanitaria nacional (ANMAT). En el caso de productos para los cuales dicha autoridad no ha definido referencia se consideró como tal al producto líder del mercado. Las celdas blancas con borde negro denotan las desviaciones del principio de transitividad de tipo I, mientras que las celdas sombreadas de gris las de tipo II. Si bien sólo se ha considerado un producto de referencia (definido por ANMAT o el líder del mercado), si se consideraran otros productos como referencia surgirían más desviaciones al principio de transitividad.

Tabla 5-3. Comparación de los factores  $f_2$  calculados para todos los pares posibles de productos de ibuprofeno 600 mg comprimidos. Las celdas con fondo gris denotan las desviaciones de tipo II al principio de transitividad

	A-Ibu6*	B-Ibu6	C-Ibu6	D-Ibu6	E-Ibu6	F-Ibu6	G-Ibu6	H-Ibu6	I-Ibu6	J-Ibu6	K-Ibu6	L-Ibu6
A-Ibu6*	100	57,6	23,0	71,0	26,9	54,4	70,3	26,8	22,0	18,5	33,5	47,5
B-Ibu6	57,6	100	27,6	52,3	31,6	69,3	54,4	32,2	26,3	22,1	41,9	56,2
C-Ibu6	27,9	32,8	100	26,8	48,6	32,0	27,4	64,5	69,9	54,4	47,7	34,6
D-Ibu6	71,0	52,3	21,6	100	24,8	53,7	91,0	25,0	20,6	17,3	31,6	41,9
E-Ibu6	26,9	31,6	47,5	24,8	100	29,1	25,2	59,9	49,2	40,6	43,1	37,2
F-Ibu6	54,4	69,3	26,5	53,7	29,1	100	56,7	30,4	25,0	21,0	40,4	47,3
G-Ibu6	70,3	54,4	22,2	91,0	25,2	56,7	100	25,6	21,1	17,7	32,5	42,6
H-Ibu6	29,7	35,2	62,3	28,0	58,0	33,5	28,6	100	59,1	45,8	52,3	38,6
I-Ibu6	25,0	29,4	68,5	23,7	51,0	28,1	24,2	59,1	100	62,0	41,5	32,0
J-Ibu6	21,6	25,2	52,7	20,4	43,3	24,1	20,8	45,8	62,0	100	34,5	27,5
K-Ibu6	35,2	43,5	45,6	33,8	43,1	43,1	34,8	52,3	41,5	34,5	100	43,6
L-Ibu6	47,5	56,2	30,0	41,9	37,2	47,3	42,6	36,0	29,1	24,5	43,1	100

\*Producto de referencia, Ibupirac 600 mg, Lab. Pfizer

Tabla 5-4. Comparación de los factores  $f_2$  calculados para todos los pares posibles de productos de ibuprofeno 400 mg comprimidos (primera parte). Las celdas blancas con borde negro marcan las desviaciones de tipo I del principio de transitividad y las celdas con fondo gris las desviaciones de tipo II. Las celdas negras con texto en blanco denotan los casos donde al menos un producto (de un par involucrado en una desviación de tipo I) presentó un valor de  $f_2$  menor a 55, calculado respecto al producto de referencia. Notar que en 15 de los 27 errores tipo I que se observan en la tabla el valor de  $f_2$  entre los productos B y C (es decir, los que fueron similares a la referencia A pero no entre ellos) es mayor a 45

A- Ibnd*	R- Ibnd	C- Ibnd	D- Ibnd	E- Ibnd	F- Ibnd	G- Ibnd	H- Ibnd	I- Ibnd	J- Ibnd	K- Ibnd	L- Ibnd	M- Ibnd	N- Ibnd	O- Ibnd	P- Ibnd	Q- Ibnd	R- Ibnd	S- Ibnd	T- Ibnd	U- Ibnd	V- Ibnd	W- Ibnd	X- Ibnd	Y- Ibnd	Z- Ibnd	AA- Ibnd	AB- Ibnd	AC- Ibnd	AD- Ibnd	AE- Ibnd	AF- Ibnd	AG- Ibnd	
100	77,3	22,9	23,0	67,8	79,5	25,5	92,6	41,4	50,4	13,0	73,6	65,0	37,5	64,4	17,1	20,0	61,3	86,1	73,3	18,0	25,9	38,7	12,8	75,1	2,8	51,3	55,3	65,3	23,7	72,8	67,3	38,9	
B-Ibnd	77,3	100	24,3	24,3	61,2	65,3	72,6	45,2	55,0	13,8	75,3	75,7	39,8	55,6	18,1	21,3	64,9	61,9	61,9	19,0	27,7	42,2	13,7	62,2	3,5	57,4	62,3	56,7	25,3	76,8	57,9	41,4	
C-Ibnd	22,9	24,3	100	59,8	20,7	21,5	22,3	28,1	29,8	31,0	23,0	26,2	37,5	20,1	46,8	55,6	26,5	23,2	21,0	48,4	45,7	33,6	30,1	21,5	10,0	29,5	28,3	20,1	52,4	24,9	20,4	32,4	
D-Ibnd	26,1	27,2	56,5	100	23,8	24,7	38,4	25,5	29,9	32,4	36,5	29,0	39,3	23,4	44,2	48,2	29,5	26,3	24,1	35,3	41,1	35,3	35,4	24,7	12,0	32,3	21,2	23,3	43,3	28,0	23,6	34,0	
E-Ibnd	67,8	61,2	20,7	20,8	100	77,0	72,6	39,5	43,1	11,7	68,1	52,8	33,1	68,9	15,4	18,2	49,7	67,4	78,6	16,2	23,9	35,5	11,6	67,4	2,4	44,5	47,0	74,5	21,7	55,9	75,5	35,3	
F-Ibnd	79,5	65,3	21,5	21,6	77,0	100	87,2	39,1	45,8	12,1	68,3	56,7	34,8	76,0	16,1	18,8	54,5	73,0	92,4	16,9	24,3	36,1	12,0	84,1	2,4	46,5	49,6	78,7	22,2	62,2	82,1	35,6	
G-Ibnd	28,5	30,7	41,3	36,9	27,5	26,9	100	27,6	42,1	33,3	30,2	31,8	34,9	25,6	32,1	47,4	29,9	29,9	26,6	35,7	72,2	45,9	30,8	26,5	17,1	34,6	33,8	25,4	62,7	29,2	25,7	46,9	
H-Ibnd	92,6	72,6	22,3	22,4	72,6	87,2	100	40,9	48,4	12,7	74,4	61,3	36,3	67,8	16,7	19,6	58,0	83,5	78,9	17,5	25,4	37,9	12,5	77,6	2,7	49,4	53,0	69,4	23,1	67,5	71,8	37,3	
I-Ibnd	40,9	45,2	32,5	30,9	41,0	38,6	42,1	100	43,8	22,1	45,4	45,3	39,1	36,6	25,1	31,7	40,2	44,3	38,2	27,0	41,8	62,6	22,4	37,5	11,9	47,2	47,2	36,3	37,5	40,4	36,8	68,5	
J-Ibnd	50,4	55,0	29,8	29,4	43,1	45,8	48,4	45,0	100	16,6	48,9	64,6	54,4	41,9	22,4	25,6	66,8	50,9	44,4	23,1	32,6	48,9	16,4	46,0	4,5	72,3	74,0	41,9	30,1	59,0	42,5	45,8	
K-Ibnd	16,1	16,9	33,6	36,5	14,8	15,2	15,8	20,1	19,7	100	16,4	17,9	23,0	14,3	36,1	38,3	18,0	16,4	14,9	42,2	29,8	22,8	77,5	15,1	18,1	20,0	19,2	14,3	31,9	17,2	14,5	22,5	
L-Ibnd	73,6	75,3	23,0	23,2	68,1	68,3	74,4	45,2	48,9	13,3	100	62,3	36,7	58,0	17,0	20,4	55,9	85,0	64,7	18,0	26,8	40,6	13,3	62,0	3,4	52,1	55,2	59,9	24,2	63,4	61,4	40,3	
M-Ibnd	65,0	75,7	26,2	26,1	52,8	56,7	28,8	61,3	46,0	14,8	62,3	100	44,1	50,1	19,6	22,8	76,8	66,5	54,3	20,4	29,5	45,1	14,7	55,9	3,8	66,1	75,1	50,5	27,0	80,0	51,4	45,5	
N-Ibnd	37,5	39,8	37,5	36,2	33,1	34,8	35,0	36,3	39,0	19,8	36,7	44,1	100	32,6	27,8	31,0	45,8	37,7	34,0	28,5	37,4	47,1	19,4	35,1	5,7	50,1	48,4	32,4	35,6	41,9	32,8	43,4	
O-Ibnd	64,4	55,6	20,1	20,2	68,9	76,0	22,3	35,8	41,9	11,2	58,0	50,1	32,6	100	15,0	17,5	49,5	60,4	80,6	15,8	22,6	33,1	11,1	78,2	1,7	42,1	44,7	91,8	20,7	54,8	90,6	32,7	
P-Ibnd	17,1	18,1	46,8	41,8	15,4	16,1	16,7	20,5	22,4	33,1	17,0	19,6	27,8	15,0	100	44,4	20,0	17,3	15,7	52,9	32,1	24,2	31,4	16,2	10,1	21,8	21,1	15,0	36,4	18,8	15,2	23,4	
Q-Ibnd	24,8	26,4	54,8	45,4	23,4	23,5	47,4	24,2	31,7	30,2	39,0	25,5	34,4	22,3	45,3	100	27,1	25,6	23,1	51,3	51,3	36,2	39,1	23,3	17,5	30,4	29,6	22,2	59,5	26,1	22,4	35,5	
R-Ibnd	61,3	64,9	26,5	26,4	49,7	54,5	28,1	58,0	42,4	66,8	14,9	55,9	45,8	49,5	20,0	22,8	100	60,2	52,5	20,8	28,9	42,9	14,6	55,5	3,6	61,8	68,8	49,2	26,7	78,1	50,1	41,1	
S-Ibnd	86,1	83,4	23,2	23,4	67,4	73,0	26,3	85,5	43,7	13,3	85,0	66,5	37,7	60,4	17,3	20,4	60,2	100	68,0	18,2	26,6	40,2	13,2	67,2	3,2	53,1	57,0	61,8	24,2	70,5	63,5	39,6	
T-Ibnd	73,3	61,9	21,0	21,0	78,6	92,4	23,4	38,0	44,4	11,7	64,7	54,3	34,0	80,6	15,7	18,3	52,5	68,0	100	16,4	23,7	35,1	11,6	82,6	2,2	44,9	47,8	85,5	21,7	59,3	88,2	34,6	
U-Ibnd	21,1	22,1	51,3	52,5	19,3	19,9	34,4	20,6	24,8	26,2	42,2	21,2	23,6	18,9	55,8	50,5	23,8	21,4	19,5	100	36,6	28,9	40,3	20,0	13,4	26,0	25,2	18,8	40,2	22,6	19,0	28,0	
V-Ibnd	29,6	31,8	46,3	40,4	28,3	27,9	72,2	28,6	41,8	35,3	31,3	31,0	33,2	37,9	26,4	34,9	51,3	30,8	27,5	38,5	100	47,5	31,8	27,5	16,4	36,4	35,4	26,3	70,3	30,6	26,6	47,6	
W-Ibnd	38,7	42,2	33,6	33,9	35,5	36,1	42,4	37,9	59,8	48,9	20,1	40,6	45,1	47,1	33,1	30,7	42,9	40,2	35,1	26,0	42,9	100	20,1	35,3	7,3	54,4	50,3	33,5	37,7	41,5	34,0	81,3	
X-Ibnd	18,4	19,2	35,4	37,8	17,2	17,5	30,8	18,1	22,4	21,9	79,6	18,8	20,2	25,0	16,6	36,9	39,1	20,2	18,7	17,2	42,3	31,8	25,0	100	15,0	19,3	19,8	19,1	14,2	32,4	17,0	14,4	22,7
Y-Ibnd	75,1	62,2	21,5	21,6	67,4	84,1	23,6	77,6	37,5	46,0	12,0	62,0	55,9	78,2	16,2	18,7	55,5	67,2	82,6	16,9	24,0	35,3	11,9	100	2,1	45,8	49,0	76,0	22,0	62,6	78,2	34,6	
Z-Ibnd	7,6	8,3	14,5	14,2	7,3	7,1	17,1	7,4	11,9	9,2	20,2	8,2	8,7	10,2	6,5	14,3	17,5	8,1	6,9	15,7	16,4	12,3	21,4	6,8	100	9,7	9,3	6,5	16,9	7,9	6,6	12,7	
AA-Ibnd	51,3	57,4	29,5	29,5	44,5	46,5	32,9	49,4	51,6	72,3	16,9	52,1	66,1	50,1	42,1	21,8	25,8	61,8	53,1	44,9	22,9	33,8	54,4	16,7	45,8	5,0	100	84,9	42,4	30,7	58,1	51,4	
AB-Ibnd	55,3	62,3	28,3	28,3	47,0	49,6	31,3	53,0	49,2	74,0	16,2	55,2	75,1	48,4	44,7	21,1	24,7	68,8	57,0	47,8	22,1	32,1	50,3	16,0	49,0	4,6	84,9	100	44,9	29,3	64,2	47,9	
AC-Ibnd	65,3	56,7	20,1	20,2	74,5	78,7	22,5	69,4	41,9	11,2	59,9	50,5	32,4	91,8	15,0	17,5	49,2	61,8	85,5	15,8	22,8	33,5	11,1	76,0	1,8	42,4	44,9	100	20,8	54,8	97,4	33,1	
AD-Ibnd	27,5	29,5	48,8	40,9	26,2	25,9	62,7	26,6	37,5	33,1	32,9	28,6	30,8	36,3	24,6	37,6	59,5	29,5	28,5	41,4	70,3	42,5	33,3	25,6	16,9	33,7	32,9	24,4	100	23,0	19,2	36,7	
AE-Ibnd	72,8	76,8	24,9	24,9	55,9	62,2	27,1	67,5	42,6	59,0	14,0	63,4	80,0	41,9	54,8	18,8	21,6	78,1	70,5	59,3	19,6	27,7	41,5	13,9	62,6	3,3	58,1	64,2	54,8	25,4	100	55,9	40,2
AF-Ibnd	67,3	57,9	20,4	20,5	75,5	82,1	22,8	71,8	36,9	42,5	11,4	51,4	32,8	90,6	15,2	17,8	50,1	63,5	88,2	16,0	23,1	34,0	11,3	78,2	2,0	43,1	45,7	97,4	21,0	55,9	100	33,6	
AG-Ibnd	39,1	42,8	35,1	34,0	37,3	36,6	45,1	38,0	67,3	45,8	22,5	42,0	44,5	43,0	34,2	26,1	33,1	40,8	41,4	35,8	28,0	45,2	81,2	22,7	35,7	10,3	50,6	47,9	34,3	40,0	40,1	34,7	100

\*Producto de referencia, Ibuprinc 400 mg, Lab. Pfizer

**Tabla 5-5.** Comparación de los factores  $f_2$  calculados para todos los pares posibles de productos de Ranitidina 300 mg comprimidos. Las celdas blancas con borde negro marcan las desviaciones de tipo I del principio de transitividad y las celdas con fondo gris las desviaciones de tipo II. Las celdas negras con texto en blanco denotan los casos donde al menos un producto (de un par involucrado en una desviación de tipo I) presentó un valor de  $f_2$  menor a 55, calculado respecto al producto de referencia. Notar que en 12 de los 27 errores tipo I que se ven en la tabla el valor de  $f_2$  entre los productos B y C (es decir, los que fueron similares a la referencia A pero no entre ellos) es mayor a 45

	A-Rani*	B-Rani	C-Rani	D-Rani	E-Rani	F-Rani	G-Rani	H-Rani	I-Rani	J-Rani	K-Rani	L-Rani	M-Rani	N-Rani	O-Rani	P-Rani	Q-Rani	R-Rani	S-Rani	T-Rani	U-Rani
A-Rani*	100	51,7	57,1	41,8	60,2	54,1	37,2	49,3	39,9	47,4	48,3	54,1	71,7	48,4	61,8	53,4	53,0	19,2	48,2	56,2	38,6
B-Rani	50,0	100	44,0	29,4	39,9	36,6	25,9	73,9	46,3	37,4	42,3	38,8	46,1	33,3	44,6	37,2	37,0	21,6	58,4	70,8	27,8
C-Rani	57,1	43,6	100	38,6	49,3	58,1	34,3	45,1	33,3	37,6	37,5	42,2	49,3	41,6	84,3	62,6	42,6	18,3	38,9	46,9	42,7
D-Rani	41,8	32,6	38,6	100	43,4	47,6	55,0	31,0	28,3	42,2	39,1	48,8	43,2	54,5	40,2	45,7	51,2	13,6	32,1	33,2	46,2
E-Rani	60,2	42,5	49,3	43,4	100	55,0	42,5	40,4	38,2	53,2	50,0	59,0	66,6	57,9	53,0	49,8	60,3	16,8	43,9	46,7	39,9
F-Rani	54,1	38,3	58,1	47,6	55,0	100	42,6	37,9	31,3	41,3	39,3	47,8	51,1	51,3	61,6	75,1	49,7	15,7	36,3	40,8	52,5
G-Rani	37,2	29,0	34,3	55,0	42,5	42,6	100	27,5	27,1	42,3	37,6	45,4	39,6	55,4	35,9	39,4	48,2	11,7	29,9	30,3	42,4
H-Rani	46,2	73,9	43,7	28,0	37,3	35,3	24,4	100	42,8	34,2	38,2	35,8	42,4	31,1	43,5	36,4	34,4	22,6	51,4	63,2	27,1
I-Rani	38,2	46,3	33,0	25,3	36,5	30,0	24,2	42,8	100	38,2	43,5	35,5	39,5	30,8	34,0	29,2	33,9	20,7	60,8	48,0	23,0
J-Rani	46,2	37,4	38,1	39,5	55,1	42,2	39,9	34,2	38,2	100	68,5	63,8	54,6	53,9	40,7	38,6	61,1	13,6	42,3	39,8	33,1
K-Rani	49,2	42,3	39,3	36,7	52,9	40,9	35,4	38,2	43,5	68,5	100	58,3	57,9	47,1	42,0	38,2	54,3	15,4	49,2	44,9	31,2
L-Rani	54,1	41,8	42,2	48,8	59,0	47,8	45,4	38,4	38,5	66,2	59,6	100	63,9	64,1	45,0	44,8	85,4	16,7	44,1	43,5	37,5
M-Rani	71,7	49,1	49,3	43,2	66,6	51,1	39,6	45,4	41,7	55,5	55,9	63,9	100	53,5	53,0	48,7	61,4	18,5	49,9	52,9	37,4
N-Rani	48,4	36,4	41,6	54,5	57,9	51,3	55,4	34,2	33,4	54,9	48,0	64,1	53,5	100	44,2	46,5	71,9	14,7	37,7	38,3	42,2
O-Rani	61,8	44,5	84,3	40,2	53,0	61,6	35,9	45,3	34,3	39,8	39,5	45,0	53,0	44,2	100	64,5	45,4	18,2	40,2	48,1	43,1
P-Rani	53,4	38,9	62,6	45,7	49,8	75,1	39,4	38,9	30,7	38,6	37,5	44,8	48,7	46,5	64,5	100	46,0	16,3	35,7	40,9	52,0
Q-Rani	53,0	40,1	42,6	51,2	60,3	49,7	48,2	37,3	36,7	62,6	55,2	85,4	61,4	71,9	45,4	46,0	100	16,1	41,9	42,0	39,2
R-Rani	16,3	21,6	15,9	10,5	13,9	13,0	8,7	22,6	20,7	13,6	15,4	13,7	15,6	11,7	15,7	13,6	13,1	100	20,1	20,2	9,9
S-Rani	47,0	58,4	39,7	29,1	42,5	35,4	27,0	51,4	60,8	42,3	49,2	41,0	47,9	34,9	41,0	34,7	39,0	20,1	100	63,1	26,7
T-Rani	53,2	70,8	46,5	30,2	43,8	38,6	27,2	63,2	48,0	39,8	44,9	41,0	50,0	35,2	47,5	38,7	39,1	20,2	63,1	100	28,8
U-Rani	38,6	29,6	42,7	46,2	39,9	52,5	42,4	29,5	24,5	33,1	31,1	37,5	37,4	42,2	43,1	52,0	39,2	12,5	28,0	31,0	100

\*Producto de referencia, Zantac 300 mg, Lab. GlaxoSmithKline

**Tabla 5-6.** Comparación de los factores  $f_2$  calculados para todos los pares posibles de productos de Cefalexina 500 mg comprimidos. Las celdas blancas con borde negro marcan las desviaciones de tipo I del principio de transitividad y las celdas con fondo gris las desviaciones de tipo II. Notar que en dos de los tres errores tipo I que se ven en la tabla el valor de  $f_2$  entre los productos B y C (es decir, los que fueron similares a la referencia A pero no entre ellos) es mayor a 45

	A-Cefa*	B-Cefa	C-Cefa	D-Cefa	E-Cefa	F-Cefa	G-Cefa	H-Cefa	I-Cefa	J-Cefa	K-Cefa	L-Cefa	M-Cefa	N-Cefa	O-Cefa	P-Cefa	Q-Cefa
A-Cefa*	100	37,7	60,1	34,8	70,5	34,8	37,8	32,5	37,3	37,3	40,5	35,5	55,9	72,3	35,1	36,2	37,1
B-Cefa	37,7	100	31,9	74,8	34,7	64,3	65,3	51,5	93,2	64,1	68,0	55,7	49,3	34,3	55,7	81,7	78,4
C-Cefa	60,1	31,9	100	29,8	75,9	29,3	31,5	27,3	31,5	31,1	33,5	29,6	43,5	65,4	29,3	30,6	31,1
D-Cefa	34,8	74,8	29,8	100	32,4	59,0	56,6	48,7	72,4	56,1	56,9	50,7	44,2	31,7	50,9	70,2	65,6
E-Cefa	70,5	34,7	75,9	32,4	100	31,7	34,2	29,4	34,2	33,7	36,5	32,0	48,4	69,0	31,7	33,2	33,8
F-Cefa	34,8	64,3	29,3	59,0	31,7	100	76,8	68,1	68,4	79,0	66,3	73,0	44,9	32,1	74,3	74,7	76,8
G-Cefa	37,8	65,3	31,5	56,6	34,2	76,8	100	62,3	69,1	93,2	80,7	73,6	49,8	34,8	73,4	71,7	78,2
H-Cefa	32,5	51,5	27,3	48,7	29,4	68,1	62,3	100	53,7	64,4	55,5	75,8	40,9	30,2	77,8	56,7	58,0
I-Cefa	37,3	93,2	31,5	72,4	34,2	68,4	69,1	53,7	100	67,7	70,3	58,3	48,8	34,0	58,4	90,2	86,1
J-Cefa	37,3	64,1	31,1	56,1	33,7	79,0	93,2	64,4	67,7	100	77,2	77,5	49,0	34,3	76,7	70,8	76,7
K-Cefa	40,5	68,0	33,5	56,9	36,5	66,3	80,7	55,5	70,3	77,2	100	64,3	54,7	36,9	63,6	69,3	75,0
L-Cefa	35,5	55,7	29,6	50,7	32,0	73,0	73,6	75,8	58,3	77,5	64,3	100	45,4	32,8	98,0	61,2	64,1
M-Cefa	55,9	49,3	43,5	44,2	48,4	44,9	49,8	40,9	48,8	49,0	54,7	45,4	100	48,8	45,0	47,2	48,7
N-Cefa	72,3	34,3	65,4	31,7	69,0	32,1	34,8	30,2	34,0	34,3	36,9	32,8	48,8	100	32,5	33,1	33,9
O-Cefa	35,1	55,7	29,3	50,9	31,7	74,3	73,4	77,8	58,4	76,7	63,6	98,0	45,0	32,5	100	61,5	64,2
P-Cefa	36,2	81,7	30,6	70,2	33,2	74,7	71,7	56,7	90,2	70,8	69,3	61,2	47,2	33,1	61,5	100	91,7
Q-Cefa	37,1	78,4	31,1	65,6	33,8	76,8	78,2	58,0	86,1	76,7	75,0	64,1	48,7	33,9	64,2	91,7	100

\*Producto de referencia, Cefalexina Argentina 500 mg, Lab. Nova Argentina

**Tabla 5-7.** Comparación de los factores  $f_2$  calculados para todos los pares posibles de productos de Furosemda 40 mg comprimidos. Las celdas blancas con borde negro marcan las desviaciones de tipo I del principio de transitividad y las celdas con fondo gris las desviaciones de tipo II. Notar que en los dos errores tipo I que se ven en la tabla el valor de  $f_2$  entre los productos B y C (es decir, los que fueron similares a la referencia A pero no entre ellos) es mayor a 45

	A-Furo*	B-Furo	C-Furo	D-Furo	E-Furo	F-Furo	G-Furo	H-Furo	I-Furo	J-Furo	K-Furo
A-Furo*	100	71,9	41,0	77,0	61,6	48,4	72,1	62,9	60,4	41,6	57,4
B-Furo	71,9	100	38,0	69,8	71,6	53,3	64,7	56,1	71,0	45,8	67,6
C-Furo	38,2	39,9	100	35,5	39,1	39,2	45,6	37,9	35,1	33,2	35,2
D-Furo	77,0	69,8	38,1	100	57,5	45,8	60,8	69,3	62,7	40,7	58,7
E-Furo	61,6	71,6	37,5	57,5	100	64,3	61,4	48,4	66,7	51,7	67,5
F-Furo	48,4	53,3	34,6	45,8	64,3	100	50,0	40,0	53,6	62,5	55,8
G-Furo	65,3	67,0	45,4	56,5	64,0	52,5	100	55,9	54,8	44,4	54,1
H-Furo	62,9	56,1	39,1	69,3	48,4	40,0	55,1	100	51,3	35,7	48,8
I-Furo	60,4	71,0	34,1	62,7	66,7	53,6	53,9	51,3	100	49,4	90,2
J-Furo	41,6	45,8	29,4	40,7	51,7	62,5	41,4	35,7	49,4	100	51,9
K-Furo	57,4	67,6	33,5	58,7	67,5	55,8	52,4	48,8	90,2	51,9	100

\*Producto de referencia, Lasix 40 mg, Lab. Sanofi-Aventis

Como se observa en las tablas anteriores, se encontraron numerosas desviaciones al principio de transitividad (59 de tipo I y 35 de tipo II). Para el análisis de los resultados se empleó una matriz de  $n_i \times n_i$  representando las entradas de la tabla correspondiente al producto  $i$ , siendo  $n_i$  el número de marcas disponibles en el mercado para dicho producto. Para cada tabla, el porcentaje de desviaciones al principio de transitividad puede calcularse según la siguiente expresión:

$$\% \text{ Total de desviaciones} = \frac{\sum_i \text{Número de desviaciones}}{\sum_i \left[ \frac{n_i^2 - n_i}{2} - (n_i - 1) \right]} \times 100$$

■ Ecuación 5-2

En dicha ecuación,  $(n_i^2 - n_i)/2$  es el número de elementos debajo de la diagonal (en general, si el elemento  $x_{kj}$  se marca como una excepción, también lo será  $x_{jk}$ ; y carecen de interés aquellos casos en los que  $j = k$ , es decir, los pares de la diagonal). Del denominador de la Ecuación 5-2 también se restan los  $(n_i - 1)$  elementos debajo de la diagonal que corresponden a la comparación entre un producto dado y la referencia, ya que no tiene sentido hablar de principio de transitividad cuando la referencia es uno de los productos comparados. Por lo tanto, el % calculado de desviaciones de tipo I es 6,5% y el de tipo II es 3,9% (sobre el total de comparaciones posibles).

Si se observan muchas excepciones al principio de transitividad *in vitro*, mediante comparaciones de perfiles de disolución, es altamente probable que surjan desviaciones en los estudios de bioequivalencia *in vivo*, al menos para aquellas drogas en las cuales la disolución es la etapa limitante de la velocidad del proceso de absorción (clase II del BCS, por ejemplo Ibuprofeno, y algunas de clase IV). También resulta interesante notar que aproximadamente el 75% de las desviaciones de tipo I encontradas (44 de 59) incluyeron al menos un producto cuyo valor de  $f_2$  respecto al producto de referencia (denotado en las tablas mediante celdas negras con texto en blanco) estaba por debajo

de 55 (es decir, cerca del valor límite 50), mientras que en el 53% de las desviaciones de tipo I los productos B y C (es decir, los dos que son similares a la referencia A pero no entre sí) presentaron –entre ellos– un valor de  $f_2$  mayor a 45.

Por lo tanto, aumentar el valor límite de la especificación a 55 evitaría el 75% de las desviaciones observadas (con un costo adicional para los productores, ya que aumenta la exigencia de similitud), mientras que disminuir el valor límite a, por ejemplo, 45 evitaría el 53% de las desviaciones. Esta última flexibilización de la especificación debería ser cuidadosamente analizada ya que podría tener consecuencias en la seguridad de los pacientes. Este punto se analizará con más detalle en la sección 5.2.

Por otro lado, también es interesante destacar que muchas de estas desviaciones se han encontrado en drogas que se han propuesto como candidatas para bioexenciones (o a las que ya se ha eximido de estudios *in vivo*), tales como Ibuprofeno (Potthast et al., 2005; Yazdanian et al., 2004) y Ranitidina (Kortejarvi et al., 2005).

## **5.2** Análisis de los métodos utilizados para comparar perfiles de disolución

### Descripción y objetivos

En la sección anterior, y con el objetivo de evaluar la transitividad entre distintos productos, se han comparado perfiles de disolución empleando el factor de similitud  $f_2$ . Se hizo así ya que actualmente éste es el método de comparación sugerido por la mayoría de las autoridades sanitarias (ANMAT, 2009; FDA/CDER, 2000). Sin embargo, se puede encontrar en la literatura una gran variedad de métodos para realizar dichas comparaciones, y no existe acuerdo acerca de cuál es el más conveniente para todos los casos (O'Hara et al., 1998; Polli et al., 1996).

Por lo tanto, el objetivo de este ensayo fue, utilizando los perfiles de disolución obtenidos en la sección 2.2 para comprimidos de OxCBZ, comparar la performance de distintos métodos para comparar dichos perfiles, tanto para determinar si producen resultados coincidentes, como para analizar los alcances de su aplicación (además de la relación beneficios/limitaciones). Por otro lado, también se evaluó la relación entre los resultados anteriores con el desempeño *in vivo*, ya que la autoridad sanitaria declara que dichos comprimidos son bioequivalentes al producto de referencia (ANMAT, 2011).

Posteriormente, y empleando los datos de CBZ de la sección 2.1, se ensayaron los mismos métodos de comparación de perfiles que para OxCBZ. Como en el caso de CBZ se cuenta con los datos *in vivo* y se intentó correlacionar cualitativamente los resultados *in vitro*/*in vivo*.

### Materiales y métodos

Los ensayos de disolución (equipos, condiciones, medios de disolución) son los descritos en las secciones 2.1 y 2.2 para comprimidos de Carbamazepina y Oxcarbazepina, respectivamente. Para la comparación de perfiles se emplearon únicamente los datos correspondientes al medio de disolución Lauril Sulfato de Sodio (LSNa) 1%, por ser el único donde todos los productos (de ambas drogas) lograban su completa disolución.

## Análisis de los datos

Los perfiles de disolución obtenidos en LSNa 1% para los productos de OxCBZ y CBZ se analizaron de la siguiente manera:

### ● Métodos independientes del modelo

Se calculó el factor de similitud  $f_2$  y el de diferencia  $f_1$  (Moore & Flanner, 1996) para todos los pares posibles de productos considerados. La Ecuación 5-1 describe cómo se calcula el factor  $f_2$ , mientras que el  $f_1$  se presenta en la Ecuación 5-3 ( $R_t$  y  $T_t$  son los porcentajes disueltos promedio al tiempo  $t$ ).

$$f_1 = \left\{ \frac{\sum_{t=t_1}^{t_n} (R_t - T_t)}{\sum_{t=t_1}^{t_n} R_t} \right\} \times 100$$

■ Ecuación 5-3

El cálculo del factor  $f_2$  se llevó a cabo de la manera recomendada por la FDA (FDA/CDER, 1997), es decir, tomando los promedios disueltos a cada tiempo, y también de la forma propuesta por Costa (Costa, 2001), que consiste en calcular el  $f_2$  para todos los pares posibles considerando de manera individual cada comprimido de los dos productos que se desea comparar. De esta manera, si se ensayaron 6 comprimidos de cada marca, se tendrán 36 valores de  $f_2$ , de los que se calcula luego el promedio y la desviación estándar. Los perfiles se consideraron similares si el valor del  $f_2$  entre ellos fue mayor o igual a 50, y el  $f_1$  menor a 15 (FDA/CDER, 1997).

También se calcularon los índices  $\xi_i$  de Rescigno, los que fueron inicialmente desarrollados y aplicados para la comparación de perfiles plasmáticos concentración vs. tiempo (Rescigno, 1992). La expresión general de estos índices para la comparación de perfiles de disolución puede escribirse de la siguiente manera:

$$\xi_i = \left( \frac{\int_0^T |R_t - T_t|^i dt}{\int_0^T |R_t + T_t|^i dt} \right)^{1/i}$$

■ Ecuación 5-4

En donde  $R_t$  y  $T_t$  son los porcentajes disueltos promedio, a cada tiempo, de los productos Referencia y Test, respectivamente, y  $T$  es el último tiempo muestreado. Se calcularon dos índices (de primer y segundo orden, es decir,  $i = 1, 2$ ) mediante el método de los trapecios.

El valor de estos índices se encuentra siempre entre 0 y 1, y es independiente de qué producto se considere  $R$  o  $T$ . Valores cercanos a cero indican mayor similitud entre los perfiles, mientras que  $\xi_i = 1$  indica que uno de los dos perfiles es igual a cero para todos los tiempos. Una de las principales desventajas de estos índices es el hecho de que no existe una recomendación acerca de cuán cercano a cero debe ser el valor para considerar "similares" a las curvas que se están comparando (O'Hara et al., 1998).

Por último, se obtuvieron los valores de ABC, calculada por el método de los trapecios, y de la ED, calculada según la Ecuación 5-5:

$$ED = \frac{\int_{t_1}^{t_2} \%D(t) dt}{\%D_{\max} \times (t_2 - t_1)} \times 100 = \frac{ABC_{0-T}}{\%D_{\max} \times T} \times 100$$

■ Ecuación 5-5

Donde % D(t) es el porcentaje disuelto al tiempo t, % Dmax es el máximo disuelto, correspondiente al último tiempo T, y ABC<sub>0-T</sub> es el área bajo la curva desde cero a T. Una vez obtenidos los valores de ABC y ED para cada comprimido individual de dos formulaciones dadas, se compararon estadísticamente mediante un ANAVA y se calculó el intervalo de confianza del 90% para el cociente de medias (IC 90%).

#### ● Métodos estadísticos basados en ANAVA

Para todos los pares posibles de productos se realizó un ANAVA (bifactorial), considerando al % Disuelto como variable aleatoria y a la Formulación y el Tiempo como variables de clase (factores). Debido a la existencia de replicados (comprimidos individuales), también fue posible evaluar el efecto de la interacción Formulación\*Tiempo.

También se presentan los resultados de los ANAVA monofactoriales (único factor: Formulación). Como en este caso las comparaciones se hacen tiempo a tiempo, se presentan los resultados de aquellos que resultaron diferentes.

#### ● Métodos dependientes del modelo

Como se mencionó al inicio del capítulo, esta clasificación engloba diferentes formas estadísticas de comparación multivariada que requieren una etapa previa de ajuste de los datos a ecuaciones o modelos que los representen.

Los métodos matemáticos no-lineales que se probaron para el ajuste de datos fueron los siguientes:

■ **Tabla 5-8.** Modelos matemáticos, con sus respectivas ecuaciones, empleados para el ajuste de los datos % Disuelto vs. tiempo

Modelo	Ecuación
Primer Orden	$\%D(t) = \%D_{\max} \cdot [1 - \exp(-k \cdot t)]$
Gompertz	$\%D(t) = \%D_{\max} \cdot \exp\{-a \cdot \exp[-b \cdot \log(t)]\}$
Logístico	$\%D(t) = \%D_{\max} \cdot \left\{ \frac{\exp[a + b \cdot \log(t)]}{1 + \exp[a + b \cdot \log(t)]} \right\}$
Weibull	$\%D(t) = \%D_{\max} \cdot \{1 - \exp[-a \cdot (t)^b]\}$

Aunque se han postulado otros modelos matemáticos para ajustar los datos de % Disuelto vs. tiempo (Bery & Likar, 2001; Costa & Souza Lobo, 2001), los cuatro descriptos en la Tabla 5-8 son los más utilizados por su mejor ajuste a datos provenientes de formas sólidas de liberación inmediata (Costa & Souza Lobo, 2001), a pesar de no haber sido diseñados para eso.<sup>1</sup> Para elegir el método a utilizar en los cálculos posteriores de similitud se realizaron los siguientes pasos:

1. Se ajustaron los datos promedio ( $n = 6$  para OxCBZ,  $n = 12$  para CBZ) obtenidos para cada producto en LSNa 1% con dos software estadísticos: *Systat v.12 e Infostat v.2011e*.

El primer programa ofrece diferentes maneras de estimar los parámetros, pero en todos los casos se realizó mediante algoritmos de minimización de cuadrados basados en híbridos del método de Gauss-Newton (este programa es capaz de calcular las derivadas exactas) (*Systat® 12 Statistics I\_II\_III\_IV, 2007*); el segundo programa aborda el problema de regresión no lineal en dos fases. La primera consiste en buscar una solución aproximada mediante un método downhill simplex que no requiere la evaluación de derivadas parciales (se minimiza la posibilidad de errores numéricos). Esta fase termina con una solución o cuando se alcanza el número máximo de iteraciones preestablecidas (500 no modificable por el usuario). La segunda fase implementa el método de Levenberg-Marquardt partiendo de la solución anterior. Este método requiere el cálculo de la matriz hessiana necesaria para el cálculo de la matriz de covarianzas de las estimaciones. Esta fase termina cuando la diferencia de la suma de cuadrados entre dos iteraciones sucesivas es menor o igual a  $1E^{-10}$  o cuando se alcanza el número máximo de iteraciones especificadas por el usuario (*Infostat, Manual del usuario, 2011*).

Los valores iniciales de los parámetros fueron obtenidos mediante ajustes preliminares y a todos los puntos se les asignó el mismo peso.

2. Se verificó en todos los casos que ambos programas arrojaran resultados coincidentes.

Se registraron los valores de los parámetros obtenidos para cada producto con cada ecuación, como así también los valores del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de cada ajuste y del Akaike's Information Criteria (AIC). El AIC es ampliamente utilizado como criterio de selección del modelo que mejor ajusta a determinado grupo de datos, sobre todo cuando los modelos considerados no contienen el mismo número de parámetros, como en este caso. En el caso especial de estimación por cuadrados mínimos con errores normalmente distribuidos, este índice puede expresarse como  $AIC = n \cdot \text{Log}(\sigma^2) + 2 \cdot P$ , donde  $P$  es el número de parámetros del modelo y  $\sigma^2 = \sum \varepsilon_i^2 / n$  ( $\varepsilon_i$  son los residuales estimados del modelo ajustado). Dado una serie de modelos, el que mejor ajuste será el que tenga el menor valor de AIC. Este índice no sólo premia el mejor ajuste, sino que penaliza el aumento del número de parámetros, intentando evitar así el sobreajuste que se produce al aumentar el número de parámetros de un modelo (Burnham & Anderson, 2004).

3. En función de los resultados obtenidos, junto con la inspección visual de las curvas ajustadas, se seleccionaron los métodos Logístico y Weibull por su mejor desempeño.

4. Para decidir entre ellos se realizó el test estadístico de *Lack of fit* (falta de ajuste, Box et al., 2005) a los datos de todos los productos ajustados según ambos modelos, de manera de determinar estadísticamente si el ajuste era aceptable en todos los casos

<sup>1</sup> La ecuación de Weibull, por ejemplo, fue originalmente derivada para descubrir distribuciones de tamaños de partículas.

(dicho de otra manera, si el modelo era aplicable a todos los pares de datos % D vs. t). El resultado de este ensayo decidió el uso de la ecuación de Weibull para el ajuste posterior de las curvas.

5. Por último, se procedió a ajustar los datos de disolución obtenidos para cada comprimido de los distintos productos, tanto de CBZ como de OxCBZ, con el método seleccionado, y se registraron los parámetros calculados. Una vez que se computaron los valores de los parámetros a (de escala) y b (de forma) de la ecuación de Weibull, para cada comprimido de cada producto analizado, los mismos se compararon estadísticamente mediante dos ensayos:

A. Estadístico  $T^2$  de Hotelling: esta distribución fue desarrollada por Harold Hotelling como una generalización de la distribución t de Student, para su aplicación al análisis multivariado. Es decir, para evaluar diferencias de medias (multivariadas) entre distintas poblaciones, de la misma manera que se aplicaría el test t si fueran univariadas (Hotelling, 1931). El estadístico  $T^2$  se calcula según la siguiente expresión:

$$T^2 = (\bar{X}_1 - \bar{X}_2)' \cdot \left\{ S_p \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right) \right\}^{-1} \cdot (\bar{X}_1 - \bar{X}_2)$$

■ Ecuación 5-6

En primer lugar se calculan las diferencias entre los vectores medios de la muestra (en nuestro caso, diferencias en los parámetros ln-transformados a y b). Luego se calcula la matriz de varianza-covarianza ( $S_p$ ) y se multiplica por la suma de las inversas del tamaño de muestra ( $1/n_1 + 1/n_2$ ). La matriz resultante se invierte y se multiplica por las diferencias de las medias calculadas primero.

Para muestras grandes, el estadístico seguirá una distribución chi-cuadrada con  $p$  grados de libertad (donde  $p$  es el número de variables medidas). Sin embargo, esta aproximación no tiene en cuenta la variación debida a la estima de la matriz de varianza-covarianza. Por lo tanto, se la transforma en un estadístico F mediante la siguiente expresión:

$$F = \frac{n_1 + n_2 - p - 1}{p(n_1 + n_2 - 2)} \cdot T^2 \approx F_{(p; n_1 + n_2 - p - 1)}$$

■ Ecuación 5-7

Se rechaza la hipótesis nula ( $H_0 : \mu_1 = \mu_2$ ) al nivel  $\alpha$  si el valor de F calculado es mayor que el valor crítico de tabla (es decir, si  $F > F_{(p; n_1 + n_2 - p - 1)}$ ).

B. Comparación por regiones de similitud: este método, propuesto por Sathe y col., implica definir, en función de resultados obtenidos para la referencia, las regiones de similitud para los parámetros del modelo utilizado para ajustar los datos. Se consideran tres regiones:  $\pm\sigma$ ,  $\pm 2\sigma$  y  $\pm 3\sigma$ . Dichas regiones tienen forma de rectángulo, ya que en una dirección se grafican los desvíos del parámetro a y en la otra los de b (del producto de referencia). Luego, para cada par que se desea comparar, se calculan las diferencias de sus parámetros a y b (ln-transformados) y los intervalos del 90% confianza de di-

chas diferencias, y se verifica si las mismas se encuentran dentro o fuera de las regiones de similitud previamente definidas (Sathe et al., 1996).

Un ejemplo esquemático de este procedimiento se presenta en la Figura 5-6.

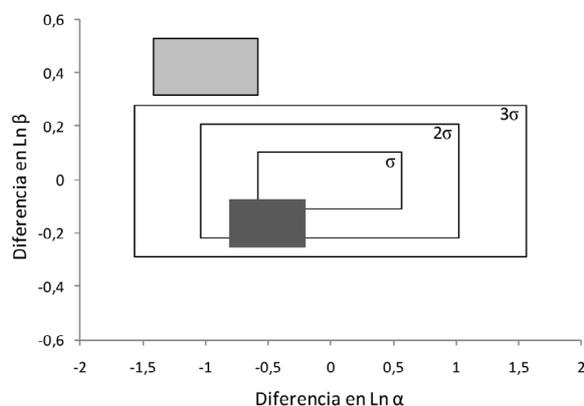


Figura 5-6. Los rectángulos blancos representan las regiones de similitud definidas en función de la variabilidad en los parámetros a y b de la ecuación de Weibull del producto de referencia. Los rectángulos grises representan las regiones del 90% de confianza de la diferencia en los parámetros a y b entre dos productos dados, no similares (gris claro) o similares (gris oscuro)

## Resultados y discusión

### Comprimidos de OxCBZ

En la sección 2.2 se presentaron los resultados obtenidos para los perfiles de disolución en diferentes medios de cuatro productos de OxCBZ: tres correspondientes a comprimidos por 600 mg (productos J\*, K y L, el asterisco indica la referencia) y el cuarto de 300 mg (producto M, de igual origen –marca comercial– al producto L).

Como el único medio de disolución en el que se logró la disolución completa de todos los productos ensayados fue LSNa 1%, se lo eligió para realizar el análisis comparativo de los perfiles. La Figura 5-7 muestra los perfiles superpuestos para los cuatro productos analizados.

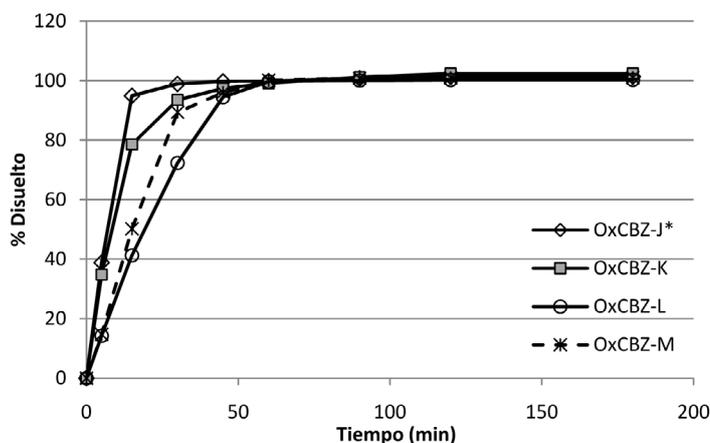


Figura 5-7. Perfiles de disolución en LSNa 1% de cuatro productos de OxCBZ (J\*, K y L de 600 mg, producto M de 300 mg). Con un asterisco se indica al producto de referencia

En la Tabla 5-9 se resumen los resultados del ajuste de los cuatro métodos propuestos a los datos de % Disuelto vs. tiempo de los cuatro productos de OxCBZ estudiados.

**Tabla 5-9.** Resultados del ajuste de los datos promedio de % Disuelto vs. tiempo de los cuatro productos analizados de OxCBZ a los cuatro modelos matemáticos propuestos.  $R^2$ : coeficiente de determinación; AIC: Akaike's Information Criterion; k, a, b: parámetros de las ecuaciones. El asterisco denota al producto de referencia

Producto	Primer Orden	Gompertz	Logistic	Weibull
OxCBZ-J*	$k = 0,1223$	$a = 31,88$ $b = 5,030$	$a = -4,616$ $b = 5,952$	$a = 0,0382$ $b = 1,556$
	$R^2 = 0,9985$	$R^2 = 0,99997$	$R^2 = 0,99996$	$R^2 = 0,99992$
	$AIC = 30,10$	$AIC = 5,25$	$AIC = 4,82$	$AIC = 13,10$
OxCBZ-K	$k = 0,0875$	$a = 11,19$ $b = 3,271$	$a = -3,580$ $b = 4,041$	$a = 0,0775$ $b = 1,051$
	$R^2 = 0,9994$	$R^2 = 0,99997$	$R^2 = 0,99993$	$R^2 = 0,9994$
	$AIC = 21,87$	$AIC = 23,44$	$AIC = 19,03$	$AIC = 24,66$
OxCBZ-L	$k = 0,0440$	$a = 22,98$ $b = 4,656$	$a = -6,208$ $b = 5,042$	$a = 0,0132$ $b = 1,371$
	$R^2 = 0,9971$	$R^2 = 0,9955$	$R^2 = 0,9980$	$R^2 = 0,9995$
	$AIC = 34,93$	$AIC = 41,67$	$AIC = 36,41$	$AIC = 24,00$
OxCBZ-M	$k = 0,0551$	$a = 39,78$ $b = 3,699$	$a = -6,276$ $b = 5,492$	$a = 0,0127$ $b = 1,498$
	$R^2 = 0,9968$	$R^2 = 0,9971$	$R^2 = 0,9990$	$R^2 = 0,9998$
	$AIC = 36,14$	$AIC = 40,98$	$AIC = 32,03$	$AIC = 17,51$

Como se ve en la tabla anterior, en mayor o menor medida, todos los modelos ajustaron a las curvas de disolución. El coeficiente  $R^2$  fue superior a 0,995 en todos los casos, no se observaron tendencias sistemáticas en las gráficas de residuales y los AIC fueron comparables en todos los casos.

El método de ajuste a la ecuación de Primer Orden fue el primero en descartarse, ya que analizando producto por producto este método logra los menores valores de  $R^2$ , y los AIC resultantes son generalmente mayores a los de los demás métodos, cuando deberían ser considerablemente menores por tener un parámetro menos (única ecuación de un parámetro, k).

Luego se descarta la ecuación de Gompertz, ya que si bien parece ajustar muy bien a los dos primeros productos, en el caso de OxCBZ-L y M no se logró un ajuste adecuado ( $AIC \gg$ ). El motivo fue haber forzado la ecuación a tener solamente dos parámetros: en su forma original, el % Dmax también es un parámetro a determinar (y no igual a 100). Cuando se realiza el ajuste con la ecuación tri-paramétrica, los software utilizados aproximan % Dmax a un valor cercano a 110 para lograr la convergencia (para los productos L y M).

De los datos presentados en la Tabla 5-9 no surgen elementos de decisión entre las ecuaciones de los métodos Logístico y Weibull, ya que mientras la primera parece ajustar mejor a los productos J\* y K, la segunda hace lo correspondiente con L y M. Es por ello que se sometieron a un análisis de falta de ajuste (Box et al., 2005). Los resultados se muestran en la Tabla 5-10.

Mediante este ensayo se prueban simultáneamente dos hipótesis nulas: la de no correlación (o pendiente igual a cero), la cual se debe rechazar para afirmar la correlación entre los datos de tiempo y % Disuelto; y la de ajuste al modelo elegido, que se debe aceptar para poder afirmar que el modelo elegido ha sido correcto. Por lo tanto, para el ítem “correlación” de la Tabla 5-10 se desea un valor de  $F > F_{\text{crítico}}$ , mientras que para “falta de ajuste” se busca un  $F < F_{\text{crítico}}$ . Como puede verse en la Tabla 5-10, estas relaciones se cumplen en todos los casos excepto en dos (marcados en negrita), donde se observa que el modelo Logístico no ajusta bien a los productos L y M. Es por ello que para los cálculos subsiguientes se elige el modelo de Weibull.

**Tabla 5-10.** Resultados del análisis de Falta de Ajuste realizado a los datos individuales de % Disuelto vs. tiempo de los cuatro productos de OxCBZ según los dos modelos preseleccionados (Logístico y Weibull). Se presentan los valores de los cocientes F obtenidos en cada caso, tanto para la correlación como para la falta de ajuste, y los valores críticos de los mismos

	F [Logístico]	F [Weibull]	F crítico 95%
<b>OxCBZ-J*</b>			
Correlación	322,11	717,74	4,08
Falta de Ajuste	0,17	0,31	2,34
<b>OxCBZ-K</b>			
Correlación	1012,28	1146,16	4,08
Falta de Ajuste	0,86	1,87	2,34
<b>OxCBZ-L</b>			
Correlación	1360,02	2882,31	4,08
Falta de Ajuste	<b>4,58</b>	2,12	2,34
<b>OxCBZ-M</b>			
Correlación	1977,54	3903,61	4,08
Falta de Ajuste	<b>4,10</b>	1,38	2,34

Los datos de los comprimidos individuales de cada uno de los cuatro productos estudiados se ajustaron entonces a la ecuación de Weibull, de manera de obtener, para cada producto, un valor medio ( $n = 6$ ) de los parámetros a y b. Con esos valores ln-transformados se realizó el test  $T^2$  de Hotelling y se determinó su coincidencia con la región de similitud preestablecida (como se explicó en *Análisis de los datos- Métodos dependientes del modelo*).

Se presentan a continuación los resultados y conclusiones de todos los métodos aplicados, agrupados por pareja de productos considerada. Si bien entre cuatro productos (J\*, K, L y M) existen seis parejas diferentes posibles, sólo se presentan cuatro tablas, ya que para los pares J\* vs. L y K vs. L se obtuvieron resultados coherentes (de no similitud) entre todos los métodos aplicados.

En el caso de los métodos matemáticos de comparación, se presenta el valor obtenido para cada índice calculado (el  $f_2$  promedio es el único que tiene asociado un valor de desviación estándar) y la conclusión de similitud o no de acuerdo a las especificaciones. Cuando no se puede concluir (como en los casos de resultados dependientes de qué producto se considere la referencia), o en el caso de no existir especificaciones para un determinado parámetro (como sucede con los  $\xi_1$  de Rescigno), se coloca “ND”, es decir, no determinado.

En el caso de la comparación de ED y ABC se presenta el valor del cociente entre los dos productos considerados para cada uno de éstos parámetros, el IC 90% para dicho cociente y el p-valor. Como en este ensayo la hipótesis nula es de similitud ( $H_0$ : no existen diferencias significativas entre los parámetros de los dos productos), los perfiles se consideran similares si p-valor > 0,01.

Se muestran luego los resultados de los métodos estadísticos basados en ANAVA. Al igual que en el caso anterior, las hipótesis nulas son de similitud para el factor considerado. Aparecen, por último, los métodos dependientes del modelo en los que se presenta la diferencia de los parámetros ln-transformados de la ecuación de Weibull (a y b) entre los productos, con su correspondiente IC 90%. De acuerdo al método de la "región de similitud", los perfiles se considerarían similares si dichos IC 90% estuvieran incluidos simultáneamente dentro de una región previamente definida en función de la varianza del producto de referencia.

En nuestro caso, dicha región tomaría los siguientes valores:

- considerando  $\pm \sigma$ : [-0,520; +0,520] para a y [-0,107; +0,107] para b
- considerando  $\pm 2\sigma$ : [-1,040; +1,040] para a y [-0,214; +0,214] para b
- considerando  $\pm 3\sigma$ : [-1,560; +1,560] para a y [-0,321; +0,321] para b

También se muestra el valor del estadístico de Hotelling (el valor presentado es el F calculado según la Ecuación 5-7), seguido del correspondiente valor de  $F_{\text{crítico}95\%}$ . Como en todos los casos, la hipótesis nula de similitud se rechaza si  $F > F_{\text{crítico}95\%}$  (equivalente a p-valor < 0,05).

Tabla 5-11. Resumen de los resultados obtenidos para cada uno de los métodos de comparación de perfiles aplicados al par de productos OxCBZ-J\* y K. ND: no determinado

Comparación entre los productos J* y K de comprimidos de OxCBZ				
<i>Métodos independientes del modelo</i>				
	<i>K (T) vs. J* (Ref)</i>		<i>J* (T) vs. K (Ref)</i>	<b>Conclusión</b>
<i>f<sub>2</sub> clásico</i>	49,18		51,68	ND
<i>f<sub>2</sub> promedio</i>	47,76 ± 10,01		50,00 ± 9,40	ND
<i>f<sub>1</sub> clásico</i>	11,82		10,53	similares
<i>Rescigno <math>\xi_1</math></i>	0,0113			ND
<i>Rescigno <math>\xi_2</math></i>	0,1503			ND
	<b>cociente</b>	<b>p-valor</b>	<b>IC 90% del cociente</b>	
ED	0,9719	0,0201	95,55 - 98,86	similares
ABC	0,9772	0,2110	94,63 - 100,92	similares
<i>Métodos estadísticos basados en ANAVA</i>				
	<b>p-valor Bifactorial</b>		<b>p-valor Monofactorial</b>	
<i>Formulación</i>	< 0,01		< 0,01*	no similares
<i>Tiempo</i>	< 0,01			no similares
<i>FxT</i>	< 0,01		* Tiempos que diferían: 15, 30 y 45 minutos	no similares
<i>Métodos dependientes del modelo</i>				
		<b>diferencia</b>	<b>IC 90% de la diferencia</b>	
<i>Parámetros Weibull</i>	a	-0,935	-1,553 ; -0,317	no similares
	b	0,466	0,284 ; 0,649	
	F	<b>F<sub>crítico 95%</sub></b>	<b>p-valor</b>	
<i>T<sup>2</sup> de Hotelling</i>	25,47	4,06	< 0,001	no similares

Tabla 5-12. Resumen de los resultados obtenidos para cada uno de los métodos de comparación de perfiles aplicados al par de productos OxCBZ-J\* y M. ND: no determinado

Comparación entre los productos J* y M de comprimidos de OxCBZ				
<i>Métodos independientes del modelo</i>				
	<i>M (T) vs. J* (Ref)</i>		<i>J* (T) vs. M (Ref)</i>	<b>Conclusión</b>
<i>f<sub>2</sub> clásico</i>	27,50		30,56	<i>no similares</i>
<i>f<sub>2</sub> promedio</i>	28,23 ± 5,95		31,14 ± 4,83	<i>no similares</i>
<i>f<sub>1</sub> clásico</i>	32,38		30,95	<i>no similares</i>
<i>Rescigno <math>\xi_1</math></i>	0,0266			ND
<i>Rescigno <math>\xi_2</math></i>	0,2304			ND
	<b>cociente</b>	<b>p-valor</b>	<b>IC 90% del cociente</b>	
<i>ED</i>	0,9554	0,0061	93,64 - 97,47	<i>no similares</i>
<i>ABC</i>	0,9479	0,0144	92,03 - 97,63	<i>similares</i>
<i>Métodos estadísticos basados en ANAVA</i>				
	<b>p-valor Bifactorial</b>		<b>p-valor Monofactorial</b>	
<i>Formulación</i>	< 0,01		< 0,01*	<i>no similares</i>
<i>Tiempo</i>	< 0,01			<i>no similares</i>
<i>FxT</i>	< 0,01		* Tiempos que diferían: 5, 15 y 30 minutos	<i>no similares</i>
<i>Métodos dependientes del modelo</i>				
		<b>diferencia</b>	<b>IC 90% de la diferencia</b>	
<i>Parámetros</i>	a	-0,890	-1,613 ; -0,167	<i>no similares</i>
<i>Weibull</i>	b	-0,113	-0,282 ; 0,055	
	F	<b>F<sub>crítico 95%</sub></b>	<b>p-valor</b>	
<i>T<sup>2</sup> de Hotelling</i>	35,07	4,06	< 0,001	<i>no similares</i>

Tabla 5-13. Resumen de los resultados obtenidos para cada uno de los métodos de comparación de perfiles aplicados al par de productos OxCBZ-K y M. ND: no determinado

Comparación entre los productos K y M de comprimidos de OxCBZ				
<i>Métodos independientes del modelo</i>				
	<i>M(T) vs. K (Ref)</i>		<i>K (T) vs. M(Ref)</i>	<b>Conclusión</b>
<i>f<sub>2</sub> clásico</i>	39,82		39,82	<i>no similares</i>
<i>f<sub>2</sub> promedio</i>	39,53 ± 3,61		39,92 ± 3,21	<i>no similares</i>
<i>f<sub>1</sub> clásico</i>	19,02		16,05	<i>no similares</i>
<i>Rescigno <math>\xi_1</math></i>	0,0153			ND
<i>Rescigno <math>\xi_2</math></i>	0,1748			ND
	<b>cociente</b>	<b>p-valor</b>	<b>IC 90% del cociente</b>	
<i>ED</i>	0,9830	0,0351	97,10-99,50	<i>similares</i>
<i>ABC</i>	0,9699	0,1879	93,12 - 101,03	<i>similares</i>
<i>Métodos estadísticos basados en ANAVA</i>				
	<b>p-valor Bifactorial</b>		<b>p-valor Monofactorial.</b>	
<i>Formulación</i>	< 0,01		< 0,01*	<i>no similares</i>
<i>Tiempo</i>	< 0,01			<i>no similares</i>
<i>FxT</i>	< 0,01		* Tiempos que diferían: 5 y 15 minutos	<i>no similares</i>
<i>Métodos dependientes del modelo</i>				
		<b>diferencia</b>	<b>IC 90% de la diferencia</b>	
<i>Parámetros</i>	a	-1,825	-2,335 ; -1,315	<i>no similares</i>
<i>Weibull</i>	b	0,353	0,168 ; 0,538	
	F	<b>F<sub>crítico 95%</sub></b>	<b>p-valor</b>	
<i>T<sup>2</sup> de Hotelling</i>	82,10	4,06	< 0,001	<i>no similares</i>

Tabla 5-14. Resumen de los resultados obtenidos para cada uno de los métodos de comparación de perfiles aplicados al par de productos OxCBZ-L y M. ND: no determinado

Comparación entre los productos L y M de comprimidos de OxCBZ				
<i>Métodos independientes del modelo</i>				
	<i>M (T) vs. L (Ref)</i>		<i>L (T) vs. M(Ref)</i>	<b>Conclusión</b>
<i>f<sub>2</sub> clásico</i>	53,04		50,65	<i>similares</i>
<i>f<sub>2</sub> promedio</i>	52,69 ± 7,74		50,92 ± 8,20	<i>similares</i>
<i>f<sub>1</sub> clásico</i>	8,82		11,18	<i>similares</i>
<i>Rescigno <math>\xi_1</math></i>	0,0148			ND
<i>Rescigno <math>\xi_2</math></i>	0,1722			ND
	<b>cociente</b>	<b>p-valor</b>	<b>IC 90% del cociente</b>	
<i>ED</i>	0,9778	0,0432	96,17 - 99,41	<i>similares</i>
<i>ABC</i>	0,9709	0,1058	94,21 - 100,07	<i>similares</i>
<i>Métodos estadísticos basados en ANAVA</i>				
	<b>p-valor Bifactorial</b>		<b>p-valor Monofactorial.</b>	
<i>Formulación</i>	< 0,01		< 0,01*	<i>no similares</i>
<i>Tiempo</i>	< 0,01		* Tiempos que diferían: 15 y 30 minutos	<i>no similares</i>
<i>FxT</i>	< 0,01			<i>no similares</i>
<i>Métodos dependientes del modelo</i>				
		<b>diferencia</b>	<b>IC 90% de la diferencia</b>	
<i>Parámetros</i>	a	0,012	-0,706 ; 0,729	
<i>Weibull</i>	b	-0,081	-0,238 ; 0,077	<i>similares</i>
	F	<b>F<sub>crítico 95%</sub></b>	<b>p-valor</b>	
<i>T<sup>2</sup> de Hotelling</i>	17,46	4,06	< 0,001	<i>no similares</i>

La primera impresión que se obtiene de los resultados presentados en las tablas anteriores es su falta de concordancia. Para un par de productos dado, se puede concluir similitud o no según el método aplicado. Resulta entonces natural cuestionarse cuál de los métodos es el mejor.

Los métodos dependientes del modelo aplicados tienen como virtudes el considerar las varianzas y covarianzas de los datos, como así también ser flexibles en cuanto a los esquemas de muestreo, ya que los productos que se van a comparar pueden haber sido muestreados siguiendo diferentes esquemas. Sin embargo, estas ventajas no parecen ser suficientes para compensar las desventajas. En primer lugar, lo engorroso del cálculo: la elección del modelo, el ajuste de cada comprimido individual a la ecuación elegida (estos dos pasos se realizan fácilmente con el software adecuado, sin embargo insumen tiempo) y el cálculo de la estadística requerida –ya sea la  $T^2$  de Hotelling o los IC 90% para los parámetros–, que no se puede realizar automáticamente con los software estadísticos más comúnmente utilizados, sino que debe ser realizado manualmente.

En segundo lugar, al requerir el ajuste de los datos a alguna ecuación descriptiva, estos métodos fallan cuando lo que se desea comparar son productos de distintos orígenes, ya que difícilmente todos ajusten al mismo modelo. En la Tabla 5-9 se ve que el modelo de Weibull ajustaba mejor a los productos L y M que a los J\* y K, los cuales hubieran sido mejor estimados por el modelo Logístico.

En la Tabla 5-14 se observa que los únicos productos que resultan similares por este método son L y M, y sólo si se toma la región de similitud correspondiente a  $\pm 3\sigma$  de la referencia. Si además tenemos en cuenta que en este caso el producto de referencia fue el que obtuvo la mayor dispersión en sus parámetros (es decir, si hubiéramos cons-

truido la región de similitud en base a la varianza de cualquier otro de los productos analizados la misma hubiera sido menor), se puede ver que se trata de un método muy discriminante. Los parámetros medios que se comparan (a y b en este caso) provienen de ajustar individualmente cada comprimido al modelo, y generalmente la dispersión es grande entre diferentes comprimidos, lo que lleva a una gran variabilidad en las estimas de dichos parámetros y produce, finalmente, intervalos de confianza demasiado grandes para los cocientes.

Es interesante la evaluación de los parámetros por separado que permite este método. Por ejemplo, así como para los productos K y M los dos parámetros de la ecuación son muy diferentes, para el par J\*-M el parámetro b entra dentro de la zona de similitud, mientras que para J\*-K sucede lo mismo con a. Es decir, se trata de un método capaz de detectar diferencias/similitudes de forma (parámetro b) y escala (parámetro a) entre perfiles.

Sathe y colaboradores desarrollaron este método y lo aplicaron a tres lotes de un mismo producto: uno de referencia, otro “con modificaciones menores” y un tercero “con modificaciones mayores” (Sathe et al., 1996). Los mismos autores declaran que el método está principalmente destinado a su aplicación en el análisis de los cambios que se pueden generar en el perfil de disolución de un producto por el escalado y las modificaciones posteriores a la aprobación del mismo (*scale-up and post approval changes*). El método de Sathe tiene desventajas adicionales: es incierto con qué criterio definir la “región de similitud” (¿1, 2 ó 3 desviaciones estándar de la referencia?), dicha región es difícil de interpretar y alienta la producción de lotes de referencia más variables, lo que aumenta las probabilidades de concluir erróneamente similitud.

El mismo inconveniente de la gran dispersión que provoca el ajuste de los comprimidos individuales a una ecuación se traduce en un valor elevado del estadístico  $T^2$ . En el caso del par de productos L y M los mismos no cumplen con dicho test, incluso cuando la variabilidad asociada a ambos fue lo que en disolución se considera aceptable: menor al 20% en el primer tiempo y al 10% en todos los tiempo siguientes. Otra desventaja de utilizar la prueba de Hotelling es que se trata de un ensayo de hipótesis, es decir, se acepta o se rechaza la similitud entre los grupos de datos que están siendo comparados. Y en el análisis de perfiles de disolución resulta más interesante determinar si la diferencia se encuentra dentro de límites que se consideran aceptables, que determinar si son o no diferentes.

Por su parte, los métodos estadísticos basados en ANAVA demostraron no ser aceptables para su uso en el análisis de los perfiles; además de no cumplirse la hipótesis fundamental de independencia de las observaciones –como se comentó antes en este capítulo–, el tratamiento de los datos no resulta apropiado. Cuando se realiza el análisis bifactorial, el hecho de considerar al tiempo como factor y el gran número de grados de libertad (GL) a causa de los replicados (comprimidos individuales) provocan una gran disminución del error y del  $F_{\text{critico}}$  (que disminuye si aumentan los GL del error), dos hechos que combinados resultan en una elevada exigencia para la aprobación de la similitud entre dos perfiles. Por el contrario, si sólo se considera el factor “formulación” y se realizan las comparaciones punto a punto (a cada tiempo) el método resulta ineficiente ya que el error de tipo I es mucho mayor al valor nominal del 5% (una consecuencia conocida del hecho de realizar múltiples comparaciones), además de resultar tedioso y de interpretación ambigua (O’Hara et al., 1998).

Se llega así a los métodos independientes del modelo. Los índices de Rescigno comparten con los de Moore y Flanner la misma facilidad de cálculo, más la ventaja adicional de no depender de qué perfil de los dos a comparar se defina como referencia. Sin embargo, presentan también desventajas adicionales. A pesar de que O'Hara y colaboradores consideran a los índices  $\xi_1$  y  $\xi_2$  como análogos a los  $f_1$  y  $f_2$ , (O'Hara et al., 1998), no creemos que sea así, ya que a diferencia de los  $f$  ambos  $\xi_i$  denotan falta de similitud, es decir, cuánto más próximos a cero, más similares los perfiles que se comparan. Ninguno de ellos crece con el aumento de similitud, y eso, sumado al hecho de que el valor absoluto entre  $\xi_1$  y  $\xi_2$  no difiere demasiado, les resta potencial informativo respecto a los índices  $f$ . Y dentro de éstos, el  $f_2$  tiene la ventaja respecto al  $f_1$  de crecer con el aumento de similitud, tomando valores entre 0 y 100.

En nuestro caso, los índices  $\xi_i$  arrojaron resultados difíciles de interpretar. El par de productos J\*-K (Tabla 5-11) obtuvo menores valores para ambos índices respecto al par L-M (Tabla 5-14), cuando por todos los demás métodos de comparación aplicados se concluye que J\* con K no son tan similares entre sí como L con M. Si a lo dicho hasta aquí se le agrega que no existe una especificación para decidir cuán cercanos a cero deben ser los  $\xi_i$  para concluir similitud, pareciera no justificarse su elección como método de comparación de perfiles.

Más adelante, cuando se presentan los resultados obtenidos para comprimidos de CBZ 200 mg, se discute el desempeño de los parámetros ABC y ED para la comparación de perfiles de disolución. Por el momento, sólo notemos que sobre la base de los resultados de las tablas anteriores la comparación de estos parámetros arrojó resultados, si no coincidentes con el  $f_2$ , algo más permisivos.

El factor de similitud  $f_2$  ha sido ampliamente discutido en la literatura, posiblemente a causa de ser el método recomendado por la mayoría de los entes regulatorios de medicamentos. Se han descrito como desventajas los siguientes puntos:

- a. no toma en cuenta el espaciado entre los tiempos de muestreo (Costa & Souza Lobo, 2001);
- b. requiere el mismo esquema de muestreo para los perfiles a comparar (Sathe et al., 1996);
- c. no resulta aplicable a sistemas de liberación modificada (Chow & Ki, 1997);
- d. no tiene en cuenta la variación entre las unidades ensayadas (Berry & Likar, 2007);
- e. depende de los puntos que se usen para su cálculo (O'Hara et al., 1998; Polli et al., 1997);
- f. su valor puede modificarse según qué perfil del par que está siendo comparado se considere Test y cuál Referencia (O'Hara et al., 1998);
- g. la especificación ( $f_2 \geq 50$  es similar) pareciera ser arbitraria (O'Hara et al., 1998; Polli et al., 1997);
- h. al igual que los demás índices matemáticos, es un método no estadístico y por lo tanto no permite la estimación de los errores de tipo I (probabilidad de concluir diferencia cuando los perfiles en realidad son similares) ni de tipo II (concluir similitud cuando son diferentes) (O'Hara et al., 1998).

A continuación, se detallan posibles formas que, en nuestra opinión, pueden solucionar o atenuar los inconvenientes señalados:

- a. este punto se tratará con mayor detenimiento más adelante, cuando se presenten los resultados de CBZ. Que no se considere el espaciado entre puntos es una desventaja del método, pero creemos que esto se puede atenuar calculando de manera simultánea otro parámetro, como ABC o ED, que contemple el esquema de muestreo total;
- b. no representa una gran desventaja que sea necesario muestrear a iguales tiempos a las formulaciones T y R. Durante la mayoría de los ensayos de comparación de perfiles el objetivo (es decir, la comparación propiamente dicha) se fija de antemano, de manera que muestrear siguiendo el mismo esquema para todos los productos no implicaría ninguna dificultad;
- c. el presente trabajo de tesis solo trata con productos de liberación inmediata. La aplicación del  $f_2$  a sistemas de liberación modificada posiblemente requiera de mayor investigación en el tema, ya que aún no ha sido propuesto para dicho uso;
- d. este aspecto es abordado por Shah y colaboradores, quienes describen cómo el  $f_2$  calculado en base a una muestra representa un estimador sesgado del valor verdadero del  $f_2$  entre las dos poblaciones a comparar, y debido a su distribución estadística compleja calculan sus IC 90% y sus desvíos mediante la técnica de *bootstrap* o remuestreo.<sup>2</sup> Los autores concluyen que el  $f_2$  normalmente calculado es una estimación correcta (y conservadora por el sesgo) del valor verdadero de dicho parámetro. Es decir, el valor verdadero del  $f_2$  entre dos muestras será mayor al calculado según la Ecuación 5-1 debido al sesgo (Shah et al., 1998).
- e. es una desventaja cierta que el valor del  $f_2$  dependa de los puntos que se usen para su cálculo, y por ello fue necesario uniformar el criterio para elegirlos. Acorde a las guías oficiales, se debe tomar solamente un punto más luego de que la Referencia se haya disuelto un 85% (FDA/CDER, 2000);
- f. cuando los perfiles a comparar no alcanzan el 85% al mismo tiempo, es decir, cuando el  $f_2$  entre ellos se modificaría según cuál se considere Referencia, creemos conveniente calcular e informar ambos valores. Esta situación sólo sería conflictiva si dichos valores quedaran uno por debajo y otro por encima de 50. En ese caso, se requerirían cálculos posteriores para decidir, por ejemplo, aplicar otro método de comparación;
- g. la especificación ( $f_2 \geq 50$  es similar) corresponde a una diferencia del 10% entre los perfiles analizados (10 unidades medidas en el eje vertical de % Disuelto) en cada uno de los puntos tomados para calcular el  $f_2$ . Si bien en un comienzo pudo parecer arbitraria, hoy en día se cuenta con años de experiencia para avalar dicho límite (este punto se tratará con más detalle a continuación);
- h. como en el caso del ítem a., no poder conocer los errores de tipo I y tipo II es una desventaja del método pero, nuevamente, si se acompaña el valor del  $f_2$  con el análisis comparativo de las ABC o ED esta falencia se puede atenuar de alguna manera, ya que cuando éstos parámetros se comparan estadísticamente sí se pueden estimar dichos errores.

Respecto al ítem g., se trata de un aspecto sobre el que los autores no parecen ponerse de acuerdo: hay quienes lo consideran un límite muy permisivo (Adams et al., 2002; Chow & Ki, 1997) y quienes lo consideran demasiado exigente (Polli et al., 1997). Los resultados presentados hasta aquí parecerían inclinarse más por la segunda

---

<sup>2</sup> Mediante *bootstrap* lo que se hace es tomar muestras, al azar y con reposición, del conjunto de datos que se tiene (típicamente, 100, 200, 500 y hasta 1000 muestras) y calcular para cada una el valor del parámetro de interés. Luego, se construye el IC 90% para dicho parámetro en función de los percentiles 5 y 95%.

opción, ya que los tres productos de OxCBZ 600 mg ensayados (J\*, K y L) declaran ser BE por la autoridad nacional y sin embargo sólo J\* y K resultaron similares de acuerdo al criterio  $f_2$ , y en la situación límite descrita más arriba. Sin embargo, esto se basa en una premisa no demostrada (¿son realmente bioequivalentes los productos J\*, K y L?). Los resultados que se presentan a continuación para los productos de CBZ 200 mg intentan esclarecer un poco más este punto.

Por último, no debemos olvidar por qué comparamos perfiles. En todos los casos incluidos aquí, siempre se trata de productos de diversos orígenes, potenciales equivalentes terapéuticos, a los que se quiere poder declarar equivalentes farmacéuticos. Es por ello que, en estas situaciones, la similitud *in vitro* sólo interesa por su calidad como herramienta predictiva u orientativa de los procesos *in vivo*. Con este objetivo en mente, los métodos de comparación deberían ser tales que produzcan, al menos, resultados coherentes con los estudios de BE, es decir, los que hoy en día se solicitan para garantizar la similitud *in vivo* de los medicamentos.

En el caso de los productos de OxCBZ estudiados, los productos J\*, K y L son considerados BE por la autoridad sanitaria nacional (ANMAT, 2011). El producto M no se incluye ya que tiene otra dosis. Sin embargo, ninguno de los métodos aplicados para la comparación de los resultados *in vitro* arrojó un resultado que fuera coherente con esa BE.

A continuación, se presenta un análisis similar al descrito hasta aquí pero aplicado a los productos de CBZ 200 mg cuyos perfiles de disolución se desarrollaron en la sección 2.1. El objetivo de repetir los cálculos para CBZ fue brindar mayor sustento a las conclusiones de esta sección mediante su comparación/correlación con resultados *in vivo*.

#### Comprimidos de CBZ

En la sección 2.1 se expusieron los resultados obtenidos para los perfiles de disolución de cinco productos de CBZ 200 mg, cuatro de los cuales fueron posteriormente ensayados *in vivo* mediante un estudio de biodisponibilidad relativa en voluntarios sanos (Capítulo 4).

A continuación, se presentan los perfiles de disolución superpuestos de dichos productos, denominados CBZ-A\*, B, C, D y E (Figura 5-8).

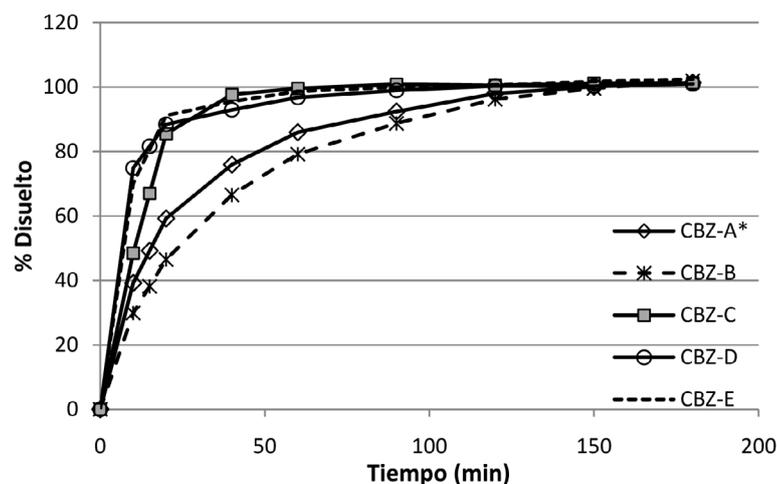


Figura 5-8. Perfiles de disolución en LSNa 1% de cinco productos conteniendo CBZ 200 mg. Con un asterisco se indica el producto de referencia

**Tabla 5-15.** Resultados obtenidos para los parámetros (k, a, b) luego del ajuste de los datos promedio de % Disuelto vs. tiempo de los cinco productos de CBZ 200 mg a los cuatro modelos matemáticos propuestos. El p-valor informado para cada caso es el resultado del ensayo de Falta de Ajuste realizado con los datos individuales de cada producto para cada modelo. Se ve que ninguno de los modelos propuestos ajusta a todos los productos (el producto CBZ-B no ajusta a ninguna ecuación)

Producto	Primer Orden	Gompertz	Logistic	Weibull
CBZ-A*	$k = 0,0416$	$a = 13,98$ $b = 2,587$	$a = -3,734$ $b = 3,178$	$a = 0,0837$ $b = 0,7764$
	$p\text{-valor} < 0,01$	$p\text{-valor} < 0,01$	$p\text{-valor} < 0,01$	$p\text{-valor} > 0,05$
CBZ-B	$k = 0,0291$	$a = 18,36$ $b = 2,533$	$a = -4,365$ $b = 3,293$	$a = 0,0451$ $b = 0,8740$
	$p\text{-valor} < 0,01$	$p\text{-valor} < 0,01$	$p\text{-valor} < 0,01$	$p\text{-valor} < 0,01$
CBZ-C	$k = 0,0774$	$a = 87,22$ $b = 4,739$	$a = -5,866$ $b = 5,740$	$a = 0,0215$ $b = 1,4782$
	$p\text{-valor} < 0,01$	$p\text{-valor} < 0,05$	$p\text{-valor} > 0,05$	$p\text{-valor} > 0,05$
CBZ-D	$k = 0,1221$	$a = 5,164$ $b = 2,838$	$a = -1,999$ $b = 3,048$	$a = 0,4122$ $b = 0,5284$
	$p\text{-valor} < 0,01$	$p\text{-valor} < 0,05$	$p\text{-valor} > 0,05$	$p\text{-valor} > 0,05$
CBZ-E	$k = 0,1162$	$a = 18,61$ $b = 3,927$	$a = -3,488$ $b = 4,308$	$a = 0,1777$ $b = 0,8350$
	$p\text{-valor} > 0,05$	$p\text{-valor} > 0,05$	$p\text{-valor} > 0,05$	$p\text{-valor} > 0,05$

Como puede verse en la tabla anterior, no fue posible ajustar los datos de todos los productos a un único modelo, por lo que en este caso no se realizaron las comparaciones por métodos dependientes del modelo. Esta decisión también se fundamenta en los resultados encontrados para OxCBZ: estos métodos son tan discriminantes que las diferencias encontradas en productos de distintos orígenes, aunque biofarmacéuticamente irrelevantes, son suficientes para concluir falta de semejanza estadística.

A continuación, se presentan los resultados de la comparación de los perfiles por los métodos independientes del modelo (Tabla 5-16). Los métodos estadísticos basados en ANAVA tampoco se aplicaron en este caso por las razones ya discutidas anteriormente.

**Tabla 5-16.** Resultados obtenidos para la comparación de perfiles de disolución, mediante métodos independientes del modelo, de los cinco productos de CBZ 200 mg analizados. La letra que aparece entre paréntesis al lado del valor informado de  $f_2$  clásico indica el producto tomado como referencia para el cálculo de los índices  $f$ . ED: eficiencia de disolución. ABC: área bajo la curva

Comparación de perfiles de disolución entre comprimidos de CBZ 200 mg			
CBZ-A* vs. CBZ-B			<b>Conclusión</b>
$f_2$ clásico	52,40 (A)	54,27 (B)	similares
$f_2$ promedio	52,44 ± 11,59	53,97 ± 11,41	similares
$f_1$ clásico	11,86	10,72	similares
	<b>Cociente (p-valor)</b>	<b>IC 90% del cociente</b>	
ED	0,9419 (0,0031)	91,54 – 96,92	no similares
ABC	0,9478 (0,0043)	92,27 – 97,37	no similares

CBZ-A* vs. CBZ-C				
<i>f<sub>2</sub> clásico</i>	37,98 (A)		34,47 (C)	<i>no similares</i>
<i>f<sub>2</sub> promedio</i>	38,46 ± 7,73		35,07 ± 7,79	<i>no similares</i>
<i>f<sub>1</sub> clásico</i>	22,52		24,76	<i>no similares</i>
<b>ED</b>	1,1081 (< 0,001)		108,22 - 113,46	<i>no similares</i>
<b>ABC</b>	1,1074 (< 0,001)		108,01 - 113,55	<i>no similares</i>
CBZ-A* vs. CBZ-D				
<i>f<sub>2</sub> clásico</i>	32,32 (A)		27,50 (D)	<i>no similares</i>
<i>f<sub>2</sub> promedio</i>	32,55 ± 5,48		27,84 ± 5,20	<i>no similares</i>
<i>f<sub>1</sub> clásico</i>	28,04		31,82	<i>no similares</i>
<b>ED</b>	1,1258 (< 0,001)		106,04 - 119,52	<i>no similares</i>
<b>ABC</b>	1,1162 (< 0,001)		106,28 - 117,23	<i>no similares</i>
CBZ-A* vs. CBZ-E				
<i>f<sub>2</sub> clásico</i>	32,15 (A)		27,57 (E)	<i>no similares</i>
<i>f<sub>2</sub> promedio</i>	32,74 ± 7,34		28,30 ± 7,05	<i>no similares</i>
<i>f<sub>1</sub> clásico</i>	29,14		32,14	<i>no similares</i>
<b>ED</b>	1,1107 (< 0,001)		107,58 - 114,67	<i>no similares</i>
<b>ABC</b>	1,1227 (< 0,001)		107,73 - 116,99	<i>no similares</i>
CBZ-B vs. CBZ-C				
<i>f<sub>2</sub> clásico</i>	31,09 (B)		25,59 (C)	<i>no similares</i>
<i>f<sub>2</sub> promedio</i>	31,23 ± 3,83		25,80 ± 3,80	<i>no similares</i>
<i>f<sub>1</sub> clásico</i>	30,86		38,31	<i>no similares</i>
<b>ED</b>	1,1765 (< 0,001)		115,76 - 119,57	<i>no similares</i>
<b>ABC</b>	1,1684 (< 0,001)		114,14 - 119,60	<i>no similares</i>
CBZ-B vs. CBZ-D				
<i>f<sub>2</sub> clásico</i>	27,26 (B)		20,76 (D)	<i>no similares</i>
<i>f<sub>2</sub> promedio</i>	27,35 ± 3,00		20,91 ± 2,81	<i>no similares</i>
<i>f<sub>1</sub> clásico</i>	35,59		44,10	<i>no similares</i>
<b>ED</b>	1,1744 (< 0,001)		115,02 - 119,92	<i>no similares</i>
<b>ABC</b>	1,1656 (< 0,001)		113,80 - 119,38	<i>no similares</i>
CBZ-B vs. CBZ-E				
<i>f<sub>2</sub> clásico</i>	27,00 (B)		20,69 (E)	<i>no similares</i>
<i>f<sub>2</sub> promedio</i>	27,25 ± 4,43		20,99 ± 4,08	<i>no similares</i>
<i>f<sub>1</sub> clásico</i>	36,62		44,36	<i>no similares</i>
<b>ED</b>	1,1792 (< 0,001)		115,97 - 119,90	<i>no similares</i>
<b>ABC</b>	1,1844 (< 0,001)		114,62 - 122,40	<i>no similares</i>
CBZ-C vs. CBZ-D				
<i>f<sub>2</sub> clásico</i>	40,58 (C)		40,58 (D)	<i>no similares</i>
<i>f<sub>2</sub> promedio</i>	39,85 ± 4,82		39,85 ± 4,82	<i>no similares</i>
<i>f<sub>1</sub> clásico</i>	14,44		13,08	<i>similares</i>
<b>ED</b>	1,0064 (0,4824)		98,83 - 102,49	<i>similares</i>
<b>ABC</b>	1,0045 (0,8525)		98,63 - 102,30	<i>similares</i>
CBZ-C vs. CBZ-E				
<i>f<sub>2</sub> clásico</i>	44,28 (C)		44,28 (E)	<i>no similares</i>
<i>f<sub>2</sub> promedio</i>	43,28 ± 8,24		43,28 ± 8,24	<i>no similares</i>
<i>f<sub>1</sub> clásico</i>	12,71		11,47	<i>similares</i>
<b>ED</b>	1,0023 (0,7444)		98,98 - 101,49	<i>similares</i>
<b>ABC</b>	1,0138 (0,3928)		98,59 - 104,24	<i>similares</i>
CBZ-D vs. CBZ-E				
<i>f<sub>2</sub> clásico</i>	72,07 (D)		72,07 (E)	<i>similares</i>
<i>f<sub>2</sub> promedio</i>	63,30 ± 11,11		63,30 ± 11,11	<i>similares</i>
<i>f<sub>1</sub> clásico</i>	3,98		3,96	<i>similares</i>
<b>ED</b>	0,9941 (0,7640)		97,47 - 101,39	<i>similares</i>
<b>ABC</b>	0,9747 (0,6136)		93,42 - 101,70	<i>similares</i>

Analizando la tabla anterior se observa que así como el par de productos D-E es el único que resulta similar según todos los métodos de comparación empleados, los pares A\*-C, A\*-D, A\*-E, B-C, B-D y B-E resultan no similares en todos los casos.

Para tres de los pares restantes los resultados no siempre son coincidentes. En el caso de A\*-B (los dos perfiles que se encuentran por debajo del resto en la Figura 5-7) se observa que sus perfiles resultan similares de acuerdo a los factores  $f_1$  y  $f_2$ , pero no cuando se comparan sus ABC ni sus ED (p-valor < 0,005). Lo contrario sucede con los pares de productos C-E y C-D, si bien no resultan similares según el criterio  $f_2$  (sí según el  $f_1$ ), sí lo son sus ABC y ED.

Es interesante lo anterior, ya que ejemplifica claramente la naturaleza de ambos tipos de comparaciones. El factor  $f_2$  da cuenta de las diferencias en el porcentaje disuelto al medir distancias verticales, sin tener en cuenta cuán separadas se encuentran en el tiempo (es decir, no considera el espaciado entre puntos). Eso genera que sea muy sensible a las diferencias que se producen en los primeros tiempos, las que tal vez no modifiquen demasiado el área ni la forma final del perfil. Si se observa la Figura 5-7 se ve que el perfil del producto C no es muy diferente a los de D y E, excepto en los dos primeros tiempos muestreados, donde se mantiene siempre por debajo. Esto tiene un gran impacto en el factor de similitud  $f_2$ , sobre todo porque como dichos productos son de rápida disolución llegan al 85% en el segundo punto de tiempo, y entonces el  $f_2$  sólo se calcula con los tres primeros puntos. Sin embargo, el área definida por la curva (y por lo tanto, la ED también) no difiere significativamente entre los tres productos.

Si se observan ahora los resultados *in vivo* obtenidos en voluntarios sanos para los productos A\*, B, C y D (Capítulo 4), se tiene que:

- el producto B es equivalente a A\* en términos de velocidad (parámetro  $C_{max}/ABC_{0-t}$  bioequivalente) pero no en cantidad ( $ABC_{0-t}$ ,  $ABC_{0-inf}$  y  $C_{max}$  no BE);
- C y D son equivalentes en cantidad ( $ABC_{0-t}$  y  $C_{max}$  BE) y casi en velocidad (el intervalo del 90% de confianza para el parámetro  $C_{max}/ABC_{0-t}$  es 78,2-122,9%).

Estos resultados son perfectamente coherentes con nuestro análisis anterior: el resultado arrojado por el factor  $f_2$  se relaciona con la velocidad *in vivo* mientras que ABC y ED dan cuenta de la cantidad disponible.

El problema se plantea cuando se debe responder a la pregunta acerca de si los perfiles (A con B, C con D y C con E) son similares o no. Si, al igual que en el caso de OxCBZ, tenemos en cuenta que el objetivo de este tipo de comparaciones es, de alguna manera, la predicción de los desempeños que se observarían *in vivo*, la respuesta debería ser negativa, ya que la misma definición de bioequivalencia implica similitud en velocidad y cantidad de manera simultánea.

De la discusión de resultados de OxCBZ había quedado pendiente el tema del valor límite de la especificación para el factor  $f_2$ . De acuerdo al análisis anterior, nuestros resultados *in vivo* apoyarían el valor actual de la especificación, es decir,  $f_2 \geq 50$  para concluir similitud, al menos en términos de velocidad. Por lo tanto, creemos que la especificación  $f_2 \geq 50$  es correcta o tal vez algo permisiva para el establecimiento de similitud entre perfiles, sobre todo cuando se desea establecer como estudio preliminar o predictivo del desempeño *in vivo* de dichos productos.

Cabe destacar que los autores que consideraron muy estricta la exigencia de  $f_2 \geq 50$  para perfiles similares (Polli et al., 1997) se basaron en resultados obtenidos con comprimidos de Metoprolol tartrato (formulaciones con valores de  $f_2$  hasta 17,7 resultaban bioequivalentes), a pesar de tratarse de un principio activo de clase I del BCS (Yu et al., 2004), es decir, para el que la disolución no es la etapa limitante de la absorción. Por el contrario, en nuestro caso CBZ pertenece a la clase II del BCS, por lo que la disolución es la etapa limitante de la absorción y resulta, por tanto, una droga más adecuada para sacar conclusiones que relacionen los resultados *in vitro/in vivo*.

Por otro lado, la comparación con los resultados *in vivo* apoya lo que ya se había discutido para OxCBZ: que los métodos estadísticos y los dependientes del modelo son demasiado discriminantes y exigentes para este tipo de comparaciones.

## Discusión y conclusiones parciales

A pesar de que el principio de transitividad se asume como cierto durante los ensayos de bioequivalencia, los resultados obtenidos en la sección 5.1 se encuentran de acuerdo a los de Benet & Goyan, Anderson & Hauck y Midha y colaboradores (Anderson & Hauck, 1996; Benet & Goyan, 1995; Midha et al., 1998) con respecto a la falta de fundamento de dicha presunción: el principio de transitividad no se cumple de manera general y, por lo tanto, representa un riesgo a la hora de determinar el intercambio de un producto por otro. La única similitud que estaría asegurado por los estudios de BE sería entre el de un producto dado y el líder contra el cual demostró ser BE.

Las posibles desviaciones al principio de transitividad se deben considerar especialmente en el caso de:

- principios activos altamente permeables, para los que la disolución representa la etapa limitante de la velocidad de absorción;
- principios activos de estrecho margen terapéutico (FEMTs), para los que pequeñas diferencias en su biodisponibilidad pueden producir grandes diferencias terapéuticas.

Una alternativa sería recomendar a las industrias farmacéuticas la demostración de BE no solo respecto al producto de referencia sino también a todos los demás productos existentes en el mercado. Dicha información estaría disponible tanto para los profesionales médicos como farmacéuticos y se convertiría en un sustento seguro para sustituciones e intercambios racionales. Esta recomendación, si bien implicaría una gran inversión de parte del sector, resultaría en un beneficio importante para los pacientes en general, quienes podrían contar con una mayor oferta de potenciales intercambios, todos igualmente seguros.

Sin embargo, y como se establece en las conclusiones (Capítulo 7), creemos que el problema radica en la sobreexigencia que se ha impuesto a la prueba de BE, al pretender que sea garantía de la intercambiabilidad entre productos. Si se abandona esa idea y simplemente se considera a la BE como metodología experimental para garantizar la equivalente calidad biofarmacéutica de los medicamentos, no solo se evitan los problemas derivados de la transitividad sino también los potenciales riesgos asociados a los intercambios.

En la segunda parte de este capítulo se analizaron diversos métodos de comparación de perfiles de disolución y a partir de la discusión de los resultados obtenidos se llegó a dos conclusiones principales:

- el factor de similitud  $f_2$  es el método con la mejor relación entre ventajas e inconvenientes a la hora de comparar perfiles de disolución, principalmente si se trata de productos de diversos orígenes para los que se quiere predecir su desempeño *in vivo*;
- resulta conveniente acompañar el valor informado del  $f_2$  con alguna otra medida como ABC y/o ED, de manera de lograr un resultado más robusto tanto por si el valor de  $f_2$  fuera muy cercano a la especificación como si fuera  $< 50$  por diferencias en los primeros tiempos (idea de *velocidad* de absorción).

En cuanto a los métodos dependientes del modelo ensayado, nuestros resultados y conclusiones estuvieron de acuerdo, entre otros, con los de Adams y colaboradores, quienes concluyeron, luego de analizar distintos modelos no lineales para describir perfiles de disolución, que dichos métodos resultaron ser “más informativos y discriminantes” que el factor de similitud  $f_2$  (Adams et al., 2002). Estos métodos serían de elección si lo que se desea es un análisis detallado de los perfiles, evaluando por ejemplo el cambio producido por alguna modificación en la fórmula, en el proceso de producción, cambio de maquinaria, de escala, etc. Sin embargo, resultan demasiado exigentes y engorrosos para el uso aquí propuesto.

Respecto de los métodos estadísticos basados en ANAVA, nuestras conclusiones apoyan lo encontrado por Polli y colaboradores (Polli et al., 1996 y 1997), quienes concluyeron que dichos ensayos identifican diferencias estadísticas y no farmacéuticas entre perfiles de disolución. Es decir, la equivalencia estadística sería que los perfiles no difieran al 95% de confianza, mientras que la equivalencia farmacéutica significa que las curvas de disolución se encuentren dentro de determinadas especificaciones. Por lo tanto, resultan sobre-discriminantes y no serían aplicables a la comparación de perfiles de disolución.

Por esto, creemos que el factor de similitud  $f_2$  resulta idóneo para juzgar la equivalencia de la disolución entre dos productos, y que la medida de otros parámetros como ABC y ED brinda una información valiosa para complementar el resultado de la comparación, generando junto con el  $f_2$  un resultado robusto y confiable. Estudios previos (Anderson et al., 1998; Polli et al., 1997) ya habían encontrado que la comparación de perfiles mediante el uso de la ED y ABC no sólo genera resultados comparables a otros métodos sino que es la metodología de elección cuando se desea una comparación cuantitativa de los perfiles.

Los resultados obtenidos para el principio activo Fenitoína (PHT), aunque no se discutieron en este capítulo, respaldan lo anterior: los dos productos analizados *in vivo* (productos F y G, ver Capítulo 3) resultaron ser bioequivalentes (aun de acuerdo a la metodología de bioequivalencia individual aplicada), mientras que sus perfiles de disolución solo son similares en sus ABC ( $p > 0,05$ ), con un valor de  $f_2 = 37$ . De acuerdo a lo expuesto hasta aquí, si ABC da cuenta de la cantidad mientras que el  $f_2$  se relaciona más con la velocidad, la BE entre F y G (es decir, su similar *cantidad* y *velocidad* de absorción *in vivo*) podría deberse, probablemente, a la elevada disolución encontrada para ambos productos en medio acuoso. Si bien PHT pertenece a la clase II del BCS igual que CBZ y OxCBZ (Lindenberg et al., 2005), las cápsulas analizadas presentaron una rápida disolución en agua ( $> 85\%$  en 30 minutos).

---

---

■ Capítulo 6

**El uso de saliva en estudios  
de biodisponibilidad relativa**





La secreción salival es producida en el hombre por tres pares de glándulas denominadas parótidas, submaxilares y sublinguales. Estas glándulas están constituidas por acinos, cuyos productos se vuelcan en la luz de estas estructuras y drenan a través de conductos llamados intercalares. Los conductos intercalares de distintos acinos confluyen para formar conductos de mayor calibre, intralobulares e interlobulares, y finalmente los conductos excretores conforman un conducto único de mayor tamaño que termina en la cavidad bucal (Houssay et al., 1988).

Tanto los acinos como los conductos poseen una rica vascularización con densas redes capilares. La irrigación sanguínea de estas glándulas se inicia en la arteria carótida. Las arteriolas se capilarizan a nivel de las células de acinos y conductos (acinosas y ductales). La sangre proveniente de los capilares ductales se vierte en los capilares acinosos por medio de vénulas porta y de allí vuelve a la circulación sistémica por intermedio de vénulas (Jacobson, 1981).

La producción de saliva se origina en los acinos por filtración del plasma sanguíneo, por lo que a esa altura la composición electrolítica de la saliva es similar al ultrafiltrado del plasma que irriga la zona. Aunque el mecanismo es más complejo que una simple ultrafiltración (Guyton & Hall, 2006), la secreción de las células acinosas no difiere cuantitativamente del plasma sanguíneo, a excepción de moléculas no difusibles. Esta secreción primaria se convierte luego en hipotónica durante su paso por los conductos, a través de los cuales se producen movimientos de solutos pero no de agua, ya que las células ductales son impermeables al agua (Houssay et al., 1988).

El resultado de tales transferencias da como producto la saliva emitida a la cavidad bucal. Por día se secretan aproximadamente 1200 ml de saliva, la cual tiene un pH que varía entre 6,2 y 7,4. Se ha demostrado que el cambio de pH salival es totalmente dependiente del cambio en la velocidad de producción de saliva: el mayor valor de pH se observa cuando la secreción es mayor, debido a un aumento en el contenido de bicarbonato (Drobitch & Svensson, 1992).

La inervación de las glándulas salivales proviene del sistema nervioso autónomo simpático y parasimpático. El estímulo secretorio más importante proviene del parasimpático, vía nervios glossofaríngeo y facial, y produce de manera simultánea vasodilatación, activación de los mecanismos de transporte de las células de los conductos y producción de una saliva abundante y acuosa. Por lo tanto aumenta la cantidad de saliva, como así también el flujo, ya que el mioepitelio que rodea los acinos y conductos se contrae por estímulo de la acetilcolina, produciendo la expulsión de la saliva hacia la boca. Por el contrario, la estimulación simpática (fibras posganglionares procedentes del ganglio cervical superior) se acompaña de vasoconstricción y de la producción de una saliva escasa y viscosa (Houssay et al., 1988).

En cuanto a la aparición de los principios activos, sólo la fracción no ligada de fármaco presente en el plasma es capaz de difundir a la saliva (Horning et al., 1977). Teóricamente, todos los mecanismos de transporte son aplicables para que los fármacos accedan desde la sangre a la saliva, pero hasta el momento la difusión pasiva por partición pH-dependiente ha sido el más aceptado y preponderante dentro del conjunto de procesos que cursan simultáneamente. Para algunos fármacos se ha aceptado también que su transferencia a la saliva tenga una contribución por transporte activo (Groth et al., 1974; Hayashi et al., 1988), utilizando bombas de eflujo que pueden incluso inducirse bajo diferentes circunstancias (Maldonado et al., 2011).

Para predecir el cociente de concentraciones saliva/plasma (S/P) puede aplicarse la ecuación de Henderson-Hasselbach:

$$S/P = \frac{1 + 10^{(pH_{saliva} - pKa)}}{1 + 10^{(pH_{plasma} - pKa)}} \cdot \frac{f_{plasma}}{f_{saliva}}$$

■ Ecuación 6-1

Esta ecuación corresponde a drogas ácidas (en el caso de drogas básicas, se deben cambiar los signos del exponente), donde  $f_{plasma}$  y  $f_{saliva}$  representan las fracciones de droga libre en plasma y saliva respectivamente. Como los pHs en plasma y saliva son similares, el cociente S/P es una buena estima de la fracción libre en plasma para ciertos principios activos, dado que el fármaco en saliva se halla libre ( $f_{saliva} = 1$ , ver Tabla 6-1).

■ **Tabla 6-1.** Algunos ejemplos de drogas cuyo cociente S/P representa una buena estimación de la fracción libre en plasma. El litio se incluye como ejemplo de droga activamente transportada desde el plasma a la saliva (Horning et al., 1977)

<b>Droga</b>	<b>Plasma libre / total</b>	<b>Cociente saliva / plasma</b>
<i>Aminopirina</i>	0,85	0,80
<i>Carbamazepina</i>	0,24 – 0,33	0,37
<i>Digoxina</i>	0,77	0,78
<i>Fenacetina</i>	0,60 – 0,70	0,60
<i>Fenitoína</i>	0,10 – 0,14	0,09 – 0,11
<i>Primidona</i>	0,78 – 0,97	0,97 – 1,08
<i>Teofilina</i>	0,41	0,52
<i>Acido Salicílico</i>	0,20 – 0,55	0,03 – 0,04
<i>Litio</i>	1,00	2,20 – 2,30

La tabla anterior enumera los cocientes S/P informados para varias drogas junto con los cocientes entre la concentración libre/total en plasma para las mismas drogas. Cuando los valores de S/P coinciden con la relación libre/total en plasma, la concentración salival es una buena estima de la concentración de droga libre en plasma. El litio se incluye en la tabla como un ejemplo de droga que llega a la saliva por transporte activo y no por difusión pasiva.

Como la concentración final de un fármaco en saliva puede variar con la velocidad de producción de la misma (Stephen et al., 1980; Zuidema & van Ginneken, 1983), en los protocolos de trabajo siempre se debe aclarar la forma de obtención de las muestras salivales. Para aumentar el volumen de muestra, es frecuente estimular la salivación mediante la masticación de parafilm o mediante cristales de ácido cítrico sobre la lengua (Ritschel & Tompson, 1983).

En numerosas oportunidades, los investigadores han intentado justificar el uso de saliva como fluido biológico en estudios farmacocinéticos, biofarmacéuticos y/o clínicos, a partir de establecer correlaciones entre datos salivales y datos plasmáticos. De esa manera, la opinión acerca del uso de saliva se dividió en *a favor* y *en contra* según los resultados de las correlaciones fueran buenos o malos (Fagiolino, 1999).

Entre quienes afirmaron haber encontrado una buena correlación generalmente se incluyen quienes trabajaron con muestras obtenidas en fase de eliminación o luego de alcanzar el estado estacionario en dosis múltiples (Heim et al., 1980; Jonkman et al., 1981; Lee et al., 1996; Meffin et al., 1977; Plavsic et al., 1981; Shah & Riegelman, 1974; Thijssen et al., 1996). La correlación significativa saliva-plasma también fue informada cuando se estimuló la salivación (Blanchard et al., 1991; Blanchard et al., 1992; Knott et al., 1984; Siegel et al., 1990) o cuando se estudiaron sustancias endógenas (Shimada et al., 1995).

En tanto, los argumentos contrarios al uso de saliva se basaron en la alta variabilidad inter e intra individual del cociente S/P (Cardot et al., 1995; Danhof & Breimer, 1978; Uden et al., 1981), el cual es muy variable y más alto durante la fase de absorción del medicamento (Glynn & Bastain, 1973; Hold et al., 1995; Knop et al., 1975; Koup et al., 1975; Lowe & Dixon, 1983; Lowenthal et al., 1976; Smith et al., 1991). Si bien resulta aceptable que la relación S/P varíe entre distintos individuos, no sería adecuado que un mismo sujeto muestre cocientes S/P variables a lo largo del día o durante el intervalo de administración del medicamento.

Para algunos fármacos, también se ha encontrado que el cociente S/P es diferente según si se evalúa en dosis única o en dosis múltiple. En la mayoría de los casos, se encuentran S/P variables durante la fase de absorción y constantes en fase de eliminación o estado estacionario (estos dos últimos, no necesariamente iguales). Por otra parte, los perfiles de concentraciones salivales de fármacos en función del tiempo son altamente variables, mostrando varios picos que dificultan el cálculo de los parámetros farmacocinéticos y/o su interpretación (Figura 6-1).

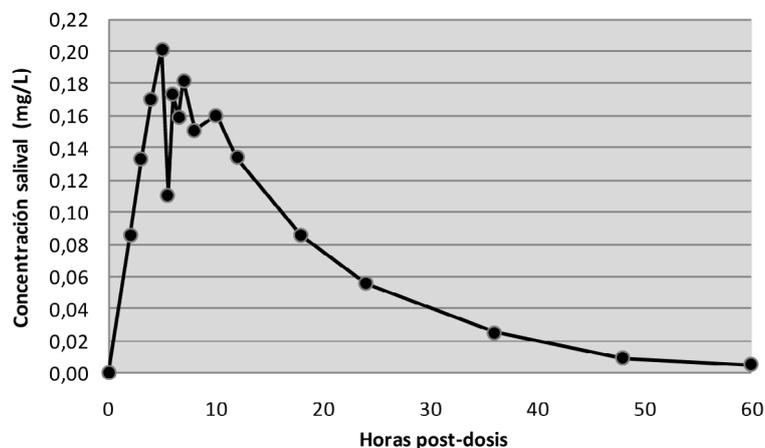


Figura 6-1. Concentración salival de Fenitoína (PHT) en función del tiempo en un voluntario sano luego de la administración de una cápsula conteniendo 100 mg de PHT

De acuerdo a lo señalado, existe gran controversia acerca del uso de saliva para el monitoreo de drogas, tanto durante estudios de BE como para monitoreos terapéuticos. La falta de un cociente S/P constante (y por lo tanto, la falta de correlación S/P) constituye el mayor inconveniente, en contraposición a las ventajas de su uso: mayor facilidad de extracción, método no invasivo, conveniente en pediatría, menores costos, posibilidad de monitoreo domiciliario, etcétera.

Una de las primeras teorías que se postuló para explicar los elevados cocientes S/P observados luego de la administración oral fue la que atribuía dicho resultado a la contaminación de la mucosa oral con el fármaco ingerido. Si bien la contaminación de la cavidad oral ciertamente representa una potencial causa de error, no explica por qué los cocientes S/P siguen siendo elevados cuando dicha contaminación es excluida o cuando la droga se administra por otra vía (rectal, por ejemplo). Otros autores también sugirieron que ciertas drogas podían ser secretadas de manera activa a la saliva, como procainamida, metoprolol y propranolol (Hold et al., 1995). Sin embargo, el transporte activo explicaría un elevado cociente S/P durante toda la curva (hasta la eliminación del fármaco del organismo), y no solamente durante la fase de absorción (Fagiolino, 1999). Finalmente, surgieron modelos que lograron explicar la variabilidad del cociente S/P, y en esta ocasión vamos a detallar dos de ellos: un modelo físico, propuesto por Posti en 1982 y uno farmacocinético, relacionado con el primero, desarrollado por Fagiolino y colaboradores en 1988.

Ambos se basan en la premisa de que las concentraciones plasmáticas de droga en arteria son mayores a las venosas mientras perdura el ingreso de una droga al organismo: luego de la administración oral, la droga absorbida ingresa en la sangre que fluye por el tracto gastrointestinal, hígado, corazón, circulación pulmonar y luego, vía aorta y otras arterias, se distribuye al resto del organismo. Entre los tejidos que irriga están las glándulas salivales, a las que llega sangre que sufrió muy poca capilarización (salvo en pulmón) y distribución de fármaco, por lo que va a tener una mayor concentración de principio activo. Si el equilibrio entre la fracción de droga libre (y por lo tanto, permeable) en sangre arterial y la droga en saliva se establece rápidamente, se observará un cociente S/P mayor durante el período de absorción.

Los experimentos con lidocaína en humanos llevados a cabo por Tucker y colaboradores (Tucker & Boas, 1971; Tucker & Mather, 1975) confirman lo anterior: la difusión capilar origina la disminución de las concentraciones de la droga en la vasculatura (Figura 6-2).

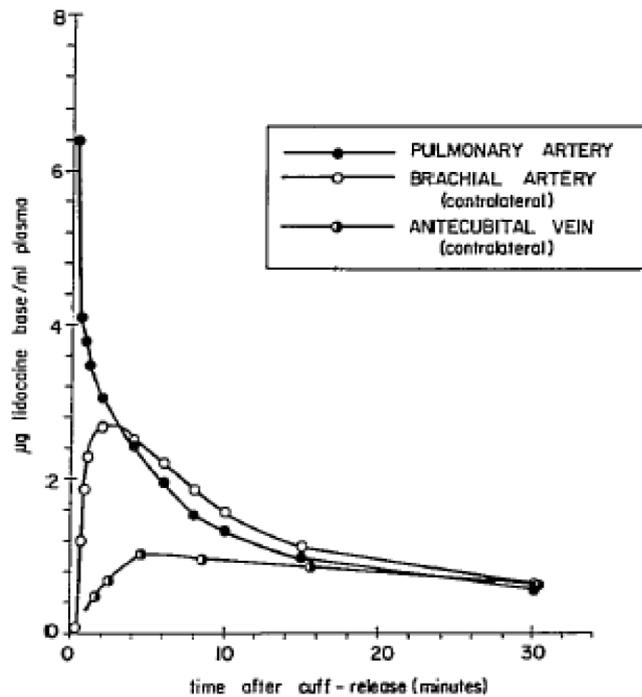


Figura 6-2. Niveles plasmáticos de lidocaína ( $\mu\text{g}$  lidocaína base/ml) en un voluntario luego del cese de administración (cuff-release) IV en uno de sus brazos de lidocaína HCl, 3 mg/kg, solución al 0.5% durante 45 minutos (Tucker & Boas, 1971). Pulmonary artery: arteria pulmonar. Brachial artery: arteria braquial (arteria del brazo contrario). Antecubital vein: vena ante-cubital (vena del brazo contrario)

En 1982, Lam & Chiou realizaron un experimento que consistía en inyectar procainamida por la vena yugular de conejos para determinar luego, y de forma simultánea, su concentración en la arteria carótida y la vena femoral (Lam & Chiou, 1982). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 6-3, donde se observa que corroboran lo anterior y van más allá: las concentraciones arteriales de droga son mayores a las venosas mientras continúa el ingreso de droga al organismo: en cada ciclo circulatorio, la sangre venosa realimenta a la arterial con fármaco, y ésta además recibe el aporte exógeno de fármaco.

Sin embargo, finalizada la administración de procainamida, cuando las concentraciones comienzan a decaer, la relación arteria-vena se invierte, ya que el retorno de droga desde el sistema venoso al sistema arterial se ve disminuido por la pérdida de sustancia en los órganos eliminadores. Es importante notar aquí que a pesar de las diferencias arteria-vena descritas, las ABC resultantes de la integración de ambas curvas son idénticas.

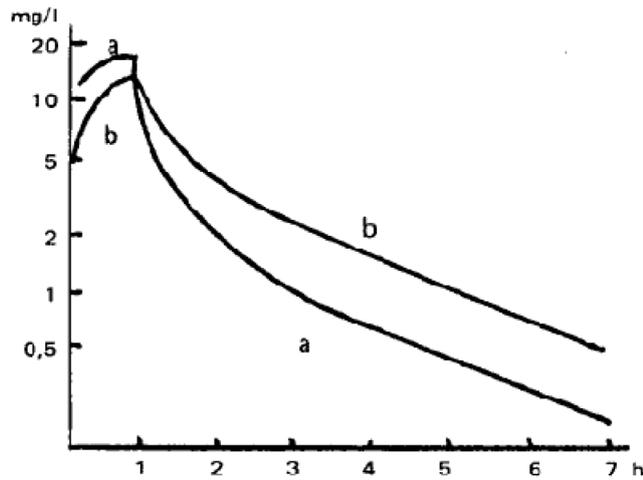


Figura 6-3. Niveles de procainamida (mg/L) en plasma de arteria (a) y vena (b), luego de la infusión de droga a 244 mg/h durante 54 minutos, en conejo (Fagiolino, 1999)

### Modelo físico (Posti, 1982)

En primer lugar el autor postuló el modelo anatómico-fisiológico (Figura 6-4), luego de lo cual planteó una reducción del mismo hasta un modelo físico consistente en un recipiente homogéneo de volumen  $V$  y una bomba de circulación que retira e ingresa líquido al recipiente.

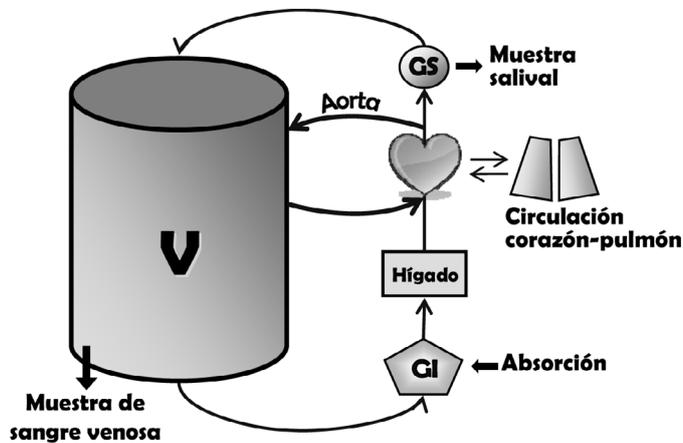
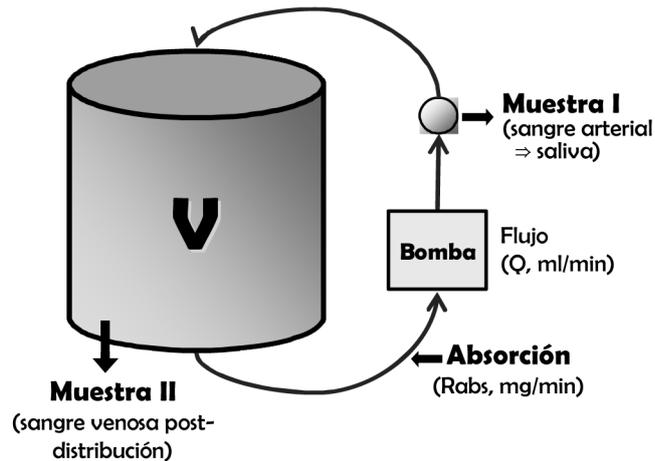


Figura 6-4. Esquema que representa la absorción y distribución en el organismo. Adaptado de Posti, 1982

El modelo físico simplificado (Figura 6-5) tiene un punto de ingreso de material externo (absorción, en la figura) y dos puntos de toma de muestra.



■ Figura 6-5. Esquema físico de absorción y recirculación. Adaptado de Posti, 1982

Condiciones del modelo:

- el volumen de fluido dentro de la bomba y el introducido con la droga son despreciables respecto al volumen del recipiente,  $V$ ;
- una sustancia es introducida desde el exterior al sistema a una velocidad  $R_{abs}$  (masa/tiempo). La bomba recircula el líquido con un caudal  $Q$  (volumen/tiempo);
- la concentración de la sustancia introducida es monitoreada en el punto de muestreo I (MI, a la salida de la bomba) y en el II (MII, dentro del recipiente homogéneo).

Durante la absorción, las concentraciones de la sustancia son:

$$C_{MI} = C_{in} + C_2$$

■ Ecuación 6-2

$$C_{MII} = C_2$$

■ Ecuación 6-3

Donde  $C_{in}$  es la concentración incorporada por el proceso de absorción al momento de muestreo y  $C_2$  es la concentración acumulativa en el recipiente. Es decir,

$$C_{in} = \frac{R_{abs}}{Q} = \frac{1}{Q} \cdot \frac{dA}{dt}$$

■ Ecuación 6-4

$$C_2 = \frac{\left( \int_0^t \frac{dA}{dt} \cdot dt \right)}{V} = \frac{A_{abs}}{V}$$

■ Ecuación 6-5

En las ecuaciones anteriores, A es la cantidad de droga en el recipiente y  $A_{abs}$  es la cantidad de droga introducida hasta el tiempo t. La dosis total ( $D_0$ ) introducida es:

$$D_0 = \int_0^T \frac{dA}{dt} dt$$

■ Ecuación 6-6

Donde T es la duración total del proceso de absorción. Se puede ver de las Ecuaciones 6-2 y 6-3 que la diferencia de concentraciones es:

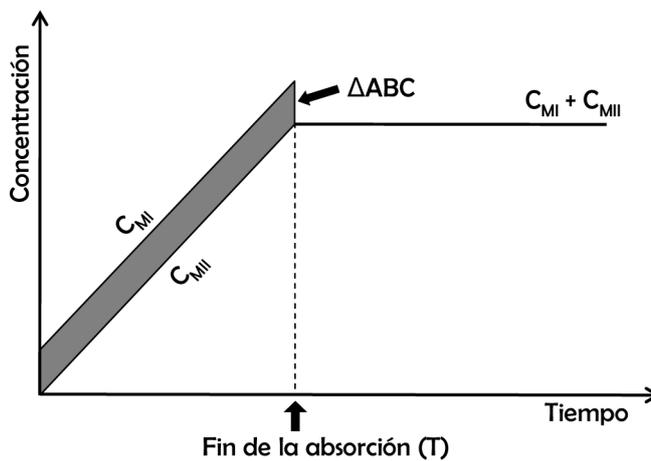
$$\Delta C = C_{MI} - C_{MII} = C_{in}$$

■ Ecuación 6-7

De las ecuaciones anteriores se ve que  $\Delta C$  solo depende de  $R_{abs}$  y de Q, y tiende a cero cuando Q tiende a infinito o cuando  $R_{abs}$  tiende a cero (ahí  $C_{MI} = C_{MII}$ ). La Figura 6-6 presenta las concentraciones en los distintos puntos del modelo físico descrito en función del tiempo. Cuando dichas curvas son integradas desde  $t = 0$  hasta  $t = T$ , el ABC para la MI es mayor que el área correspondiente para MII, en una cantidad definida por la siguiente expresión (área sombreada):

$$\Delta ABC_{(0,T)} = \int_0^T \Delta C \cdot dt$$

■ Ecuación 6-8



■ Figura 6-6. Concentraciones de las muestras I y II del modelo físico durante y después de una absorción a velocidad constante. Adaptado de Posti, 1982

Reemplazando las ecuaciones 4, 6 y 7 en la ecuación 8 se llega a:

$$\Delta ABC_{(0,T)} = \frac{1}{Q} \cdot \int_0^T \frac{dA}{dt} \cdot dt = \frac{D_0}{Q}$$

■ Ecuación 6-9

La Ecuación 6-9 indica que  $\Delta ABC$  en la Figura 6-6 es directamente proporcional a la dosis introducida e inversamente proporcional al flujo promedio  $Q$  durante la absorción. Esta ecuación también indica que esa diferencia de área es independiente de la velocidad de absorción, la cual puede ser constante (como en la figura) o variable.

Si la sustancia introducida es eliminada del sistema a una velocidad  $R_{el}$ , durante el pasaje a través de la bomba de circulación, antes del punto de muestreo  $MI$  (ese punto de eliminación podría ser el de absorción en el modelo físico de la Figura 6-5), entonces, a un tiempo dado, la diferencia de concentraciones será:

$$\Delta C = \frac{(R_{abs} - R_{el})}{Q}$$

■ Ecuación 6-10

Por consiguiente, el  $\Delta ABC = ABC_{MI} - ABC_{MI}$ , para cualquier período de  $t_1$  a  $t_2$ , puede ser calculado mediante la ecuación general:

$$\Delta ABC_{(t_1,t_2)} = \frac{A_{abs(t_1,t_2)} - A_{el(t_1,t_2)}}{Q}$$

■ Ecuación 6-11

Donde  $A_{abs}$  representa la cantidad de droga introducida desde el tiempo  $t_1$  al tiempo  $t_2$ , y  $A_{el}$  es la cantidad eliminada de droga en el mismo período. De acuerdo con la Ecuación 6-6 y la Ecuación 6-11, la diferencia de área desde cero a  $T$  es:

$$\Delta ABC_{(0,T)} = \frac{D_0 - A_{el(0,T)}}{Q}$$

■ Ecuación 6-12

Donde  $A_{el(0,T)}$  es la cantidad eliminada del sistema durante el proceso de absorción. La Ecuación 6-12 indica que la diferencia positiva de área generada desde 0 a  $T$  es directamente proporcional a la cantidad de sustancia presente en el sistema al tiempo  $T$ . Esta diferencia de área es compensada por otra igual, pero de signo negativo, durante el período que va de  $T$  (tiempo en el que finaliza la absorción) hasta infinito:

$$\Delta ABC_{(T,\infty)} = \frac{-[D_0 - A_{el(0,T)}]}{Q}$$

■ Ecuación 6-13

Dicho de otra manera, la diferencia de área desde tiempo cero hasta infinito es nula.

Las siguientes equivalencias biológicas pueden ser encontradas para el modelo físico presentado:

- el volumen  $V$  en la Figura 6-4 representa el volumen de distribución aparente de la droga en cuestión, y el plasma es considerado una parte de este compartimiento. Este volumen corresponde al del “recipiente homogéneo” de la Figura 6-5;
- la concentración de droga en sangre arterial,  $C_A$ , corresponde a  $C_{MI}$  en las ecuaciones anteriores y en la Figura 6-6. En este sentido, la sangre arterial debe entenderse como una mezcla de sangre venosa fluyendo desde diferentes tejidos y órganos, por lo que la concentración de droga en sangre arterial es una suma pesada de las concentraciones en sangre venosa fluyendo desde todos los órganos y tejidos, menos la posible concentración eliminada durante el pasaje por la circulación pulmonar;
- la concentración de droga en la sangre venosa pos-distribución desde un órgano no eliminador (extremidades, por ejemplo),  $C_V$ , corresponde a  $C_2$  o  $C_{MI}$  en las ecuaciones anteriores y en la Figura 6-6;
- la concentración de droga en sangre arterial debida al proceso de absorción a un tiempo dado,  $C_{in}$ , corresponde a  $C_{in}$  del modelo físico.

Aplicando estas equivalencias en las ecuaciones previamente descriptas, se llega a que:

$$\Delta C = C_A - C_V = C_{in} = \frac{R_{abs}}{Q} = \frac{1}{Q} \cdot \frac{dA}{dt}$$

■ Ecuación 6-14

Donde  $R_{abs}$  o  $dA/dt$  es la velocidad de absorción y  $Q$  representa el factor de dilución y distribución (volumen/tiempo) en el organismo. Fisiológicamente,  $Q$  es aproximadamente equivalente al input cardíaco total (alrededor de 5000 ml/min en el hombre). Esta ecuación sugiere que hay una diferencia de concentración entre la sangre arterial y la sangre venosa durante el proceso de absorción. En todo momento, esta diferencia es dependiente solamente de la velocidad de absorción  $R_{abs}$  y del factor de dilución. La dosis total ( $F \cdot D_0$ ) que ingresa al compartimiento vascular del organismo es:

$$F \cdot D_0 = \int_0^T \frac{dA}{dt} \cdot dt$$

■ Ecuación 6-15

Donde  $T$  es el tiempo que dura la absorción y  $F$  es la disponibilidad sistémica de la droga. Luego de una administración intravenosa,  $F$  es igual a 1, excepto que exista eliminación pulmonar.

Teniendo en cuenta el proceso de eliminación que sufre la droga de manera simultánea a la absorción, y por analogía con la Ecuación 6-12, se llega a que:

$$\Delta ABC_{(0,T)} = \frac{F \cdot D_0 - A_{el(0,T)}}{Q} = \frac{A_{(T)}}{Q}$$

■ Ecuación 6-16

Donde  $R_{el}$  es la velocidad de eliminación (masa/tiempo),  $A_{el(0,T)}$  es la cantidad total eliminada durante el intervalo de tiempo de 0 a T y  $A_{(T)}$  es la cantidad de droga en el organismo al tiempo T. Por último, las ecuaciones para el intervalo 0-infinito son:

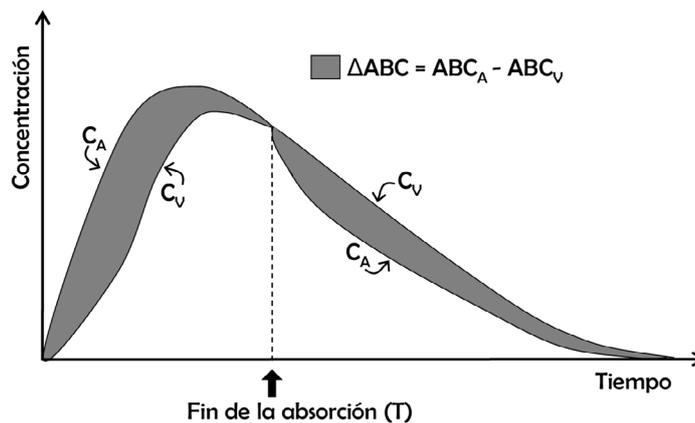
$$ABC_{A(0,\infty)} = ABC_{V(0,\infty)}$$

■ Ecuación 6-17

$$\Delta ABC_{(0,\infty)} = 0$$

■ Ecuación 6-18

Esta situación se ilustra esquemáticamente en la Figura 6-7.



■ Figura 6-7. Concentraciones de droga en sangre arterial y venosa durante y después de una absorción, esquemáticamente. Adaptado de Posti, 1982

Basándonos en la hipótesis presentada, se puede reemplazar la concentración arterial ( $C_A$ ) por la concentración de droga en saliva ( $C_{sal}$ ) en todas las ecuaciones a partir de la Ecuación 6-14. Sin embargo, antes de hacerlo la concentración de droga medida en saliva debe ser corregida por el cociente S/P (constante, en estado estacionario, donde  $R_{abs} = R_{el}$  y  $\Delta C = 0$ ).

$$C_{sal} = \frac{C_{sal}(\text{medida})}{S/P(\text{est.estac.})}$$

■ Ecuación 6-19

El cociente S/P en estado estacionario refleja las características de distribución de la droga entre plasma y saliva.

El modelo descrito hasta aquí explica por qué el cociente S/P aumenta durante la fase de absorción hasta llegar a un máximo, luego de lo cual decrece y se estabiliza en la fase de eliminación. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las ecuaciones derivadas sólo se aplican al modelo físico propuesto de absorción-recirculación, el cual corresponde al modelo farmacocinético típico de un compartimiento. Las verdaderas condiciones anatómico-fisiológicas pueden ser muy diferentes de esta situación hipotética. Las propiedades fisico-químicas de la droga determinan si la misma se distribuirá a la saliva y en qué proporción, al igual que el estado clínico y fisiológico de pacientes y/o voluntarios.

### Modelo Farmacocinético (Fagiolino et al., 1988)

El modelo compartimental propuesto (Figura 6-8) comparte con el anterior la hipótesis de que los solutos difunden a la saliva provenientes de la sangre arterial. El mismo incluye el sitio de absorción, desde donde la droga se absorbe (con una constante de velocidad  $K_a$ ), un compartimiento vascular desde la zona de absorción hasta la zona capilar que irriga las glándulas salivales (I en la figura), el resto de la vasculatura y tejidos bien perfundidos (compartimento 1 en la figura), un compartimiento periférico tisular al cual difunde la sustancia (2 en la figura) y el compartimiento salival representado con el número 3.

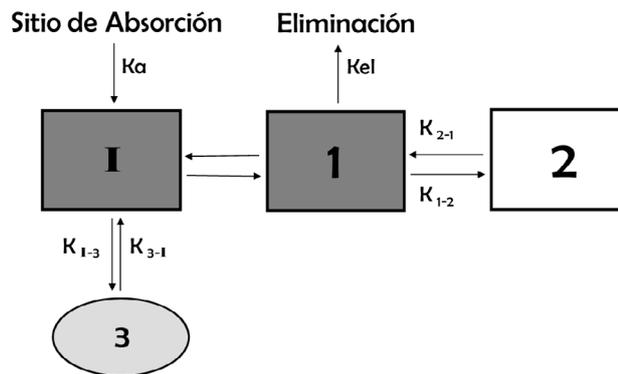


Figura 6-8. Modelo farmacocinético de absorción y distribución en saliva y resto del organismo. Adaptado de Fagiolino, 1990

Dado que el modelo consta de cinco compartimientos, considerando el que corresponde al sitio de absorción, las ecuaciones matemáticas que describen la evolución en el tiempo de las concentraciones de droga en cada compartimiento también tendrán cinco términos exponenciales. Por ejemplo, para los compartimentos 1 y 3:

$$C_1 = P_a \cdot e^{-k_a \cdot t} + P_1 \cdot e^{-L_1 \cdot t} + P_2 \cdot e^{-L_2 \cdot t} + P_3 \cdot e^{-L_3 \cdot t} + P_4 \cdot e^{-L_4 \cdot t}$$

■ Ecuación 6-20

$$C_3 = S_a \cdot e^{-k_a \cdot t} + S_1 \cdot e^{-L_1 \cdot t} + S_2 \cdot e^{-L_2 \cdot t} + S_3 \cdot e^{-L_3 \cdot t} + S_4 \cdot e^{-L_4 \cdot t}$$

■ Ecuación 6-21

En orden de introducir ciertas simplificaciones, se pueden hacer diversas consideraciones cinéticas en el balance de masa del sistema:

- el término exponencial en L1 tendrá muy poca significación en el tiempo, decayendo a cero en forma casi instantánea;
- el compartimento 1 no se ve afectado por la pérdida o ganancia de sustancia desde el compartimento 3 (saliva);
- por el contrario, analizado desde el compartimento 3 el intercambio mencionado sí es importante.

De esta manera, las Ecuaciones 6-20 y 6-21 pueden reescribirse de la siguiente forma:

$$C_1 = P_a \cdot e^{-k_a t} + P_3 \cdot e^{-L_3 t} + P_4 \cdot e^{-L_4 t}$$

■ Ecuación 6-22

$$C_3 = S_a \cdot e^{-k_a t} + S_2 \cdot e^{-L_2 t} + S_3 \cdot e^{-L_3 t} + S_4 \cdot e^{-L_4 t}$$

■ Ecuación 6-23

Al igual que la mayoría de las ecuaciones empleadas en farmacocinética, las expresiones anteriores se logran resolver mediante el método de las transformadas de Laplace. Dicha resolución escapa al objetivo del presente trabajo por lo que no será detallada aquí. El resultado que nos interesa en este análisis es que, si se realiza el cociente entre  $C_3$  y  $C_1$  ( $C_3/C_1$ ), el mismo es variable en el tiempo hasta alcanzar la fase L4 de eliminación, cuando se estabiliza en el valor constante:

$$\frac{C_3}{C_1} = \frac{k_{3-1} \cdot (J_2 - L_4) \cdot (J_1 - L_4) \cdot F}{k_{1-1} \cdot (k_{2-1} - L_4) \cdot (L_2 - L_4)}$$

■ Ecuación 6-24

Donde F es la fracción de droga libre en plasma,  $L_3$  y  $L_4$  son las constantes  $\alpha$  y  $\beta$  que aparecen en los desarrollos clásicos de farmacocinética y  $J_1$  y  $J_2$  son expresiones (también constantes) generadas a partir de las constantes de velocidad del modelo ( $k_{1-1}$ ,  $k_{1-2}$ ,  $k_{e1}$ , etc).

Sin embargo, existen situaciones que ninguno de estos dos modelos logran satisfacer como condiciones especiales fisiológicas (por ejemplo, la modificación de los flujos sanguíneos relativos, como sucede durante el ejercicio), fisiopatológicas y cronofisiológicas de la función cardiovascular. El propio autor de este modelo propuso posteriormente un modelo fisiológico-farmacocinético, adaptando el modelo farmacocinético clásico a la fisiología circulatoria. Mediante dicho modelo se logra que los cambios en los flujos sanguíneos se manifiesten en cambios farmacocinéticos de las drogas, que son reconocidos pero no contemplados por el modelo clásico (Fagiolino et al., 1996).

Sobre la base de lo discutido hasta aquí, resulta comprensible que la saliva sea más sensible al ingreso de fármaco que el plasma venoso. La gran dilución a nivel capilar, por difusión al intersticio, no permite detectar los pequeños cambios en la concentración plasmática venosa de la droga provenientes de la absorción. En cambio, el bajo

volumen del sistema circulatorio arterio-capilar detectará rápidamente una pequeña cantidad absorbida y, en consecuencia, durante la fase de absorción se observarán mayores concentraciones de droga en saliva (en el caso de drogas de rápido equilibrio saliva-plasma) que en vena, ya que la saliva es un intermedio entre arteria y vena.

De esta manera, en el caso de principios activos para los que la disolución es el factor limitante del proceso de absorción (drogas poco solubles y/o formas farmacéuticas de liberación controlada), es posible realizar un seguimiento del perfil de liberación del fármaco a partir de la forma farmacéutica mediante monitorización en saliva: cada pulso de absorción será detectado por un alto cociente S/P.

Por último, resta establecer la idoneidad de la saliva para la determinación de la biodisponibilidad relativa de dos medicamentos. Para ello, recordemos primero que bajo condiciones lineales el área total bajo la curva de concentraciones venosas vs. tiempo es directamente proporcional a la dosis disponible,  $F \cdot D_0$ . Por otro lado, a partir de la Ecuación 6-17 y de la hipótesis sangre arterial/saliva presentada por ambos modelos, se puede concluir que el  $ABC_{sal(0,\infty)}$  calculada a partir de las concentraciones salivales de droga también es directamente proporcional a la dosis disponible,  $F \cdot D_0$ . Por lo tanto, dicho valor de área puede ser empleado de manera equivalente al área de la curva de concentraciones venosas para determinar la biodisponibilidad relativa de distintas formulaciones de una droga. La concentración máxima en saliva, sin embargo, se obtendrá a un tiempo menor que la respectiva concentración máxima en sangre venosa.

En el presente capítulo se analizan los resultados previamente obtenidos de Fenitoína (Cap. 3) y Carbamazepina (Cap. 4) de manera de aportar a la discusión anterior y demostrar la veracidad de nuestra quinta y última hipótesis:

*La saliva es un fluido biológico apto y adecuado para su monitoreo en estudios de biodisponibilidad relativa (BDR) que, a diferencia de la sangre venosa comúnmente utilizada, refleja la fracción de droga libre farmacológicamente activa en el organismo.*

## Análisis de datos

### **6.1** Carbamazepina (CBZ)

En el presente análisis se compararon, mediante los datos de disolución in vitro, datos obtenidos in vivo en plasma y saliva. Los datos salivales son los resultantes del ensayo descrito en la sección 4.3, es decir, datos tomados en ocho voluntarios sanos, de ambos sexos, para cuatro productos diferentes de CBZ 200 mg. Por otro lado, los datos plasmáticos fueron obtenidos de la bibliografía: para ello se emplearon cuatro trabajos previamente publicados, todos consistentes en estudios de BDR de productos de CBZ de liberación inmediata, con plasma como fluido biológico, representando un total de 14 formulaciones ensayadas (Jung et al., 1997; Kovacevic et al., 2009; Meyer et al., 1992; Olling et al., 1999). Los datos se pudieron correlacionar adecuadamente mediante un dato común a todos: el porcentaje disuelto a los 30 minutos de todos los productos en las condiciones establecidas por la USP.

El objetivo fue, mediante el análisis de una correlación *in vitro/in vivo*, presentar nueva evidencia a favor del uso de saliva como fluido biológico en estudios de BDR. Esta es una metodología de trabajo que, además de ser original, evita repetir estudios en humanos que ya han sido realizados anteriormente, mediante el uso de datos publicados en lugar de nuevos resultados experimentales (World Medical Association, 2004). Esta metodología sería una primera aproximación al estudio de la capacidad de la saliva para reemplazar al plasma en los estudios de BDR de una droga determinada. Es un método rápido y sencillo para obtener evidencia a favor del uso de muestras salivales en este tipo de estudios, pero de ninguna manera es lo suficientemente robusto para resolver ese interrogante por sí solo.

La droga empleada, Carbamazepina (CBZ), cumple con los requisitos para ser monitoreada en saliva con niveles aceptables de variabilidad (Drobitch & Svensson, 1992; Pynnonen, 1977; Rosenthal et al., 1995) y, al mismo tiempo, se encuentra disponible mucha información bibliográfica acerca de su comportamiento biofarmacéutico, tanto *in vitro* como *in vivo*. También es una droga interesante para estudiar ya que en numerosas investigaciones se han establecido correlaciones saliva-plasma de CBZ, tanto en pacientes (MacKichan et al., 1981; Mennickent et al., 2007; Rosenthal et al., 1995; Rylance et al., 1977; Westenberg et al., 1977) como en voluntarios sanos (Dickinson et al., 1985; Paxton & Donald, 1980; Pynnonen, 1977).

### Datos bibliográficos

Luego de una exhaustiva búsqueda bibliográfica, se seleccionaron cuatro artículos que presentan estudios de BDR de comprimidos de CBZ de liberación inmediata, a la vez que incluyen estudios de disolución *in vitro* empleando LSNa 1% como medio de disolución. La Tabla 6-2 resume las características básicas de estos cuatro trabajos.

■ **Tabla 6-2.** Características principales de los estudios de BDR y de disolución *in vitro* presentados en las cuatro fuentes bibliográficas seleccionadas

	Meyer et al. (1992)	Jung et al. (1997)	Kovacevic et al. (2009)	Olling et al. (1999)
<b>Estudios de Biodisponibilidad Relativa - IN VIVO</b>				
Productos ensayados	4	4	2	4
Dosis administrada	200	400	400	400
Voluntarios	24	12	18	16
Edad (años)	21 – 35	20 – 30	29 – 37	20 – 38
Peso (kg)	61 – 93	60 – 80	70 – 81	49 – 88
<b>Estudios de Disolución - IN VITRO</b>				
Método	USP 31 <sup>a</sup>	USP 31 <sup>a</sup>	USP 31 <sup>a</sup>	USP 31 <sup>a</sup>
Unidades ensayadas	6	12	6	9

<sup>a</sup> Lauril Sulfato de Na 1%, 900 ml, Aparato 2 USP, 75 rpm, 37 ± 0.5°C (USP 31/NF 24, 2008)

Datos *in vivo*

Los datos obtenidos en saliva son los resultantes del ensayo descrito en la sección 4.3. La Tabla 6-3 resume los valores medios de los parámetros farmacocinéticos en saliva al tiempo que presenta los parámetros farmacocinéticos en plasma obtenidos de las fuentes bibliográficas citadas.

**Tabla 6-3.** Valores medios de los parámetros farmacocinéticos ( $\pm$  SD) obtenidos en saliva (experimental, ver sección 4.3) y plasma (bibliográficos). Tanto la denominación de los productos como las posiciones decimales son las usadas por los respectivos autores

<i>Datos en saliva</i>				
	Productos			
	A <sup>a</sup>	B	C	D
ABC <sub>0-84</sub> hs (mg.h/L)	27,61 $\pm$ 6,66	20,80 $\pm$ 7,77	28,49 $\pm$ 5,24	27,26 $\pm$ 5,91
ABC <sub>0-inf</sub> (mg.h/L)	35,76 $\pm$ 10,27	26,23 $\pm$ 9,89	39,34 $\pm$ 15,14	34,38 $\pm$ 8,94
Cmax (mg/L)	0,68 $\pm$ 0,18	0,50 $\pm$ 0,22	0,97 $\pm$ 0,21	0,90 $\pm$ 0,18
Tmax (h)	6,8 $\pm$ 2,8	9,3 $\pm$ 6,8	4,1 $\pm$ 1,8	5,7 $\pm$ 1,9
Ke (h <sup>-1</sup> )	0,020 $\pm$ 0,005	0,022 $\pm$ 0,005	0,021 $\pm$ 0,008	0,024 $\pm$ 0,007
<i>Datos plasmáticos</i>				
	Productos			
	1 (N = 24) <sup>b</sup>	2 (N = 24)	3 (N = 23)	4 (N = 23)
Meyer <i>et al.</i> (1992)				
ABC <sub>0-169</sub> hs (mg.h/L)	134,8 $\pm$ 20,2	80,9 $\pm$ 38,8	154,2 $\pm$ 27,8	104,5 $\pm$ 31,4
ABC <sub>0-inf</sub> (mg.h/L)	143,5 $\pm$ 21,5	86,5 $\pm$ 40,6	162,2 $\pm$ 32,4	111,7 $\pm$ 32,4
Cmax (mg/L)	1,89 $\pm$ 0,38	1,15 $\pm$ 0,71	2,69 $\pm$ 0,48	1,40 $\pm$ 0,55
Tmax (h)	15,9 $\pm$ 8,1	13,6 $\pm$ 10,1	8,3 $\pm$ 6,0	19,6 $\pm$ 15,3
Jung <i>et al.</i> (1997)	K (N = 12) <sup>c</sup>	C (N = 12)	J (N = 12)	A (N = 12)
ABC <sub>0-120</sub> hs (mg.h/L)	296,0 $\pm$ 30,7	316,0 $\pm$ 27,7	368,0 $\pm$ 25,5	331,0 $\pm$ 25,7
ABC <sub>0-inf</sub> (mg.h/L)	NI	NI	NI	NI
Cmax (mg/L)	4,24 $\pm$ 0,92	4,81 $\pm$ 1,04	5,98 $\pm$ 0,57	5,98 $\pm$ 0,83
Tmax (h)	15,8 $\pm$ 7,3	14,6 $\pm$ 9,1	8,6 $\pm$ 6,1	8,5 $\pm$ 5,9
Kovacevic <i>et al.</i> (2009)	Referencia <sup>a</sup> (N = 18)	Test (N = 18)		
ABC <sub>0-144</sub> hs (mg.h/L)	211,37 $\pm$ 52,97	220,42 $\pm$ 55,94		
ABC <sub>0-inf</sub> (mg.h/L)	259,15 $\pm$ 63,97	259,03 $\pm$ 69,02		
Cmax (mg/L)	4,34 $\pm$ 1,24	4,74 $\pm$ 1,27		
Tmax (h)	9,7 $\pm$ 4,5	8,6 $\pm$ 2,8		
Olling <i>et al.</i> (1999)	D (N = 16) <sup>c</sup>	B (N = 16)	C (N = 16)	A (N = 16)
ABC <sub>0-96</sub> hs (mg.h/L)	249 $\pm$ 61	253 $\pm$ 73	253 $\pm$ 53	198 $\pm$ 48
ABC <sub>0-inf</sub> (mg.h/L)	295 $\pm$ 59	294 $\pm$ 84	292 $\pm$ 69	246 $\pm$ 61
Cmax (mg/L)	4,5 $\pm$ 0,8	5,9 $\pm$ 1,6	6,1 $\pm$ 1,6	3,2 $\pm$ 1,0
Tmax (h)	11,0 $\pm$ 5,2	5,6 $\pm$ 5,9	3,6 $\pm$ 4,1	16,0 $\pm$ 6,5

NI: No informado en el artículo original

<sup>a</sup>Producto de referencia, Tegretol 200 mg, Novartis

<sup>b</sup>Producto de referencia, Tegretol 200 mg, Geigy Pharmaceuticals

<sup>c</sup>Producto de referencia, Tegretol 200 mg, Ciba Geigy

### Datos *in vitro*

Los datos *in vitro* correspondientes a los productos ensayados en saliva también fueron presentados previamente, en la sección 2.1. De todas maneras, la Figura 6-9 muestra nuevamente los perfiles superpuestos de los cuatro productos de CBZ 200 mg ensayados en LSNa 1% (N = 12).

Los perfiles de liberación *in vitro* de los productos de CBZ ensayados en plasma se pueden encontrar en los trabajos correspondientes. Sin embargo, vale la pena destacar aquí que el porcentaje medio disuelto a los 30 minutos para el producto de referencia (Tegretol en todos los casos) fue muy similar entre todos los artículos citados entre sí y respecto al valor obtenido en este trabajo. Los cinco valores estuvieron dentro del rango 68-72%, con una media ( $\pm$  SD) de 70% ( $\pm$  1,2).

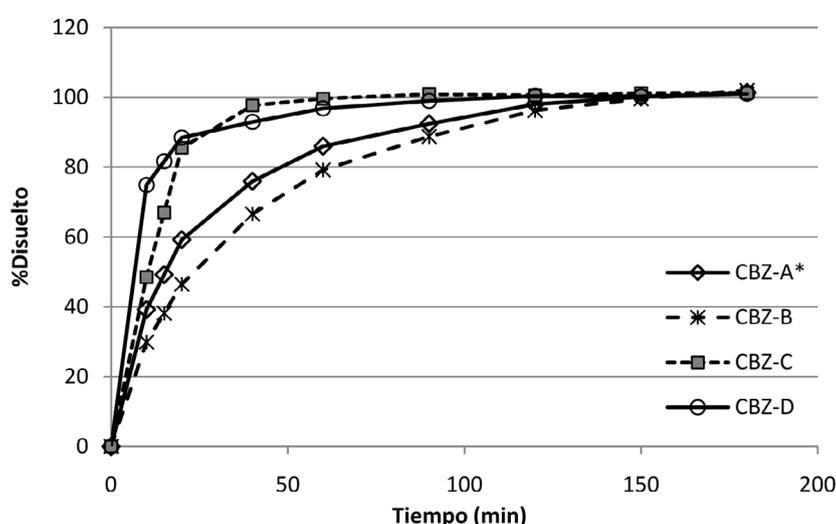


Figura 6-9. Perfiles de disolución (N = 12) en Lauril Sulfato de Sodio 1% de los cuatro productos de CBZ 200 mg, comprimidos de liberación inmediata, ensayados en saliva (ver secciones 2.1 y 4.3). El asterisco denota al producto de referencia (Tegretol, Novartis)

### Correlaciones *in vitro/in vivo*

Los principales parámetros farmacocinéticos promedio ( $T_{max}$ ,  $C_{max}$  y  $ABC_{0-t}$ ) obtenidos en los estudios de BDR usando plasma como fluido monitoreado (Jung et al., 1997; Kovacevic et al., 2009; Meyer et al., 1992; Olling et al., 1999) como así también los obtenidos en este trabajo, donde la saliva fue el fluido biológico, fueron correlacionados con el porcentaje de CBZ disuelto a los 30 minutos. Este tiempo fue elegido para las correlaciones ya que era el único tiempo de muestreo que todos los trabajos presentaban en común.

Antes de realizar las correlaciones, los valores de  $C_{max}$  y  $ABC_{0-t}$  fueron normalizados dividiéndolos por el valor correspondiente al producto de referencia, Tegretol (Test/Ref). De esa manera se logró volver consistentes todos los datos bibliográficos de plasma con los datos salivales aquí obtenidos, ya que se trata de dos fluidos biológicos donde se esperan diferentes valores para  $C_{max}$  y  $ABC_{0-t}$  (ya que el cociente S/P para esta droga difiere de la unidad) [Ecuación 6-19].

Esta normalización también se hizo porque la dosis recibida por los voluntarios en cada estudio no siempre fue la misma. Para las correlaciones se usó  $ABC_{0-t}$  y no  $AB_{CO-inf}$  ya que este último, a diferencia del primero, no fue informado en todos los trabajos (Tabla 6-3). En el caso de Tmax no se realizó ninguna normalización ya que el tiempo para alcanzar Cmax es extremadamente dependiente del esquema de muestreo.

En todos los casos, el punto correspondiente al producto de referencia, para el cual  $C_{max} \text{ Test}/C_{max} \text{ Ref} = 1$  y  $ABC_{0-t} \text{ Test}/ABC_{0-t} \text{ Ref} = 1$  como valor de  $y$  (eje de ordenadas) fue incluido en las correlaciones de Cmax y  $ABC_{0-t}$  respectivamente, con el % Disuelto medio a los 30 min obtenido para todos los productos de referencia (70%) como valor de  $x$  (eje de abscisas). La Tabla 6-4 muestra las correlaciones resultantes, tanto las obtenidas con datos plasmáticos como las correspondientes a datos salivales (por separado).

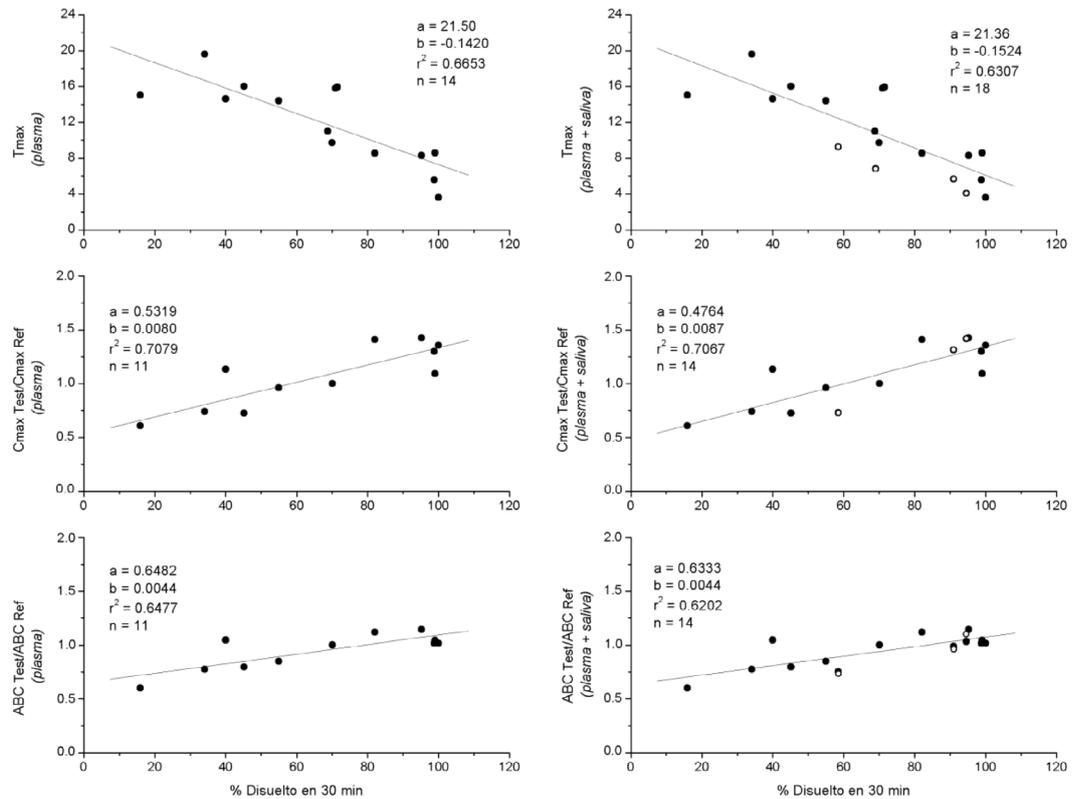
**Tabla 6-4.** Correlaciones lineales entre cada parámetro farmacocinético (Tmax, Cmax y  $ABC_{0-t}$ ) vs. % Disuelto en 30 min, empleando los datos plasmáticos -bibliográficos- y los datos experimentales de saliva. La correlación de Tmax es directa, mientras que los otros dos parámetros fueron previamente normalizados por el valor obtenido para el producto de referencia, Tegretol ( $C_{max} \text{ Test}/C_{max} \text{ Ref}$  y  $ABC_{0-t} \text{ Test}/ABC_{0-t} \text{ Ref}$ )

	Plasma (N = 14 para Tmax, N = 11 para Cmax y ABC)	Saliva (N = 4)
<b>Tmax vs. % Disuelto en 30 min</b>		
Pendiente (b) ± 95% IC	-0,1420 ± 0,0633	-0,1187 ± 0,1253
Ordenada (a) ± 95% IC	21,50 ± 4,58	15,74 ± 9,98
$R^2$	0,6653	0,8925
<b>Cmax Test/ Cmax Ref vs. % Disuelto en 30 min</b>		
Pendiente (b) ± 95% IC	0,0080 ± 0,0039	0,0179 ± 0,0069
Ordenada (a) ± 95% IC	0,5319 ± 0,2830	-0,2822 ± 0,5452
$R^2$	0,7079	0,9843
<b>ABC Test/ ABC Ref vs. % Disuelto en 30 min</b>		
Pendiente (b) ± 95% IC	0,0044 ± 0,0025	0,0058 ± 0,0139
Ordenada (a) ± 95% IC	0,6482 ± 0,1804	0,4901 ± 1,1064
$R^2$	0,6476	0,6167

Una vez obtenidos los tres pares de rectas (para cada parámetro, en cada fluido) se realizó a cada par una prueba estadística para verificar su semejanza: ensayo de coincidencia de dos líneas rectas, *Coincidence of two general straight lines* (Green & Margerison, 1978). Dicho test estadístico permite decidir, con un determinado nivel de confianza, si dos conjuntos de datos (plasma y saliva, en nuestro caso) pueden ser asociados a la misma recta. Como hipótesis nula ( $H_0$ ) se asume que las dos pendientes y las dos ordenadas no presentan diferencias significativas. Para los tres parámetros ensayados, no se pudo rechazar  $H_0$  ( $p > 0,05$ ).

Por lo tanto, se establecieron tres nuevas correlaciones: 1) Tmax; 2)  $C_{max} \text{ Test}/C_{max} \text{ Ref}$  y 3)  $ABC_{0-t} \text{ Test}/ABC_{0-t} \text{ Ref}$ ; vs. % Disuelto en 30 min, pero en esta ocasión utilizando tanto los datos plasmáticos como salivales en la misma recta. La Figura

6-10 muestra las correlaciones obtenidas tanto cuando se consideraron solamente los datos plasmáticos (rectas a la izquierda de la figura, correspondientes a los datos de la primer columna en la Tabla 6-4) como con los datos saliva/plasma combinados (rectas a la derecha).



**Figura 6-10.** Correlaciones entre los parámetros farmacocinéticos y %Disuelto en 30 min. Los gráficos del lado izquierdo incluyen solamente datos plasmáticos (círculos cerrados) mientras que los de la derecha incluyen también los datos en saliva (círculos abiertos representan a los puntos salivales)

Resulta interesante analizar la variabilidad de los datos obtenidos, ya que suele adjudicarse una mayor dispersión a los datos salivales. En este caso, la Tabla 6-5 muestra que los rangos de coeficientes de variación (%CV) obtenidos en saliva son similares a los de plasma para cada parámetro farmacocinético. La tercera columna de la tabla presenta los %CV obtenidos en un estudio de BDR de comprimidos de CBZ 400 mg, también realizado en saliva (Vázquez et al., 1993).

Tabla 6-5. Rangos obtenidos para los coeficientes de variación (%CV) de los parámetros farmacocinéticos estudiados tanto en saliva como en plasma

	Rango de %CV en saliva obtenidos en este trabajo (4 productos)	Rango de %CV en plasma (Jung et al., 1997; Kovacevic et al., 2009; Meyer et al., 1992; Olling et al., 1999) (14 productos)	Rango de %CV en saliva (Vázquez et al., 1993) (2 productos)
ABC <sub>0-t</sub> (mg.h/L)	18,4 – 37,4	6,9 – 48,0	22,2 – 33,4
ABC <sub>0-inf</sub> (mg.h/L)	26,0 – 38,5	15,0 – 46,9 <sup>a</sup>	NI
C <sub>max</sub> (mg/L)	20,0 – 44,0	9,5 – 61,7	31,9 – 43,6
T <sub>max</sub> (h)	33,3 – 73,1	32,6 – 113,9	55,8 – 90,0

<sup>a</sup> El rango incluye solo 10 productos ya que el parámetro no fue reportado por uno de los autores  
 NI: No informado en el artículo original

A partir de las correlaciones mostradas en la Figura 6-10 se puede concluir que en estudios de BDR la saliva resulta equiparable al plasma, ya que los datos salivales obtenidos en el estudio de la sección 4.3 pudieron ser combinados con los datos plasmáticos encontrados en una única regresión lineal. Dicho de otra manera, no se pudo encontrar evidencia suficiente para afirmar que ambos juegos de datos (saliva-plasma) puedan considerarse diferentes, con un nivel de significación de 0,05. Por lo tanto, T<sub>max</sub>, C<sub>max</sub> y ABC<sub>0-t</sub> se correlacionan de la misma manera con los datos *in vitro*, independientemente de si fueron calculados con datos plasmáticos, salivales o con ambos combinados.

En el caso de C<sub>max</sub> y ABC<sub>0-t</sub>, el sesgo de la saliva se elimina al estandarizar los datos respecto de la formulación de referencia, y se obtiene de esa manera una distribución al azar de los puntos correspondientes a la saliva a lo largo de la recta de regresión (Figura 6-10). El caso de T<sub>max</sub> es diferente, porque si bien las varianzas obtenidas para plasma y saliva permiten –estadísticamente– agrupar a los datos en una única correlación, puede verse en la Figura 6-10 que todos los puntos correspondientes a saliva se ubican por debajo de la recta de regresión resultante.

Esto confirma el modelo anatómico-fisiológico presentado al inicio de este capítulo, según el cual las concentraciones salivales se equilibran instantáneamente con las arteriales en los capilares sanguíneos, produciendo de esa manera mayores valores que los que suelen medirse en sangre venosa (Fagiolino, 1999; Posti, 1982). Esto no solo explica el mayor cociente S/P que suele encontrarse durante la fase de absorción, sino también por qué se obtienen menores valores de T<sub>max</sub> cuando se trabaja con saliva.

Cabe destacar respecto a la Figura 6-10 que, en el gráfico correspondiente a T<sub>max</sub> vs. % Disuelto en 30 min, el punto con el menor valor de x (% Disuelto en 30 min = 15.9%) fue extraído del trabajo de Meyer y colaboradores, y los mismos autores declaran en el artículo original que dicho punto posiblemente sea un outlier (Meyer et al., 1992).

Otro hecho experimental interesante que refleja lo que sucede durante la fase de absorción está dado por los mayores valores del cociente S/P que se obtienen trabajando con C<sub>max</sub> en comparación con los que se obtienen si se usa el parámetro ABC<sub>0-inf</sub> para los cálculos. Como se observa en la Tabla 6-6, empleando sólo los resultados corres-

pondientes al producto de referencia y calculando los cocientes entre  $ABC_{0-inf}$  en saliva respecto al mismo parámetro en plasma (normalizados por la dosis si fuera necesario), se obtuvo un valor medio  $\pm$  SD de  $0,257 \pm 0,021$ , el que representa una buena estimación del valor para el cociente S/P = 0,250 esperado para CBZ (*Clarke's analysis of drugs and poisons*, 2004). Sin embargo, cuando dicho cálculo se repite con el parámetro  $C_{max}$  el valor obtenido es  $0,324 \pm 0,025$ .

**Tabla 6-6.** Cocientes S/P de los parámetros  $ABC_{0-inf}$  y  $C_{max}$  para el producto de referencia (el valor obtenido para Tegretol en la sección 4.3 dividido por el valor correspondiente en los artículos citados, para  $ABC_{0-inf}$  o  $C_{max}$  respectivamente)

	Cocientes S/P para el producto de referencia	
	$ABC_{0-inf}$	$C_{max}$
Meyer <i>et al.</i> (1992)	0,249	0,360
Jung <i>et al.</i> (1997)	NI	0,321 <sup>a</sup>
Kovacevic <i>et al.</i> (2009)	0,276 <sup>a</sup>	0,313 <sup>a</sup>
Olling <i>et al.</i> (1999)	0,242 <sup>a</sup>	0,302 <sup>a</sup>
<i>Media</i>	<b>0,257</b>	<b>0,324</b>
<i>SD</i>	0,021	0,025

NI: No informado en el artículo original

<sup>a</sup> Fue necesario normalizar por la dosis

Queda claro que la evidencia presentada hasta aquí a favor del uso de saliva en estudios de BDR es dependiente de los resultados del estudio de disolución *in vitro*, ya que dichos valores son los que permitieron establecer la correlación saliva-plasma presentada. Sin embargo, numerosos estudios apoyan la validez de este enfoque: excelentes correlaciones *in vivo/in vitro* (IVIVC) se han encontrado para CBZ, tanto entre parámetros *in vivo* con *in vitro* (nivel C) (Jung *et al.*, 1997; Lake *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 1992) como incluso correlaciones de nivel A, es decir, punto a punto (Kovacevic *et al.*, 2009; Sathe *et al.*, 1997; Veng-Pedersen *et al.*, 2000). Más aún, dichas correlaciones nivel A fueron establecidas usando el mismo medio y condiciones de disolución que las aquí presentadas, y han sido la base de propuestas para considerar a la CBZ como posible candidata para una bioexención (Kovacevic *et al.*, 2009), a pesar de la falta de acuerdo acerca de la posibilidad de bioexenciones para drogas pertenecientes a otras clases distintas de la clase I del BCS (alta solubilidad, alta permeabilidad) como la CBZ, clase II (Lindenberg *et al.*, 2004).

Si bien serán necesarios más estudios antes de que la saliva sea ampliamente aceptada como fluido biológico de monitoreo, el trabajo aquí presentado es un paso en esa dirección y, no menos importante, una aproximación bioética a la cuestión. Se ha obtenido una correlación relevante entre datos de CBZ medidos en saliva con datos medidos en plasma, a pesar de ser éstos últimos obtenidos de la literatura. Y, lógicamente, la correlación mejora cuando se utilizan datos experimentales obtenidos de manera simultánea (MacKichan *et al.*, 1981; Paxton & Donald, 1980; Pynnonen, 1977; Rosenthal *et al.*, 1995; Rylance *et al.*, 1977; Westenberg *et al.*, 1977). Por lo tanto, si

en presencia de tantas posibles fuentes de variación se encuentra una correlación estadísticamente significativa, son grandes las probabilidades de que dicha correlación sea aún mejor cuando se empleen datos experimentales, libres de tanta variabilidad.

## 6.2 Fenitoína (PHT)

En el caso de los datos salivales presentados en el Capítulo 3, no es posible la aplicación de la metodología descrita en la sección 6.1 para CBZ, ya que no se cuenta con el denominador común de los datos de disolución *in vitro*. Por lo tanto, sólo se realizó una comparación cualitativa entre los datos salivales obtenidos y datos plasmáticos, que al igual que para CBZ se obtuvieron de fuentes bibliográficas.

Para esto, se seleccionaron dos trabajos: un estudio realizado por Melikian y colaboradores, que presenta valores de los parámetros farmacocinéticos de PHT en plasma calculados luego de realizar un estudio de BDR con 11 productos comerciales de cápsulas conteniendo PHT 100 mg en voluntarios sanos (Melikian et al., 1977), y otro estudio de Schumaker y Metzler, en el que se realiza una BEI siguiendo un diseño 4x2, en 26 voluntarios sanos y con dos suspensiones de PHT 125 mg (Schumaker & Metzler, 1998). Debido a la diferencia de dosis, los resultados de este estudio se normalizaron a 100 mg para poder realizar comparaciones (en la zona de concentraciones obtenidas el comportamiento farmacocinético de la PHT puede asumirse lineal).

La Tabla 6-7 resume algunos de los principales resultados de dichos estudios, junto con algunos de los datos salivales obtenidos en el presente trabajo.

**Tabla 6-7.** Parámetros farmacocinéticos de PHT. Las primeras filas corresponden al estudio de BDR que Melikian y col. realizaron sobre 11 formulaciones de cápsulas conteniendo PHT 100 mg en plasma de voluntarios sanos (datos promedio de 6 voluntarios y la SD entre paréntesis) (Melikian et al., 1977). A continuación se presentan los datos de otro estudio de BDR en plasma realizado por Schumaker y Metzler, en el que se analizaron dos suspensiones de PHT en 26 voluntarios (con administraciones replicadas) [Schumaker y Metzler, 1998]. Por último se incluyeron los datos salivales ya presentados en la sección 3.2 (promedio de 24 voluntarios)

Producto	Tmax (h)	Cmax (mg/L)	ABC <sub>0-t</sub>
<i>Datos plasmáticos (Melikian et al., 1977)</i>			
1	5,2 (0,9)	1,11 (0,15)	32,61 (4,97)
2	5,7 (1,1)	0,93 (0,11)	30,08 (4,80)
3	3,7 (0,9)	1,33 (0,08)	35,73 (4,41)
4	3,4 (0,7)	1,32 (0,17)	35,79 (6,60)
5	4,4 (0,6)	1,40 (0,10)	34,39 (2,23)
6	4,1 (0,6)	1,27 (0,09)	32,85 (4,74)
7	2,7 (0,6)	1,21 (0,09)	30,84 (3,27)
8	3,4 (0,4)	1,39 (0,11)	38,28 (2,95)
9	2,6 (0,5)	1,44 (0,14)	32,89 (3,43)
10	3,5 (0,5)	1,32 (0,12)	35,61 (2,84)
11	6,0 (1,1)	1,06 (0,09)	34,23 (3,29)

<b>Datos plasmáticos (Schumaker &amp; Metzler, 1998)*</b>			
<i>Ref 1</i>	NI	1,60 (0,40)	44,57 (18,52)
<i>Ref 2</i>	NI	1,56 (0,35)	44,43 (15,47)
<i>Test 1</i>	NI	1,66 (0,43)	44,07 (16,68)
<i>Test 2</i>	NI	1,75 (0,41)	44,02 (16,86)
<b>Datos salivales (ver sección 3.2)</b>			
<i>Prod-F<sub>1</sub></i>	4,73 (1,67)	0,206 (0,026)	3,68 (0,60)
<i>Prod-F<sub>2</sub></i>	3,79 (0,72)	0,204 (0,022)	3,78 (0,72)
<i>Prod-G<sub>1</sub></i>	3,94 (1,45)	0,209 (0,026)	3,81 (0,73)
<i>Prod-G<sub>2</sub></i>	3,92 (1,23)	0,210 (0,028)	3,66 (0,67)

\* Los datos originales corresponden a dos suspensiones conteniendo 125 mg de PHT, por lo que los valores de C<sub>max</sub> y ABC fueron normalizados a 100 mg

NI: no informado en el trabajo original

En primer lugar, se observa que los valores de variabilidad obtenidos en saliva son del orden (o a veces menores) de los correspondientes al plasma. La Tabla 6-8 presenta los coeficientes de variación de los parámetros C<sub>max</sub> y ABC<sub>0-t</sub> en plasma y saliva, de manera de poder evaluarlos comparativamente. Otra prueba de la baja variabilidad de los datos salivales fue que, si recordamos los resultados de PHT en la sección 3.2, el parámetro C<sub>max</sub> cumplió con el criterio de BE en todos los casos (BEI y BEM), a pesar de que el ANAVA realizado había encontrado diferencias significativas entre las C<sub>max</sub> de las dos formulaciones estudiadas.

**Tabla 6-8.** Coeficientes de Variación (media y rango entre corchetes) de los parámetros C<sub>max</sub> y ABC<sub>0-t</sub> calculados con datos plasmáticos obtenidos de dos fuentes bibliográficas y con datos salivales experimentales (sección 3.2)

	<b>Datos plasmáticos</b> (Melikian et al., 1977)	<b>Datos plasmáticos</b> (Schumaker & Metzler, 1998)	<b>Datos Salivales</b> (experimentales, sección 3.2)
<b>CV de C<sub>max</sub></b>	9,19 [6,02 - 13,51]	19,31 [17,96 - 20,50]	12,25 [11,02 - 13,15]
<b>CV de ABC<sub>0-t</sub></b>	10,91 [6,04 - 18,44]	30,50 [27,86 - 33,24]	18,26 [16,35 - 19,17]

Por otro lado, si se calculan los cocientes entre los valores salivales y plasmáticos (S/P) de los parámetros farmacocinéticos presentados en la Tabla 6-7, se obtienen los valores que se muestran en la Tabla 6-9. Si se observan los datos de la primera columna, correspondientes a los datos plasmáticos tomados del estudio de Melikian y colaboradores, se ve que cuando el cálculo del cociente S/P se realiza con el parámetro ABC<sub>0-t</sub>, el valor obtenido es una buena estimación del valor teórico esperado S/P = 0,10 para PHT (Goodman & Gilman, 2006; Clarke's analysis of drugs and poisons, 2004). Sin embargo, cuando dicho cálculo se repite pero con el parámetro C<sub>max</sub> el valor obtenido es mayor. Considerando ahora la segunda columna, se observa que la tendencia

es la misma, si bien los cocientes obtenidos son menores para ambos parámetros. No debemos olvidar que los datos plasmáticos de dicha columna corresponden al estudio de Schumaker y Metzler, realizado con suspensiones de 125 mg de PHT.

**Tabla 6-9.** Cocientes saliva/plasma (S/P) calculados con los datos previamente presentados en la Tabla 6-7, para  $C_{max}$  y  $ABC_{0-t}$ . Los valores informados son el promedio  $\pm$  SD (el rango entre corchetes) obtenido al hacer los cocientes entre todas las formulaciones

	<i>S/P</i> (datos plasmáticos de <i>Melikian et al., 1977</i> )	<i>S/P</i> (datos plasmáticos de <i>Schumaker &amp; Metzler, 1998</i> )
<b><math>C_{max}</math></b>	0,168 $\pm$ 0,023 [0,141 – 0,226]	0,126 $\pm$ 0,006 [0,116 – 0,135]
<b><math>ABC_{0-t}</math></b>	0,110 $\pm$ 0,008 [0,096 – 0,127]	0,084 $\pm$ 0,002 [0,082 – 0,091]

## Conclusiones parciales

Numerosos autores han resaltado la utilidad e idoneidad de la saliva como fluido biológico en aplicaciones tan diversas como el monitoreo terapéutico (Drobitch & Svensson, 1992; Hofman, 2001), los estudios farmacocinéticos y/o de BDR (Ritschel & Tompson, 1983), en la ciencia forense y hasta como un medio donde detectar sustancias ilegales (Aps & Martens, 2005; Kaufman & Lamster, 2002). De particular interés ha sido últimamente la aplicación del monitoreo en saliva de sustancias endógenas, como hormonas esteroideas y peptídicas, anticuerpos e incluso marcadores de la inflamación o de procesos tumorales (Groschl et al., 2008). Sin embargo, este fluido continúa sin lograr la total aceptación por parte de la comunidad científica, principalmente en cuanto a su aplicación en estudios de BDR.

La mayoría de las drogas ingresa a la saliva por difusión pasiva. Cuando se trabaja con voluntarios sanos o pacientes para quienes puede asumirse una función fisiológica normal de la cavidad oral, las variables que influyen sobre ese tipo de transporte son el pH, pKa, lipofilia, carga, peso molecular y la configuración espacial, los niveles de droga libre circulando por el plasma, la dosis y el clearance de la droga, el flujo de saliva y la concentración de proteínas y enzimas en saliva, capaces de unir o metabolizar a la droga (Aps & Martens, 2005; Rasmussen, 1964; Vining & McGinley, 1986).

Son candidatas para su determinación en saliva todas aquellas drogas que sean no-ionizables o que al menos se encuentren sin ionizar dentro del rango de pH salival, como PHT y CBZ (entre muchas otras). Ambas drogas pertenecen al grupo de drogas neutras lipofílicas, y por lo tanto su solubilidad en un medio lipídico es posiblemente el factor determinante de su capacidad para difundir a la saliva, siendo el pH un factor de menor importancia (Faigle et al., 1976; Pynnonen, 1977). Y la relevancia del pH disminuye aún más si recordamos que, como se mencionó al inicio del presente capítulo, el flujo salival es el único factor determinante de los cambios de pH observados en saliva (Drobitch & Svensson, 1992). Se ha demostrado que CBZ no es afectada por los cambios en el flujo de la saliva (McAuliffe et al., 1977; Rosenthal et al., 1995).

Respecto de la unión a proteínas, puede considerarse despreciable su efecto en saliva, ya que normalmente no se encuentra unión de drogas a proteínas salivales (Ritschel & Tompson, 1983). Sin embargo, diferencias en la tasa de unión a proteínas plasmáticas pueden resultar en un aumento tanto de la variabilidad inter como intra-individual de un estudio de BDR. La concentración total de droga en plasma es más sensible que la concentración libre (y, por lo tanto, la salival) a los cambios en la unión a proteínas (Fagiolino, 1999; MacKichan et al., 1981). De todas maneras, el diseño cruzado clásico de la bioequivalencia presenta la ventaja de permitir que cada sujeto incluido en el estudio actúe como su propio control, y de esa forma se disminuye considerablemente la variabilidad inter individual (Zapater & Horga, 1999), que suele ser considerablemente mayor a la intra individual para la mayoría de las drogas. Más aún, Miles y colaboradores han estudiado la variabilidad intra individual de las concentraciones salivales de CBZ, PHT y Fenobarbital en voluntarios sanos, concluyendo que no era clínicamente significativa (Miles et al., 1991). Nuestros resultados apoyan esto en contraposición a la creencia usual de la mayor dispersión esperada en saliva: tanto en el caso de PHT como de CBZ las variabilidades encontradas fueron del orden (o incluso menores) a las reportadas con datos plasmáticos.

Otro inconveniente que surge del hecho de que la saliva sea altamente sensible al ingreso de droga al organismo es la multiplicidad de picos que aparecen en los perfiles  $C_{sal}$  vs. tiempo, dada la posible absorción pulsátil desde el sitio de administración. En un estudio de BDR, tales ingresos de sustancia pueden ocurrir a tiempos no muestreados en una forma farmacéutica y sí muestreados en la otra, o incluso alternarse aleatoriamente en los distintos individuos participantes del estudio, lo que origina datos de concentración y tiempo altamente variables. Este punto puede dificultar el análisis estadístico de los perfiles, pero también puede ser mejorado notablemente con un adecuado esquema de muestreo, como se hizo en el Capítulo 3 durante el ensayo con PHT.

Creemos, entonces, que para aquellas drogas capaces de ser determinadas en saliva las desventajas que suelen adjudicarse a este fluido no parecen compensar las considerables ventajas que posee.

- Es un método no invasivo: permite obtener un gran número de muestras sin los riesgos asociados a las extracciones sanguíneas (infección, contaminación cruzada entre pacientes, irritación y/o aparición de hematomas).
- Genera mayor aceptación y cumplimiento en los pacientes.
- Resulta ideal para poblaciones pediátricas, psiquiátricas o bajo ciertas condiciones de estrés.
- Ofrece la posibilidad de muestreo domiciliario, sin necesidad de supervisión médica.
- No requiere entrenamiento ni equipamiento especial para quien toma la muestra.
- Permite disminuir los costos por muestra, lo que favorece la realización de estudios/monitoreos sobre grandes poblaciones, como así también de estudios que requieren múltiples muestreos, incluso durante la noche.
- Las concentraciones salivales son un reflejo de las concentraciones libres en plasma, responsables del efecto farmacológico.
- En el caso de medicamentos concomitantes, edad avanzada o ciertos estados patológicos, en los que puede existir desplazamiento de la unión a proteínas o donde el porcentaje unido puede encontrarse alterado, las concentraciones salivales poseerán mayor significancia clínica.

Por lo tanto, a partir de los resultados discutidos aquí surge que la saliva se constituye como un fluido comparable al plasma en cuanto a su aplicabilidad en estudios de BDR. Las concentraciones salivales de droga no sólo cumplen con los requisitos necesarios para su uso clínico y biofarmacéutico, sino que presentan ventajas adicionales ya que, comparadas con las concentraciones venosas, correlacionan mejor con la fracción de droga libre que fluye por los capilares, más representativa de la concentración responsable del efecto terapéutico en la biofase (Fagiolino, 1999; Ritschel & Tompson, 1983). Y como las concentraciones de droga en los capilares, y en muestras de saliva obtenidas con estimulación, están íntimamente relacionadas con los niveles arteriales (Posti, 1982), la biodisponibilidad sistémica de una droga será determinada de manera más adecuada mediante el muestreo en saliva que en sangre venosa post-capilarización.

---

---

# ■ Capítulo 7

## Conclusiones





Existe acuerdo entre investigadores y profesionales de la salud acerca de que la utilización de formulaciones genéricas (FG) de menor precio es una herramienta útil tanto para la contención del gasto farmacéutico como para el aumento de la accesibilidad de los pacientes a los medicamentos (Anderson, 2008). Sin embargo, las opiniones se dividen a la hora de establecer qué exigencias deben cumplir dichas FG para poder ser *intercambiables* con el correspondiente producto líder o innovador.

En los países desarrollados, las autoridades sanitarias asumieron que la respuesta era responsabilidad propia y la encararon de la forma más general posible: estableciendo criterios regulatorios para el registro de FG lo suficientemente amplios como para que abarquen todos los casos. Esto ejerció una presión extra sobre los estudios de bioequivalencia (BE) y sobre su estadística, puesto que debían funcionar como garantía de la intercambiabilidad (Giarovich, 2001). Se generaron así intensas discusiones, ya que en áreas terapéuticas especialmente riesgosas como la epilepsia el riesgo asociado a dichos intercambios es demasiado elevado: el ahorro inicial puede ser anulado o incluso superado por el costo de la repercusión clínica secundaria al cambio de tratamiento.

En otras palabras, si bien el ahorro económico parecía indudable en tratamientos farmacológicos realizados desde el principio con una FG, en los pacientes en los que el intercambio se producía durante el tratamiento podían producirse problemas de ineficacia clínica –recidiva de las crisis– y de tolerabilidad –efectos adversos– cuyo costo económico superaba con creces al ahorro inicial. Todo eso sin mencionar otro aspecto fundamental: la repercusión física y emocional de dichas complicaciones en lo personal, familiar y social y de su influencia negativa en la calidad de vida de los pacientes y sus familiares.

En el caso de la epilepsia se presentan, además, desafíos adicionales, ya que aunque se pudiera de alguna manera asegurar idénticos desempeños terapéuticos entre dos formulaciones, siempre estaría presente el efecto “nocebo”: síntomas negativos que los pacientes pueden experimentar por un tratamiento con placebo si son advertidos negativamente por parte de sus médicos, como así también los pacientes estarán más alertas a los posibles efectos adversos que experimenten pudiendo notar síntomas que de lo contrario ignorarían (y que, posiblemente, también presentaba la formulación de referencia).

Es posible que una persona con epilepsia que crea estar recibiendo una formulación menos efectiva experimente ansiedad y estrés, y que ello facilite que sufra una convulsión.<sup>1</sup> En los ensayos clínicos de la epilepsia, los grupos placebo suelen experimentar

<sup>1</sup> Haut y colaboradores encontraron que la falta de sueño, el estrés y los niveles de ansiedad se asociaban a la ocurrencia de convulsiones (Haut et al., 2007).

cambios en la frecuencia de las convulsiones o en los efectos adversos comparados con su estado basal. Por ejemplo, en un análisis de ensayos del AED Topiramato se encontró que de 265 sujetos con epilepsia refractaria que recibieron placebo, el 15% reportó una reducción mayor al 50% en sus convulsiones, y un 3% abandonó prematuramente el ensayo debido a los efectos adversos experimentados (Peeters et al., 2003).

Pero lo fundamental es que, aunque se debiesen a un efecto nocebo, stress u otras razones, los trastornos que puede ocasionar un intercambio en la vida de un paciente jamás podrán ser compensados por el aspecto económico de dicho intercambio. Un ejemplo es que en pacientes con epilepsia controlada, una única crisis convulsiva podría poner en peligro sus licencias para conducir o trabajar, además de que una persona que no ha experimentado ninguna convulsión en muchos años tiene mayor riesgo de estar en una situación de peligro para su vida (maneja un auto, por ejemplo) cuando aparezca una convulsión.

¿Qué queremos decir con esto? Que pretender que todas las FG de un determinado principio activo pudieran ser intercambiables entre sí y con el producto de referencia generó demasiada presión y cuestionamientos tanto sobre la prueba de BE como sobre la prescripción de dichas FG, y fue en ese proceso donde la epilepsia representó uno de los ámbitos más propicios para la discusión.

Esto nos lleva a nuestra primera conclusión:

*En voluntarios sanos la equivalencia terapéutica no puede ser extrapolada a partir de un estudio de BE, dado que es una condición propia de cada paciente. Por el contrario, la prueba de BE es el estudio por excelencia para evaluar la equivalente calidad biofarmacéutica de dos productos similares. Y para cumplir con este objetivo son adecuados y suficientes los estudios de BEM, no justificándose en la mayoría de los casos la realización de ensayos más complejos (como la BEI, entre otros).*

Ya en la década de 1980, el Dr. Ritschel, académico de la Universidad de Cincinnati, publicó varios trabajos en los que sostuvo que la biodisponibilidad relativa (BDR) entre dos formulaciones debía ser considerada sólo como un ensayo biológico de control de calidad, llevado a cabo de acuerdo a un protocolo rígido para excluir tantas variables como sea posible y así proveer de una medida del comportamiento biológico de una droga en un producto, válido únicamente para los lotes elegidos de los productos a comparar en las condiciones estipuladas en el ensayo (Ritschel, 1984 y 1987; Ritschel et al., 1985). El autor sostenía que si bien los estudios de BD surgieron a partir de observaciones clínicas en las que se informó que dos o más productos conteniendo la misma droga, en idéntica dosis y administrados por la misma vía, podrían no resultar en idéntica eficacia, los mismos no podían ser concebidos como garantía ni como una medida de eficacia clínica.

Resulta imprescindible contar en el mercado con productos que hayan demostrado poseer una calidad biofarmacéutica adecuada para ser contados entre las opciones terapéuticas que se ofrecen a un paciente, de manera que éste pueda optar, con el consejo de profesionales médicos y farmacéuticos, por la terapéutica que mejor se adapte a sus posibilidades o preferencias. Un estudio realizado por Shrank y colaboradores evaluó el efecto de la prescripción de FG o de productos de marca sobre la adherencia de los pacientes al tratamiento en afecciones crónicas (hipertensión, diabetes e hipercolesterolemia). La adherencia encontrada, medida como la proporción de días en que los pacientes cumplían el tratamiento, fue significativamente mayor para aquellos que

habían comenzado con FG: dichos pacientes tuvieron un 62% más de probabilidad de adherir al tratamiento en comparación con los que recibían los productos de marca (Shrank et al., 2006).

Por otro lado, en el Capítulo 5 concluimos que el principio de transitividad en la BE no siempre se cumple y, por lo tanto, no debería asumirse como válido. Sin embargo, si relacionamos esto con lo anterior llegamos a nuestra segunda conclusión:

*Al desasociar los conceptos de intercambiabilidad y BE también se evita el problema de la transitividad: si la BE comienza a concebirse como una prueba de la calidad biofarmacéutica no habría inconvenientes en que todas las FG de un determinado principio activo demostraran su BE respecto al mismo producto de referencia, ya que éstas no serían intercambiadas durante la terapéutica sino que constituirían una opción para los pacientes al inicio del tratamiento (recetabilidad).*

Sin embargo, no debemos olvidar que la prueba de BE no es la única manera de establecer la calidad biofarmacéutica entre dos formulaciones: el ensayo de disolución *in vitro* también permite evaluar dicha calidad. No sólo eso, sino que el nuevo enfoque que planteamos para la BE vuelve más relevantes esta clase de estudios *in vitro*, ya que en aquellos casos donde la disolución es la etapa limitante de la absorción (y por lo tanto el desempeño *in vivo* puede ser predicho por los datos de disolución *in vitro*) la calidad biofarmacéutica de los productos puede ser demostrada con las pruebas de disolución adecuadas.

A estos casos se aplica nuestra tercera conclusión:

*Cuando la calidad biofarmacéutica de dos productos es comparada mediante estudios de disolución *in vitro* resulta adecuado el criterio actualmente exigido (factor de similitud,  $f_2$ ), aunque es recomendable informar, de manera conjunta, el resultado de la comparación de algún parámetro indicativo de cantidad, como el área bajo la curva (ABC) o la eficiencia de disolución (ED). De esa manera se logra un resultado más robusto y que brinda mayor información a la hora de interpretar los resultados de la comparación.*

Por último, al requerir la realización de estudios de BDR o BE como etapa previa a la comercialización de los medicamentos (EMA/CPMP, 2001; FDA/CDER, 2003), se vuelve indispensable optimizar este ensayo, principalmente en lo que voluntarios sanos se refiere. Un factor facilitador estaría dado por el uso de saliva como fluido de monitoreo, lo que implicaría una importante mejora bioética al volver más confortables y menos invasivos los estudios, con menores riesgos para los voluntarios.

Se alcanza así nuestra cuarta conclusión:

*La saliva constituye un fluido idóneo para ser utilizado en estudios de BDR/BE, con aplicaciones análogas al plasma, ventajas éticas, económicas y experimentales respecto a éste y que puede, además, proporcionar información adicional.*

Por lo tanto, el uso de saliva podría promover de manera indirecta el desarrollo de productos genéricos por parte de los productores farmacéuticos, y en consecuencia, mejorar el acceso de los pacientes a la terapia.



---

---

# ■ Acrónimos





- ABC:** área bajo la curva (parámetro farmacocinético)
- AEDs:** fármacos antiepilépticos (*Antiepileptic Drugs*)
- AES:** Sociedad Americana de Epilepsia (*American Epilepsy Society*)
- AIC:** Akaike's Information Criterion
- AINES:** anti-inflamatorios no esteroides
- ANAVA:** análisis de varianza
- ANMAT:** Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (República Argentina)
- BCS:** Sistema de clasificación biofarmacéutica (*Biopharmaceutics Classification System*)
- BD:** biodisponibilidad
- BDR:** biodisponibilidad relativa
- BE:** bioequivalencia
- BEI:** bioequivalencia individual
- BEM:** bioequivalencia media
- BEP:** bioequivalencia poblacional
- BP:** Farmacopea Británica (*British Pharmacopeia*)
- CBZ:** Carbamazepina
- CF:** Cafeína
- Cl:** clearance
- C<sub>max</sub>:** concentración máxima (parámetro farmacocinético)
- CNZ:** Clonazepam
- CV:** coeficiente de variación
- D:** dosis
- DCI:** denominación común internacional
- E-CBZ:** 10,11-Epóxido de Carbamazepina
- ED:** eficiencia de disolución
- F:** fracción absorbida
- FA:** Farmacopea Argentina
- FAV:** fármaco altamente variable
- FDA:** Food and Drug Administration (EE.UU.)
- FEMT:** fármaco de estrecho margen terapéutico
- FG:** formulaciones genéricas
- GL:** grados de libertad
- HPLC:** Cromatografía líquida de alta performance (*High Performace Liquid Chromatography*)
- HR:** humedad relativa
- IB:** intervalo de bioequivalencia
- IC:** intervalo de confianza
- INAME:** Instituto Nacional de Medicamentos (República Argentina)
- I\*F:** interacción Individuo\*Formulación
- IR:** liberación inmediata (*immediate release*)

**IT:** intervalo terapéutico  
**IVVC:** correlaciones *in vitro/in vivo* (*In Vitro/In Vivo Correlations*)  
**Ke:** constante de eliminación  
**LADME:** liberación-absorción-distribución-metabolismo-eliminación  
**Ln:** logaritmo natural  
**LSNa:** Lauril sulfato de sodio  
**LTG:** Lamotrigina  
**NTZ:** Nitrazepam  
**OMS:** Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization, WHO*)  
**OxCBZ:** Oxcarbazepina  
**pa:** principio activo  
**PB:** Fenobarbital  
**PHT:** Fenitoína  
**PM:** peso medio  
**PPB:** Propilparabeno  
**R<sup>2</sup>:** coeficiente de determinación  
**Ra:** relación de áreas  
**SD:** desviación estándar (*Standard Deviation*)  
**Sdtc:** sobre droga tal cual  
**SI:** estándar interno (*standard internal*)  
**S/P:** concentraciones saliva/plasma  
**SR:** sustancia de referencia  
**STDM:** Monitoreo terapéutico de drogas en saliva (*Salivary Therapeutic Drug Monitoring*)  
**SVD:** sobre valor declarado  
**TDM:** monitoreo terapéutico de drogas (*Therapeutic Drug Monitoring*)  
**Tmax:** tiempo correspondiente a la C<sub>max</sub> (parámetro farmacocinético)  
**USP/NF:** Farmacopea de EE.UU./Formulario Nacional (*United States Pharmacopeia/National Formulary*)  
**UUD:** uniformidad de unidades de dosificación  
**UV:** ultravioleta  
**VA:** valor de aceptación  
**Vd:** volumen de distribución  
**VP:** Valproato de sodio  
**VPA:** Ácido valproico

---

---

# ■ Bibliografía





- Adams, E; Coomans, D; Smeyers-Verbeke, J; Massart, DL (2002). Non-linear mixed effects models for the evaluation of dissolution profiles. *Int J Pharm*; 240 (1-2): 37-53.
- Adams, E; De Maesschalck, R; De Spiegeleer, B; Vander Heyden, Y; Smeyers-Verbeke, J; Massart, DL (2001). Evaluation of dissolution profiles using principal component analysis. *Int J Pharm*; 212 (1): 41-53.
- AES (2007). The substitution of different formulations of antiepileptic drugs for the treatment of epilepsy (available at <http://www.aesnet.org/77B16A48-E7FF-0F41-218E9CB3E54919D4>).
- Amidon, GL; Lennernas, H; Shah, VP; Crison, JR (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res*; 12 (3): 413-20.
- Andermann, F; Duh, MS; Gosselin, A; Paradis, PE (2007). Compulsory generic switching of antiepileptic drugs: high switchback rates to branded compounds compared with other drug classes. *Epilepsia*; 48 (3): 464-9.
- Anderson, GD (2008). Understanding the ramifications of switching among AEDS: what are the data? *Adv Stud Med*; 8 (7): 229-234.
- Anderson, NH; Bauer, M; Boussac, 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. *J Pharm Biomed Anal*; 17 (4-5): 811-22.
- Anderson, S; Hauck, WW (1990). Consideration of individual bioequivalence. *J Pharmacokinet Biopharm*; 18 (3): 259-73.
- Anderson, S; Hauck, WW (1996). The transitivity of bioequivalence testing: potential for drift. *Int J Clin Pharmacol Ther*; 34 (9): 369-74.
- ANMAT (1999). Requerimiento de Estudios de Bioequivalencia, Disposición 3185/1999 (available at [http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Legislacion/Medicamentos/Disposicion\\_ANMAT\\_3185-1999.pdf](http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Legislacion/Medicamentos/Disposicion_ANMAT_3185-1999.pdf)).
- ANMAT (2002). Especialidades Medicinales, Disposición 5318/2002 (available at [http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Legislacion/Medicamentos/Disposicion\\_ANMAT\\_5318-2002.pdf](http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Legislacion/Medicamentos/Disposicion_ANMAT_5318-2002.pdf)).
- ANMAT (2009). Criterios de Bioexención de Estudios de Bioequivalencia para medicamentos sólidos orales de liberación inmediata, Disposición 758/09 (available at [http://www.anmat.gov.ar/webanmat/legislacion/medicamentos/Disposicion\\_ANMAT\\_758-2009.pdf](http://www.anmat.gov.ar/webanmat/legislacion/medicamentos/Disposicion_ANMAT_758-2009.pdf)).
- ANMAT (2011). Listado de Medicamentos de Alto Riesgo e Inmunosupresores con Resultados Aceptables de Biodisponibilidad y Bioequivalencia, Mayo de 2011 (available at [http://www.anmat.gov.ar/listados/Listado\\_Alto\\_Riesgo\\_5-2011.pdf](http://www.anmat.gov.ar/listados/Listado_Alto_Riesgo_5-2011.pdf)).
- Aps, JK; Martens, LC (2005). Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int*; 150 (2-3): 119-31.
- Arancibia, A; Pezoa, R; Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacológicas (1992). Biodisponibilidad de medicamentos : Simposio Internacional I. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas, Santiago de Chile.

- Argumosa, A; Herranz, JL (2000). [Economic aspects of epilepsy]. *Rev Neurol*; 30 Suppl 1: S154-60.
- Argumosa, A; Herranz, JL (2004). Childhood epilepsy: a critical review of cost of-illness studies. *Epileptic Disord*; 6 (1): 31-40.
- Armijo, JA; Herranz, JL (1998). Fármacos antiepilépticos y anticonvulsivos. In: *Farmacología Humana - J. Flórez Ed. Masson, Barcelona [etc.]*. Pp. 517-541
- Bakke, OM; Carné Cladellas, X; García Alonso, F; Peces-Barba, G (1994). *Ensayos clínicos con medicamentos: fundamentos básicos, metodología y práctica*. Doyma, Barcelona.
- Barrett, JS; Batra, V; Chow, A; Cook, J; Gould, AL; Heller, AH, et al. (2000). PhRMA perspective on population and individual bioequivalence. *J Clin Pharmacol*; 40 (6): 561-70.
- Bartoszynski, R; Powers, JD; Herderick, EE; Pultz, JA (2001). Statistical comparison of dissolution curves. *Pharmacol Res*; 43 (4): 369-87.
- Battino, D; Croci, D; Rossini, A; Messina, S; Mamoli, D; Perucca, E (2003). Serum carbamazepine concentrations in elderly patients: a case-matched pharmacokinetic evaluation based on therapeutic drug monitoring data. *Epilepsia*; 44 (7): 923-9.
- Bell, WL; Crawford, IL; Shiu, GK (1993). Reduced bioavailability of moisture-exposed carbamazepine resulting in status epilepticus. *Epilepsia*; 34 (6): 1102-4.
- Benet, LZ (1999). Understanding bioequivalence testing. *Transplantation Proceedings*; 31 (3, Supplement 1): 7S-9S.
- Benet, LZ; Goyan, JE (1995). Bioequivalence and narrow therapeutic index drugs. *Pharmacotherapy*; 15 (4): 433-40.
- Berg, MJ; Gross, RA; Haskins, LS; Zingaro, WM; Tomaszewski, KJ (2008). Generic substitution in the treatment of epilepsy: patient and physician perceptions. *Epilepsy Behav*; 13 (4): 693-9.
- Bergen, DC (2009). Pharmacokinetics of phenytoin: reminders and discoveries. *Epilepsy Curr*; 9 (4): 102-4.
- Bernus, I; Dickinson, RG; Hooper, WD; Eadie, MJ (1996). Dose-dependent metabolism of carbamazepine in humans. *Epilepsy Res*; 24 (3): 163-72.
- Berry, MR; Likar, MD (2007). Statistical assessment of dissolution and drug release profile similarity using a model-dependent approach. *J Pharm Biomed Anal*; 45 (2): 194-200.
- Besag, FM (2000). Is generic prescribing acceptable in epilepsy? *Drug Saf*; 23 (3): 173-82.
- Bialer, M; Midha, KK (2010). Generic products of antiepileptic drugs: a perspective on bioequivalence and interchangeability. *Epilepsia*; 51 (6): 941-50.
- Blanchard, J; Harvey, S; Morgan, WJ (1991). Serum/saliva correlations for theophylline in asthmatics. *J Clin Pharmacol*; 31 (6): 565-70.
- Blanchard, J; Harvey, S; Morgan, WJ (1992). Relationship between serum and saliva theophylline levels in patients with cystic fibrosis. *Ther Drug Monit*; 14 (1): 48-54.
- Bourgeois, BF (2000). Pharmacokinetic properties of current antiepileptic drugs: what improvements are needed? *Neurology*; 55 (11 Suppl 3): S11-6.

- Box, GEP; Hunter, WG; Hunter, JS (2005). *Estadística para investigadores: introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos*. Reverté, Barcelona.
- Brodie, MJ (2010). Antiepileptic drug therapy the story so far. *Seizure*; 19 (10): 650-5.
- Burkhardt, RT; Leppik, IE; Blesi, K; Scott, S; Gapany, SR; Cloyd, JC (2004). Lower phenytoin serum levels in persons switched from brand to generic phenytoin. *Neurology*; 63 (8): 1494-6.
- Burnham, KP; Anderson, DR (2004). Multimodel Inference - Understanding AIC and BIC in Model Selection *Sociological Methods & Research*; 33 (2): 261-304.
- Cárcamo, EC (1981). *Cinética de Disolución de Medicamentos*, Santiago, Chile.
- Cardot, JM; Degen, P; Flesch, G; Menge, P; Dieterle, W (1995). Comparison of plasma and saliva concentrations of the active monohydroxy metabolite of oxcarbazepine in patients at steady state. *Biopharm Drug Dispos*; 16 (7): 603-14.
- Caspari, C (1895). *A Treatise on Pharmacy*, Lea Bros., Philad., 344.
- Chen, ML; Lesko, LJ (2001). Individual bioequivalence revisited. *Clin Pharmacokinetics*; 40 (10): 701-6.
- Chen, SS; Allen, J; Oxley, J; Richens, A (1982). Comparative bioavailability of phenytoin from generic formulations in the United Kingdom. *Epilepsia*; 23 (2): 149-52.
- Chow, SC; Ki, FY (1997). Statistical comparison between dissolution profiles of drug products. *J Biopharm Stat*; 7 (2): 241-58.
- Chow, SC; Liu, JP (2009). *Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies*. CRC Press, Boca Raton.
- Christians, U; First, MR; Benet, LZ (2000). Recommendations for bioequivalence testing of cyclosporine generics revisited. *Ther Drug Monit*; 22 (3): 330-45.
- Chroscinska-Krawczyk, M; Jargiello-Baszak, M; Walek, M; Tylus, B; Czuczwar, SJ (2011). Caffeine and the anticonvulsant potency of antiepileptic drugs: experimental and clinical data. *Pharmacol Rep*; 63 (1): 12-8.
- Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material (2004). Pharmaceutical Press, London.
- Cohen, Y; Pradeau, D (1998). *Análisis químicos farmacéuticos de medicamentos Uteha*, Noriega Editores, México [etc.].
- Collazo Herrera, MM; Ramos Picos, D; Yañez Vega, R; De la Cruz Pérez, B (2007). Should be the Control of Drug Prices a Responsibility of the National Regulatory Authorities? *Lat Am J Pharm*; 26 (6): 913-923.
- Connors, KA (1981). *Curso de análisis farmacéutico (ensayo del medicamento)*. Reverté, Barcelona.
- Corveleyn, S; Remon, JP (1999). Stability of Freeze-Dried Tablets at Different Relative Humidities. *Drug Development and Industrial Pharmacy*; 25 (9): 1005-1013.
- Costa, P (2001). An alternative method to the evaluation of similarity factor in dissolution testing. *Int J Pharm*; 220 (1-2): 77-83.
- Costa, P; Sousa Lobo, JM (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci*; 13 (2): 123-33.

- Crawford, P; Feely, M; Guberman, A; Kramer, G (2006). Are there potential problems with generic substitution of antiepileptic drugs? A review of issues. *Seizure*; 15 (3): 165-76.
- Crawford, P; Hall, WW; Chappell, B; Collings, J; Stewart, A (1996). Generic prescribing for epilepsy. Is it safe? *Seizure*; 5 (1): 1-5.
- Crowder, MJ (1996). Keep timing the tablets: statistical analysis of pill dissolution rates. *Appl Statist*; 45 (3): 323-334.
- Danhof, M; Breimer, DD (1978). Therapeutic drug monitoring in saliva. *Clin Pharmacokinet*; 3 (1): 39-57.
- Dickinson, RG; Hooper, WD; King, AR; Eadie, MJ (1985). Fallacious results from measuring salivary carbamazepine concentrations. *Ther Drug Monit*; 7 (1): 41-5.
- Diletti, E; Hauschke, D; Steinijans, VW (1992). Sample size determination: extended tables for the multiplicative model and bioequivalence ranges of 0.9 to 1.11 and 0.7 to 1.43. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*; 30 (8): 287-90.
- Dokoumetzidis, A; Macheras, P (2006). A century of dissolution research: from Noyes and Whitney to the biopharmaceutics classification system. *Int J Pharm*; 321 (1-2): 1-11.
- Doménech Berrozpe, J; Martínez Lanao, J; Plá Delfina, JM (1997). *Biofarmacia y farmacocinética*. Vol. 1, *Farmacocinética*. Síntesis, Madrid.
- Drobitch, RK; Svensson, CK (1992). Therapeutic drug monitoring in saliva. An update. *Clin Pharmacokinet*; 23 (5): 365-79.
- Duh, MS; Andermann, F; Paradis, PE; Weiner, J; Manjunath, R; Cremieux, PY (2007). The economic consequences of generic substitution for antiepileptic drugs in a public payer setting: the case of lamotrigine. *Dis Manag*; 10 (4): 216-25.
- Eadie, MJ (2001). Therapeutic drug monitoring--antiepileptic drugs. *Br J Clin Pharmacol*; 52 Suppl 1: 11S-20S.
- Eichelbaum, M; Tomson, T; Tybring, G; Bertilsson, L (1985). Carbamazepine metabolism in man. Induction and pharmacogenetic aspects. *Clin Pharmacokinet*; 10 (1): 80-90.
- EMA/CPMP (2001). Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence.
- EMA/CPMP (2002). Note for guidance on good clinical practice (CPMP/ICH/135/95).
- EMA/CPMP (2008). Guideline on the Investigation of Bioequivalence.
- Endrenyi, L; Fritsch, S; Yan, W (1991). C<sub>max</sub>/AUC is a clearer measure than C<sub>max</sub> for absorption rates in investigations of bioequivalence. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*; 29 (10): 394-9.
- Endrenyi, L; Midha, KK (1998). Individual bioequivalence--has its time come? *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; 6 (4): 271-277.
- Epilepsy Foundation of America. Commentary. (1990). *J Epilepsy*; 3: 55-59.
- Fagiolino, P (1990). Monitorización de fármacos en saliva: ventajas e inconvenientes. *Acta Farm Bonaerense*; 9 (1): 3-13.
- Fagiolino, P (1999). Monitorización de fármacos en saliva: aplicaciones biofarmacéuticas, farmacocinéticas y terapéuticas. Comisión Sectorial de Investigación Científica de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

- Fagiolino, P; Eiraldi, R; Vázquez, M (1996). Modelo farmacocinético flujo-dependiente. Aplicación clínica a la digoxina. *Acta Farm Bonaerense*; 15 (4): 225-238.
- Fagiolino, P; Galante, G; Cousillas, A; Vila, P; Stareczek, S; Vivero, E, et al. (1988). Niveles salivales de teofilina en la administración de formas farmacéuticas de acción prolongada. Relación de concentraciones saliva/plasma como testigo del perfil de liberación in vivo. *Revista A. E. F. H.*; XII (1): 51-57.
- Fagiolino, P; Vázquez, M; Olano, I; Delfino, A (2006). Systemic and presystemic conversion of carbamazepine to carbamazepine-10,11-epoxide during long term treatment. *J Epilepsy Clin Neurophysiol*; 12 (1): 13-16.
- Faigle, JW; Brechbühler, S; Feldman, KF; Richter, WJ (1976). The biotransformation of carbamazepine. In: *Epileptic seizures -- behaviour - pain*. W. Birkmayer Ed. Hans Huber Publishers, Bern/Stuttgart/Viena. Pp. 127 - 140
- Farmacopea Argentina 7ª Edición (2003). Buenos Aires, Argentina.
- FDA (2004). Food and Drug Administration - Savings From Generic Drugs Purchased at Retail Pharmacies.
- FDA (2010). Food and Drug Administration. Food & Drug Administration, Generic Drugs: Questions and Answers.
- FDA/CDER (1992). Statistical Procedures for Bioequivalence Studies using a Standard Two Treatment Cross-over Design.
- FDA/CDER (1997). Guidance for Industry: Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms.
- FDA/CDER (1997b). Guidance for Industry: Extended release oral dosage forms - Development, evaluation, and application of In Vitro/In Vivo correlations.
- FDA/CDER (1997c). Guidance for Industry: Modified release solid oral dosage forms - Scale-Up and Postapproval changes: chemistry, manufacturing, and controls; In Vitro dissolution testing and In Vivo bioequivalence documentation.
- FDA/CDER (2000). Guidance for Industry: Analytical procedures and methods validation (available at [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatory Information/Guidances/UCM122858.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM122858.pdf)).
- FDA/CDER (2000). Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System.
- FDA/CDER (2001). Guidance for Industry: Statistical approaches to establishing Bioequivalence.
- FDA/CDER (2003). Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products - General Considerations.
- Fischer, MA; Avorn, J (2003). Economic consequences of underuse of generic drugs: evidence from Medicaid and implications for prescription drug benefit plans. *Health Serv Res*; 38 (4): 1051-63.
- Florey, K (1988). Analytical profiles of drug substances. Academic Press, San Diego [etc.].
- Fluehler, H; Grieve, AP; Mandallaz, D; Mau, J; Moser, HA (1983). Bayesian approach to bioequivalence assessment: an example. *J Pharm Sci*; 72 (10): 1178-81.

- Fluehler, H; Hirtz, J; Moser, HA (1981). An aid to decision-making in bioequivalence assessment. *J Pharmacokinet Biopharm*; 9 (2): 235-43.
- Friedman, H; Greenblatt, DJ; Burstein, ES; Harmatz, JS; Shader, RI (1986). Population study of triazolam pharmacokinetics. *Br J Clin Pharmacol*; 22 (6): 639-42.
- Ganther, JM; Kreling, DH (2000). Consumer perceptions of risk and required cost savings for generic prescription drugs. *J Am Pharm Assoc (Wash)*; 40 (3): 378-83.
- García, AG; Gandía, L (2001). El ensayo clínico en España. *Farmaindustria*, Madrid.
- García, ME; García Morales, I; Gil-Nagel, A (2008). ¿Cuáles son las consecuencias de la sustitución por fármacos antiepilépticos genéricos? Revisión de la literatura. *Neurol Supl*; 4 (1): 29-34.
- Garg, SK; Kumar, N; Bhargava, VK; Prabhakar, SK (1998). Effect of grapefruit juice on carbamazepine bioavailability in patients with epilepsy. *Clin Pharmacol Ther*; 64 (3): 286-8.
- Giarovich, SS (2001). Genéricos, similares y el problema de la intercambiabilidad. *Rev SAFYBI*; 40 (101): 3-33.
- Giessmann, T; May, K; Modess, C; Wegner, D; Hecker, U; Zschiesche, M, et al. (2004). Carbamazepine regulates intestinal P-glycoprotein and multidrug resistance protein MRP2 and influences disposition of talinolol in humans. *Clin Pharmacol Ther*; 76 (3): 192-200.
- Gilman, JT; Alvarez, LA; Duchowny, M (1993). Carbamazepine toxicity resulting from generic substitution. *Neurology*; 43 (12): 2696-7.
- Glende, M; Huller, H; Mai, I; Migulla, H; Prumke, J; Schumann, G (1983). Comparative bioavailability of two carbamazepine tablets. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*; 21 (12): 631-3.
- Glynn, JP; Bastain, W (1973). Salivary excretion of paracetamol in man. *J Pharm Pharmacol*; 25 (5): 420-1.
- Goodman, LS; Gilman, A (2006). *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill, Medical Publishing Division, New York.
- Gosselin, PM; Thibert, R; Preda, M; McMullen, JN (2003). Polymorphic properties of micronized carbamazepine produced by RESS. *International Journal of Pharmaceutics*; 252 (1-2): 225-233.
- Gould, AL (2000). A practical approach for evaluating population and individual bioequivalence. *Stat Med*; 19 (20): 2721-40.
- Graffner, C (2006). Regulatory aspects of drug dissolution from a European perspective. *Eur J Pharm Sci*; 29 (3-4): 288-93.
- Green, JR; Margerison, D (1978). *Statistical treatment of experimental data*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
- Greiner-Sosanko, E; Giannoutsos, S; Lower, DR; Virji, MA; Krasowski, MD (2007). Drug monitoring: simultaneous analysis of lamotrigine, oxcarbazepine, 10-hydroxycarbazepine, and zonisamide by HPLC-UV and a rapid GC method using a nitrogen-phosphorus detector for levetiracetam. *J Chromatogr Sci*; 45 (9): 616-22.
- Groschl, M; Kohler, H; Topf, HG; Rupprecht, T; Rauh, M (2008). Evaluation of saliva collection devices for the analysis of steroids, peptides and therapeutic drugs. *J Pharm Biomed Anal*; 47 (3): 478-86.

- Groth, U; Prellwitz, W; Jahnchen, E (1974). Estimation of pharmacokinetic parameters of lithium from saliva and urine. *Clin Pharmacol Ther*; 16 (3): 490-8.
- Guyton, AC; Hall, JE (2006). *Fisiologia Medica*. Elsevier, Madrid.
- Haas, JS; Phillips, KA; Gerstenberger, EP; Seger, AC (2005). Potential savings from substituting generic drugs for brand-name drugs: medical expenditure panel survey, 1997-2000. *Ann Intern Med*; 142 (11): 891-7.
- Haidar, SH; Makhoulouf, F; Schuirmann, DJ; Hyslop, T; Davit, B; Conner, D, et al. (2008). Evaluation of a scaling approach for the bioequivalence of highly variable drugs. *Aaps J*; 10 (3): 450-4.
- Hartley, R; Aleksandrowicz, J; Ng, PC; McLain, B; Browmer, CJ; Forsythe, WI (1990). Breakthrough seizures with generic carbamazepine: a consequence of poorer bioavailability? *Br J Clin Pract*; 44: 270-273.
- Hauck, WW; Anderson, S (1984). A new statistical procedure for testing equivalence in two-group comparative bioavailability trials. *J Pharmacokinet Biopharm*; 12 (1): 83-91.
- Hauck, WW; Anderson, S (1994). Measuring switchability and prescribability: when is average bioequivalence sufficient? *J Pharmacokinet Biopharm*; 22 (6): 551-64.
- Hauschke, D; Steinijans, VW; Diletti, E (1992a). A distribution-free procedure for the statistical analysis of bioequivalence studies. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*; 30 Suppl 1: S37-43.
- Hauschke, D; Steinijans, VW; Diletti, E; Burke, M (1992b). Sample size determination for bioequivalence assessment using a multiplicative model. *J Pharmacokinet Biopharm*; 20 (5): 557-61.
- Hauschke, D; Steinijans, VW; Pigeot, I (2007). *Bioequivalence Studies in Drug Development. Methods and Applications*. Wiley, Chichester.
- Haut, SR; Hall, CB; Masur, J; Lipton, RB (2007). Seizure occurrence: precipitants and prediction. *Neurology*; 69 (20): 1905-10.
- Hayashi, Y; Watanabe, J; Iwamoto, K; Ozeki, S (1988). Salivary excretion of 5-fluorouracil. II. Fluctuation of saliva/plasma concentration ratio and salivary clearance during a constant rate intravenous infusion in beagle dogs. *J Pharmacobiodyn*; 11 (6): 438-43.
- Heim, M; Bruguierolle, B; Bouvenot, G; Valli, M; Jadot, G; Simonin, R (1980). [Value of the analysis of salivary theophylline with an immunoenzymatic method]. *Therapie*; 35 (2): 251-3.
- Henney, JE (1999). From de Food and Drug Administration: Review of Generic Bioequivalence Studies. *JAMA*; 282 (21): 1995.
- Hodges, S; Forsythe, WI; Gillies, D; Remington, H; Cawood, A (1986). Bio-availability and dissolution of three phenytoin preparations for children. *Dev Med Child Neurol*; 28 (6): 708-12.
- Hofman, LF (2001). Human saliva as a diagnostic specimen. *J Nutr*; 131 (5): 1621S-5S.
- Hold, KM; de Boer, D; Soedirman, JR; Zuidema, J; Maes, RA (1995). The secretion of propranolol enantiomers in human saliva: evidence for active transport? *J Pharm Biomed Anal*; 13 (11): 1401-7.

- Holder, DJ; Hsuan, F (1993). Moment-based criteria for determining bioequivalence. *Biometrika*; 80: 835-846.
- Horning, MG; Brown, L; Nowlin, J; Lertratanangkoon, K; Kellaway, P; Zion, TE (1977). Use of saliva in therapeutic drug monitoring. *Clin Chem*; 23 (2 PT. 1): 157-64.
- Hotelling, H (1931). The generalization of Student's ratio. *Annals of Mathematical Statistics*; 2 (3): 360-378.
- Houssay, BA; Cingolani, HE; Houssay, AB (1988). *Fisiología humana de Bernardo A. Houssay - Tomo I. El Ateneo, Buenos Aires.*
- How Increased Competition from Generic Drugs has Affected Prices and Returns in the Pharmaceutical Industry. (1998). US Government Printing Office, Washington, DC.
- Hundt, HK; Aucamp, AK; Muller, FO; Potgieter, MA (1983). Carbamazepine and its major metabolites in plasma: a summary of eight years of therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit*; 5 (4): 427-35.
- Infostat, Manual del usuario (2011). Córdoba, Argentina.
- Jackson, AJ (1994). *Generics and bioequivalence*. CRC Press, Boca Raton.
- Jacobson, ED (1981). Salivary secretion. In: *Gastrointestinal physiology*. L. R. Johnson Ed. C. V. Mosby, St. Louis, Missouri. Pp. 46-54
- Jain, KK (1993). Investigation and management of loss of efficacy of an antiepileptic medication using carbamazepine as an example. *J R Soc Med*; 86 (3): 133-6.
- Johannessen, SI; Landmark, CJ (2010). Antiepileptic drug interactions - principles and clinical implications. *Curr Neuropharmacol*; 8 (3): 254-67.
- Jonkman, JH; Koeter, GH; Schoemaker, R; de Vries, K; Greving, JE; de Zeeuw, RA (1981). Correlation of serum and saliva theophylline concentration after administration of a sustained release preparation. *Eur J Clin Pharmacol*; 20 (1): 73-8.
- Joukhadar, C; Schenk, B; Kaehler, ST; Kollenz, CJ; Bauer, P; Muller, M, et al. (2003). A replicate study design for testing bioequivalence: a case study on two desmopressin nasal spray preparations. *Eur J Clin Pharmacol*; 59 (8-9): 631-6.
- Jung, H; Milán, RC; Girard, ME; León, F; Montoya, MA (1997). Bioequivalence study of carbamazepine tablets: in vitro/in vivo correlation. *Int J Pharm*; 152 (1): 37-44.
- Kaufman, E; Lamster, IB (2002). The diagnostic applications of saliva--a review. *Crit Rev Oral Biol Med*; 13 (2): 197-212.
- Kees de Joncheere, A; Rietveld, H; Huttin, C (2003). Experiences with generics. In: *Drugs and Money. Prices, Affordability and Cost Containment*. M. N. G. Dukes, F. M. Haaijer-Ruskamp, C. P. de Joncheere and A. H. Rietveld Ed. World Health Organization, Gêneva. Pp.
- Keitel, S (2011). El papel de la farmacopea en un mundo globalizado. *Pharmaceutical Technology Sudamérica*; 110: 54-56.
- Kimani, EK; Potvin, D (1997). A parametric confidence interval for a moment-based scaled criterion for individual bioequivalence. *J Pharmacokinet Biopharm*; 25 (5): 595-614.

- Knop, HJ; Kalafusz, R; Knols, AJF; van der Kleijn, E (1975). Preliminary report of the saliva/plasma ratio of theophylline after the administration of theophylline derivatives in suppositories. *Pharm Weekblad*; 110: 1297-1299.
- Knott, C; Bateman, M; Reynolds, F (1984). Do saliva concentrations predict plasma unbound theophylline concentrations? A problem re-examined. *Br J Clin Pharmacol*; 17 (1): 9-14.
- Koch, G; Allen, JP (1978). Untoward effects of generic carbamazepine therapy. *Arch Neurol*; 44 (578-579).
- Korinthenberg, R; Burkart, P; Woelfle, C; Moenting, JS; Ernst, JP (2007). Pharmacology, efficacy, and tolerability of potassium bromide in childhood epilepsy. *J Child Neurol*; 22 (4): 414-8.
- Kortejarvi, H; Yliperttula, M; Dressman, JB; Junginger, HE; Midha, KK; Shah, VP, et al. (2005). Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: ranitidine hydrochloride. *J Pharm Sci*; 94 (8): 1617-25.
- Koup, JR; Jusko, WJ; Goldfarb, AL (1975). pH-dependent secretion of procainamide into saliva. *J Pharm Sci*; 64 (12): 2008-10.
- Kovacevic, I; Parojcic, J; Homsek, I; Tubic-Grozdanic, M; Langguth, P (2009). Justification of biowaiver for carbamazepine, a low soluble high permeable compound, in solid dosage forms based on IVIVC and gastrointestinal simulation. *Mol Pharm*; 6 (1): 40-7.
- Kramer, G; Steinhoff, BJ; Feucht, M; Pfafflin, M; May, TW (2007). Experience with generic drugs in epilepsy patients: an electronic survey of members of the German, Austrian and Swiss branches of the ILAE. *Epilepsia*; 48 (3): 609-11.
- Kwan, P; Brodie, MJ (2004). Phenobarbital for the treatment of epilepsy in the 21st century: a critical review. *Epilepsia*; 45 (9): 1141-9.
- Lake, OA; Olling, M; Barends, DM (1999). In vitro/in vivo correlations of dissolution data of carbamazepine immediate release tablets with pharmacokinetic data obtained in healthy volunteers. *Eur J Pharm Biopharm*; 48 (1): 13-9.
- Lam, G; Chiou, WL (1982). Determination of the steady-state volume of distribution using arterial and venous plasma data from constant infusion studies with procainamide. *J Pharm Pharmacol*; 34 (2): 132-4.
- Lee, TC; Charles, BG; Steer, PA; Flenady, VJ (1996). Saliva as a valid alternative to serum in monitoring intravenous caffeine treatment for apnea of prematurity. *Ther Drug Monit*; 18 (3): 288-93.
- Levy, G; Hayes, BA (1960). Physicochemical basis of the buffered acetylsalicylic acid controversy. *N Engl J Med*; 262: 1053-8.
- Liao, JJ (2007). A new approach for outliers in a bioavailability/bioequivalence study. *J Biopharm Stat*; 17 (3): 393-405.
- Lindenberg, M; Kopp, S; Dressman, JB (2004). Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur J Pharm Biopharm*; 58 (2): 265-78.
- Liow, K; Barkley, GL; Pollard, JR; Harden, CL; Bazil, CW (2007). Position statement on the coverage of anticonvulsant drugs for the treatment of epilepsy. *Neurology*; 68 (16): 1249-50.

- Locke, CS (1984). An exact confidence interval from untransformed data for the ratio of two formulation means. *J Pharmacokinet Biopharm*; 12 (6): 649-55.
- Lowe, JR; Dixon, JS (1983). Salivary kinetics of prednisolone in man. *J Pharm Pharmacol*; 35 (6): 390-1.
- Lowenthal, DT; Oie, S; Van Stone, JC; Briggs, WA; Levy, G (1976). Pharmacokinetics of acetaminophen elimination by anephric patients. *J Pharmacol Exp Ther*; 196 (3): 570-8.
- MacKichan, JJ; Duffner, PK; Cohen, ME (1981). Salivary concentrations and plasma protein binding of carbamazepine and carbamazepine 10,11-epoxide in epileptic patients. *Br J Clin Pharmacol*; 12 (1): 31-7.
- Maldonado, C; Fagiolino, P; Vázquez, M; Eiraldi, R; Alvariza, S; Bentancur, C, et al. (2011). Time-dependent and concentration-dependent upregulation of carbamazepine efflux transporter. A preliminary assessment from salivary drug monitoring. *Lat Am J Pharm*; 30 (5): 908-912.
- Mandallaz, D; Mau, J (1981). Comparison of different methods for decision-making in bioavailability assessment. *Biometrics*; 37 (2): 213-222.
- Mauger, JW; Chilko, D; Howard, S (1986). On the Analysis of Dissolution Data. *Drug Dev Ind Pharm*; 12 (7): 969-992.
- Mayer, T; May, TW; Altenmuller, DM; Sandmann, M; Wolf, P (1999). Clinical problems with generic antiepileptic drugs: comparison of sustained-release formulations of carbamazepine. *Clinical Drug Investigation*; 18 (1): 17-26.
- McAuliffe, JJ; Sherwin, AL; Leppik, IE; Fayle, SA; Pippenger, CE (1977). Salivary levels of anticonvulsants: a practical approach to drug monitoring. *Neurology*; 27 (5): 409-13.
- Meffin, PJ; Williams, RL; Blaschke, TF; Rowland, M (1977). Application of salivary concentration data to pharmacokinetic studies with antipyrine. *J Pharm Sci*; 66 (1): 135-7.
- Melikian, AP; Straughn, AB; Slywka, GW; Whyatt, PL; Meyer, MC (1977). Bioavailability of 11 phenytoin products. *J Pharmacokinet Biopharm*; 5 (2): 133-46.
- Mennickent, S; Vega, M; Godoy, CG; Leon, MD (2007). [Saliva and plasma levels of carbamazepine have a poor correlation: a pilot study]. *Rev Med Chil*; 135 (3): 335-40.
- Meredith, P (2003). Bioequivalence and other unresolved issues in generic drug substitution. *Clin Ther*; 25 (11): 2875-2890.
- Meyer, MC; Straughn, AB; Jarvi, EJ; Wood, GC; Pelsor, FR; Shah, VP (1992). The bioequivalence of carbamazepine tablets with a history of clinical failures. *Pharm Res*; 9 (12): 1612-6.
- Meyer, MC; Straughn, AB; Mhatre, RM; Shah, VP; Williams, RL; Lesko, LJ (1998). The relative bioavailability and in vivo-in vitro correlations for four marketed carbamazepine tablets. *Pharm Res*; 15 (11): 1787-91.
- Midha, KK; Rawson, MJ; Hubbard, JW (1998). Bioequivalence: Switchability and scaling. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; 6 (2): 87-91.
- Midha, KK; Rawson, MJ; Hubbard, JW (1999). Prescribability and switchability of highly variable drugs and drug products. *Journal of Controlled Release*; 62 (1-2): 33-40.

- Mikati, M; Bassett, N; Schachter, S (1992). Double-blind randomized study comparing brand-name and generic phenytoin monotherapy; 33 (2): 359-65.
- Miles, MV; Tennison, MB; Greenwood, RS (1991). Intraindividual variability of carbamazepine, phenobarbital, and phenytoin concentrations in saliva. *Ther Drug Monit*; 13 (2): 166-71.
- Moore, JW; Flanner, HH (1996). Mathematical comparison of dissolution profiles. *Pharm Technol*; 20 (6): 64-75.
- Neuvonen, PJ (1985). Bioavailability and central side effects of different carbamazepine tablets. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*; 23 (4): 226-32.
- Noyes, AA; Whitney, WR (1897). The rate of solution of solid substances in their own solutions. *J Am Chem Soc*; 19: 930-934.
- Nuwer, MR; Browne, TR; Dodson, WE; Dreifuss, FE; Engel, J, Jr.; Leppik, IE, et al. (1990). Generic substitutions for antiepileptic drugs. *Neurology*; 40 (11): 1647-51.
- O'Hara, T; Dunne, A; Butler, J; Devane, J (1998). A review of methods used to compare dissolution profile data. *Pharmaceutical Science & Technology Today*; 1 (5): 214-223.
- Olling, M; Mensinga, TT; Barends, DM; Groen, C; Lake, OA; Meulenbelt, J (1999). Bioavailability of carbamazepine from four different products and the occurrence of side effects. *Biopharm Drug Dispos*; 20 (1): 19-28.
- Pabst, G; Jaeger, H (1990). Review of methods and criteria for the evaluation of bioequivalence studies. *Eur J Clin Pharmacol*; 38 (1): 5-10.
- Patel, HI; Gupta, GD (1984). A problem of equivalence in clinical trials. *Biometrical Journal*; 26 (5): 471-474.
- Patterson, S (2001). A review of the development of statistical design and analysis techniques for assessing in vivo bioequivalence: Part two. *Ind J Pharm Sci*; 63 (3): 169-186.
- Paxton, JW; Donald, RA (1980). Concentrations and kinetics of carbamazepine in whole saliva, parotid saliva, serum ultrafiltrate, and serum. *Clin Pharmacol Ther*; 28 (5): 695-702.
- Pedersen, SA; Dam, M (1985). [Carbamazepine: are synonymous preparations identical?]. *Ugeskr Laeger*; 147 (34): 2676-7.
- Peeters, K; Adriaenssen, I; Wapenaar, R; Neto, W; Pledger, G (2003). A pooled analysis of adjunctive topiramate in refractory partial epilepsy. *Acta Neurol Scand*; 108 (1): 9-15.
- Pilchik, R (2000). Pharmaceutical Blister Packaging, Part I: Rationale and Materials. *Pharm Technol*; 24 (11): 68-78.
- Plavsic, F; Culig, J; Bakran, I, Jr.; Vrhovac, B (1981). Theophylline concentration in saliva as a guide for individualization of its therapeutic use. *Br J Clin Pharmacol*; 11 (5): 533-4.
- Polli, JE; Rekhi, GS; Shah, VP (1996). Methods to compare dissolution profiles. *Drug Inf J*; 30: 1113-1120.
- Polli, JE; Singh Rekhi, G; Augsburg, LL; Shah, VP (1997). Methods to compare dissolution profiles and a rationale for wide dissolution specifications for Metoprolol Tartrate tablets. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 86 (6): 690-700.

- Posti, J (1982). Saliva-plasma drug concentration ratios during absorption: theoretical considerations and pharmacokinetic implications. *Pharm Acta Helv*; 57 (3): 83-92.
- Potthast, H; Dressman, JB; Junginger, HE; Midha, KK; Oeser, H; Shah, VP, et al. (2005). Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: ibuprofen. *J Pharm Sci*; 94 (10): 2121-31.
- Pynnönen, S (1977). The pharmacokinetics of carbamazepine in plasma and saliva of man. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*; 41 (5): 465-71.
- Ramsay, T; Elkum, N (2005). A comparison of four different methods for outlier detection in bioequivalence studies. *J Biopharm Stat*; 15 (1): 43-52.
- Rasmussen, F (1964). Salivary Excretion of Sulphonamides and Barbiturates by Cows and Goats. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*; 21: 11-9.
- Rescigno, A (1992). Bioequivalence. *Pharm Res*; 9 (7): 925-8.
- Reunanen, M; Heinonen, EH; Nyman, L; Anttila, M (1992). Comparative bioavailability of carbamazepine from two slow-release preparations. *Epilepsy Res*; 11 (1): 61-6.
- Richens, A (1997). Impact of Generic Substitution of Anticonvulsants on the Treatment of Epilepsy. *CNS Drugs*; 8 (2): 124-133.
- Ritschel, WA (1984). What is bioavailability? Philosophy of bioavailability testing. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*; 6 (12): 777-86.
- Ritschel, WA (1987). Aspects for bioavailability and bioequivalence revision: possible implications on clinical pharmacology. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*; 9 (7): 453-9.
- Ritschel, WA; Hussain, SA; Schneider, B; Betzien, G; Kaufmann, B (1985). Evaluation of bioavailability by different methods. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*; 7 (8): 439-49.
- Ritschel, WA; Tompson, GA (1983). Monitoring of drug concentrations in saliva: a non-invasive pharmacokinetic procedure. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*; 5 (8): 511-25.
- Rocke, DM (1984). On testing for bioequivalence. *Biometrics*; 40 (1): 225-30.
- Rodda, BE; Davis, RL (1980). Determining the probability of an important difference in bioavailability. *Clin Pharmacol Ther*; 28 (2): 247-52.
- Rosenbaum, DH; Rowan, AJ; Tuchman, L; French, JA (1994). Comparative bioavailability of a generic phenytoin and Dilantin. *Epilepsia*; 35 (3): 656-60.
- Rosenthal, E; Hoffer, E; Ben-Aryeh, H; Badarni, S; Benderly, A; Hemli, Y (1995). Use of saliva in home monitoring of carbamazepine levels; 36 (1): 72-4.
- Russell, WMS; Burch, RL (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. Available at [http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane\\_exp/het-toc](http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc) [last accessed October 2010]. London.
- Rustichelli, C; Gamberini, G; Ferioli, V; Gamberini, MC; Ficarra, R; Tommasini, S (2000). Solid-state study of polymorphic drugs: carbamazepine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 23 (1): 41-54.
- Rylance, GW; Butcher, GM; Moreland, T (1977). Saliva carbamazepine levels in children. *Br Med J*; 2 (6100): 1481.
- Sachdeo, RC; Belendiuk, G (1987). Generic versus branded carbamazepine. *Lancet*; 1 (8547): 1432.

- Saranadasa, H (2001). Defining similarity of dissolution profiles through Hotteling's T2 statistic. *Pharm Technol*; 25 (2): 46-54.
- Sathe, P; Tsong, Y; Shah, VP (1997). In vitro dissolution profile comparison and IVIVR. Carbamazepine case. *Adv Exp Med Biol*; 423: 31-42.
- Sathe, PM; Tsong, Y; Shah, VP (1996). In-vitro dissolution profile comparison: statistics and analysis, model dependent approach. *Pharm Res*; 13 (12): 1799-803.
- Schall, R (1995). A unified view of individual, population, and average bioequivalence. In: *BIO-International 2. Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies*. H. H. Blume and K. K. Midha Ed. Medpharm Scientific, Stuttgart. Pp. 91-106
- Schall, R; Endrenyi, L (2010). Bioequivalence: tried and tested. *Cardiovasc J Afr*; 21 (2): 69-71.
- Schall, R; Endrenyi, L; Ring, A (2010). Residuals and outliers in replicate design crossover studies. *J Biopharm Stat*; 20 (4): 835-49.
- Schall, R; Luus, HG (1992). Comparison of absorption rates in bioequivalence studies of immediate release drug formulations. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*; 30 (5): 153-9.
- Schall, R; Luus, HG (1993). On population and individual bioequivalence. *Stat Med*; 12 (12): 1109-24.
- Schall, R; Williams, RL (1996). Towards a practical strategy for assessing individual bioequivalence. Food and Drug Administration Individual Bioequivalence Working Group. *J Pharmacokinet Biopharm*; 24 (1): 133-49.
- Schuurmann, DJ (1987). A comparison of the two one-sided tests procedure and the power approach for assessing the equivalence of average bioavailability. *J Pharmacokinet Biopharm*; 15 (6): 657-80.
- Schumaker, R; Metzler, C (1998). The phenytoin trial is a case study of individual bioequivalence. *Drug Inf J*; 32: 1063-1072.
- Selwyn, MR; Dempster, AP; Hall, NR (1981). A Bayesian approach to bioequivalence for the 2 x 2 changeover design. *Biometrics*; 37 (1): 11-21.
- Selwyn, MR; Hall, NR (1984). On Bayesian methods for bioequivalence. *Biometrics*; 40 (4): 1103-8.
- Shah, VP; Midha, KK; Dighe, S; McGilveray, IJ; Skelly, JP; Yacobi, A, et al. (1991). Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*; 16 (4): 249-55.
- Shah, VP; Riegelman, S (1974). GLC determination of theophylline in biological fluids. *J Pharm Sci*; 63 (8): 1283-5.
- Shah, VP; Tsong, Y; Sathe, P; Liu, JP (1998). In vitro dissolution profile comparison--statistics and analysis of the similarity factor, f2. *Pharm Res*; 15 (6): 889-96.
- Shah, VP; Yacobi, A; Barr, WH; Benet, LZ; Breimer, D; Dobrinska, MR, et al. (1996). Evaluation of orally administered highly variable drugs and drug formulations. *Pharm Res*; 13 (11): 1590-4.
- Shah, VP; Yamamoto, LA; Schuurman, D; Elkins, J; Skelly, JP (1987). Analysis of in vitro dissolution of whole vs. half controlled-release theophylline tablets. *Pharm Res*; 4 (5): 416-9.

- Shargel, L; Yu, ABC (1993). Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics. Prentice-Hall International, London [etc.].
- Sheiner, LB (1992). Bioequivalence revisited. *Stat Med*; 11 (13): 1777-88.
- Shimada, M; Takahashi, K; Ohkawa, T; Segawa, M; Higurashi, M (1995). Determination of salivary cortisol by ELISA and its application to the assessment of the circadian rhythm in children. *Horm Res*; 44: 213-217.
- Shrank, WH; Hoang, T; Ettner, SL; Glassman, PA; Nair, K; DeLapp, D, et al. (2006). The implications of choice: prescribing generic or preferred pharmaceuticals improves medication adherence for chronic conditions. *Arch Intern Med*; 166 (3): 332-7.
- Siegel, IA; Ben-Aryeh, H; Gozal, D; Colin, AA; Szargel, R; Laufer, D (1990). Comparison of unbound and total serum theophylline concentrations with those of stimulated and unstimulated saliva in asthmatic children. *Ther Drug Monit*; 12 (5): 460-4.
- Silpakit, O; Amornpichetkoon, M; Kaojarern, S (1997). Comparative study of bioavailability and clinical efficacy of carbamazepine in epileptic patients. *Ann Pharmacother*; 31 (5): 548-52.
- Silva, MdF; Schramm, SG; Kano, EK; Koono, EEM; Porta, V; dos Reis Serra, CH (2010). Bioequivalence evaluation of single doses of two tramadol formulations: A randomized, open-label, two-period: Crossover study in healthy brazilian volunteers. *Clin Ther*; 32 (4): 758-765.
- Smith, M; Whitehead, E; O'Sullivan, G; Reynolds, F (1991). A comparison of serum and saliva paracetamol concentrations. *Br J Clin Pharmacol*; 31 (5): 553-5.
- Spitz, MC (1998). Injuries and death as a consequence of seizures in people with epilepsy. *Epilepsia*; 39 (8): 904-7.
- Steinijans, VW; Diletti, E (1983). Statistical analysis of bioavailability studies: parametric and nonparametric confidence intervals. *Eur J Clin Pharmacol*; 24 (1): 127-36.
- Steinijans, VW; Eicke, R; Ahrens, J (1982). Pharmacokinetics of theophylline in patients following short-term intravenous infusion. *Eur J Clin Pharmacol*; 22 (5): 417-22.
- Steinijans, VW; Hauschke, D; Jonkman, JH (1992). Controversies in bioequivalence studies. *Clin Pharmacokinet*; 22 (4): 247-53.
- Stephen, KW; McCrossan, J; Mackenzie, D; Macfarlane, CB; Speirs, CF (1980). Factors determining the passage of drugs from blood into saliva. *Br J Clin Pharmacol*; 9 (1): 51-5.
- Suzuki, Y; Cox, S; Hayes, J; Walson, PD (1991). Carbamazepine age-dose ratio relationship in children. *Ther Drug Monit*; 13 (3): 201-8.
- Systat<sup>®</sup> 12 Statistics I\_II\_III\_IV (2007). San Jose, CA.
- The United States Pharmacopeia 31 (2008). United States Pharmacopeia Convention, Rockville, MD.
- Thijssen, JH; Gispens-de Wied, CC; van Heeswijk, GM; Veeman, W (1996). Determination of dexamethasone in saliva. *Clin Chem*; 42 (8 Pt 1): 1238-42.
- Tothfalusi, L; Endrenyi, L; Arieta, AG (2009). Evaluation of bioequivalence for highly variable drugs with scaled average bioequivalence. *Clin Pharmacokinet*; 48 (11): 725-43.

- Tsang, YC; Pop, R; Gordon, P; Hems, J; Spino, M (1996). High variability in drug pharmacokinetics complicates determination of bioequivalence: experience with verapamil. *Pharm Res*; 13 (6): 846-50.
- Tsong, Y; Hammerstrom, T; Sathe, P; Shah, VP (1996). Statistical assessment of mean difference between two dissolution data sets. *Drug Inf J*; 30: 1105-1112.
- Tsume, Y; Amidon, GL (2010). The biowaiver extension for BCS class III drugs: the effect of dissolution rate on the bioequivalence of BCS class III immediate-release drugs predicted by computer simulation. *Mol Pharm*; 7 (4): 1235-43.
- Tubic-Grozdanis, M; Bolger, MB; Langguth, P (2008). Application of gastrointestinal simulation for extensions for biowaivers of highly permeable compounds. *Aaps J*; 10 (1): 213-26.
- Tucker, GT; Boas, RA (1971). Pharmacokinetic aspects of intravenous regional anesthesia. *Anesthesiology*; 34 (6): 538-49.
- Tucker, GT; Mather, LE (1975). Pharmacology of local anaesthetic agents. Pharmacokinetics of local anaesthetic agents. *Br J Anaesth*; 47 suppl: 213-24.
- Uden, DL; Miller, KW; Strand, LM; Johnson, PB; Zaske, DE (1981). Saliva-serum theophylline concentrations: substantial inpatient and outpatient variation in predicting serum concentrations. *Ther Drug Monit*; 3 (2): 143-50.
- US Congressional Budget Office (1998). How Increased Competition from Generic Drugs has Affected Prices and Returns in the Pharmaceutical Industry. US Government Printing Office, Washington, DC.
- Vázquez, M; Fagiolino, P; Rubio, M; Maletta-Fraile, L (1993). Bioequivalence study between two conventional tablets of carbamazepine using saliva as biological fluid. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet (Special Issue B)*: 164-8.
- Veng-Pedersen, P; Gobburu, JV; Meyer, MC; Straughn, AB (2000). Carbamazepine level-A in vivo-in vitro correlation (IVIVC): a scaled convolution based predictive approach. *Biopharm Drug Dispos*; 21 (1): 1-6.
- Vining, RF; McGinley, RA (1986). Hormones in saliva. *Crit Rev Clin Lab Sci*; 23 (2): 95-146.
- Volonté, MG; Viñas, MA; Buschiazzi, PM; Piersante, MV; Escalles, MC; Gorriti, C (2004). Estudio comparativo de comprimidos con 200 mg de Carbamazepina para determinar Equivalencia Farmacéutica. *Acta Farm Bonarense*; 23 (3): 391-397.
- Wang, JT; Shiu, GK; Ong-Chen, T; Viswanathan, CT; Skelly, JP (1993). Effects of humidity and temperature on in vitro dissolution of carbamazepine tablets. *J Pharm Sci*; 82 (10): 1002-5.
- Wang, W; Chow, SC (2003). Examining outlying subjects and outlying records in bioequivalence trials. *J Biopharm Stat*; 13 (1): 43-56.
- Wang, W; Gene Hwang, JT (2001). A nearly unbiased test for individual bioequivalence problems using probability criteria. *Journal of Statistical Planning and Inference*; 99 (1): 41-58.
- Watson, DG (2005). *Pharmaceutical analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*. Churchill Livingstone, Edinburgh [etc.].
- Welty, TE; Pickering, PR; Hale, BC; Arazi, R (1992). Loss of seizure control associated with generic substitution of carbamazepine. *Ann Pharmacother*; 26 (6): 775-7.

- Westenberg, HG; de Zeeuw, RA; van de Kleijn, E; Oei, TT (1977). Relationship between carbamazepine concentrations in plasma and saliva in man as determined by liquid chromatography. *Clin Chim Acta*; 79 (1): 155-61.
- Westlake, WJ (1972). Use of confidence intervals in analysis of comparative bio-availability trials. *J Pharm Sci*; 61 (8): 1340-1.
- Westlake, WJ (1976). Symmetrical confidence intervals for bioequivalence trials. *Biometrics*; 32 (4): 741-4.
- WHO (2004). World Health Organization. The World medicines situation. Gêneva.
- WHO (2006). Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability. 40th Report of the WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations - WHO Technical Report Series No. 937: 347-390.
- WHO (2010). Pharmaceutical development for multisource (generic) pharmaceutical products.
- Wilches, L; Peláez, C; Barbé, C; Halbaut, L; Aróztegui, M (2003). Re-embasado de medicamentos en dispositivos multicompartimentales de ayuda al cumplimiento terapéutico (STD, DMA o CAD): Permeabilidad a la humedad de dispositivos termosellados. *Pharm Care Esp*; 5: 151-158.
- Wilder, BJ; Leppik, I; Hietpas, TJ; Cloyd, JC; Randinitis, EJ; Cook, J (2001). Effect of food on absorption of Dilantin Kapseals and Mylan extended phenytoin sodium capsules. *Neurology*; 57 (4): 582-9.
- Wilner, AN (2004). Therapeutic equivalency of generic antiepileptic drugs: results of a survey. *Epilepsy Behav*; 5 (6): 995-8.
- Wolf, P; May, T; Tiska, G; Schreiber, G (1992). Steady state concentrations and diurnal fluctuations of carbamazepine in patients after different slow release formulations. *Arzneimittelforschung*; 42 (3): 284-8.
- World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. (2004). *J Int Bioethique*; 15 (1): 124-9.
- Yacobi, A; Masson, E; Moros, D; Ganes, D; Lapointe, C; Abolfathi, Z, et al. (2000). Who needs individual bioequivalence studies for narrow therapeutic index drugs? A case for warfarin. *J Clin Pharmacol*; 40 (8): 826-35.
- Yazdaniyan, M; Briggs, K; Jankovsky, C; Hawi, A (2004). The "high solubility" definition of the current FDA Guidance on Biopharmaceutical Classification System may be too strict for acidic drugs. *Pharm Res*; 21 (2): 293-9.
- Young, WW; Suryanarayanan, R (1991). Kinetics of transition of anhydrous carbamazepine to carbamazepine dihydrate in aqueous suspensions. *J Pharm Sci*; 80 (5): 496-500.
- Yu, LX; Straughn, AB; Faustino, PJ; Yang, Y; Parekh, A; Ciavarella, AB, et al. (2004). The effect of food on the relative bioavailability of rapidly dissolving immediate-release solid oral products containing highly soluble drugs. *Mol Pharm*; 1 (5): 357-62.
- Zapater, P; Horga, JF (1999). [Bioequivalence and generic drugs. I. Studies of bioequivalence, considering the theoretical basis, design and use]. *Rev Neurol*; 29 (12): 1235-46.
- Zuidema, J; van Ginneken, CA (1983). Clearance concept in salivary drug excretion. Part I: theory. *Pharm Acta Helv*; 58 (3): 88-93.

---

---

# ■ Anexos





# Anexo I

## Equipamiento

### Cromatografía

Las determinaciones por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) fueron realizadas en un cromatógrafo Gilson, equipado con un sistema de bombeo doble modelo 322-H2, un detector UV-Visible modelo 156, una interfaz modelo 506C y una estación de trabajo operada con el software UniPoint LC versión 3.3 (Gilson SAS, Villiers-Le-Bel, Francia). Se utilizó un inyector manual Rheodyne, modelo 7725, con loop fijo de 20 µl (Rheodyne, CA, EE.UU.).

### Espectrofotometría UV-Visible

Las determinaciones se realizaron en un espectrofotómetro ThermoSpectronic, modelo Helios-beta (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Intervalo de trabajo: 194,0-1100,0 nm. Ancho de banda: fijo, de 2,0 nm.

### Ensayos de Disolución

Los ensayos de disolución se llevaron a cabo en un equipo de disolución Sotax AT 7 (Sotax AG, Basilea, Suiza), que posee sistema de muestreo manual y un baño con capacidad para siete vasos.

### Otros equipos

- **Balanza:** Mettler Toledo, modelo AG 204 (Mettler-Toledo AG, Greinfensee, Suiza). Precisión: 0,1 mg. Capacidad máxima: 210 g.

- **Sonicador:** Branson, modelo DTH-2210, equipado con reloj digital y calefactor. Volumen: 2,8 l. Potencia RF: 125 W. Potencia calorífica: 109 W.

- **Centrífugas:** para tubos de 10-15 ml de capacidad se empleó una centrifuga Presvac, modelo DCS-16 (Presvac SRL, Buenos Aires, Argentina). Velocidad máxima: 3500 rpm. Para tubos tipo eppendorf de capacidad 1,5 ml se utilizó una centrifuga Gelec, modelo G-130D (Compañía Científica SRL, Buenos Aires, Argentina). Velocidad máxima: 14000 rpm.

- **pH-Metro:** Altronix, modelo TPX (SAEN SRL, Buenos Aires, Argentina). Rango de medida: 0,0-14,0 de pH. Resolución: 0,01.

- **Evaporador por corriente de N<sub>2</sub>:** se trata de un equipo artesanal, compuesto por un tubo de N<sub>2</sub> conectado a un peine de vidrio hueco. El N<sub>2</sub> vientea por las terminaciones del peine, que se encuentran introducidas en los tubos de ensayo con el solvente a evaporar, y que a su vez se sumergen en un baño de agua a la temperatura deseada.



## Anexo II

### Producción científica

#### Trabajos publicados en revistas internacionales con referato

1.  
“Dissolution studies of generic medications: New evidence of deviations from the Transitivity principle”  
Ruiz, ME; Gregorini, A; Talevi, A; Volonté, MG  
Aceptado para su publicación en *Dissolution Technologies* (2011)
2.  
“Is saliva suitable as the biological fluid in relative bioavailability studies? Analysis of its performance in a 4x2 replicate crossover design”  
Ruiz, ME; Volonté, MG; M. de Buschiazzo, P; Fagiolino, P  
*European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* (2011)  
DOI: 10.1007/s13318-011-0051-z
3.  
“The use of saliva as biological fluid in relative bioavailability studies: comparison and correlation with plasma results”  
Ruiz, ME; Conforti, P; Fagiolino, P; Volonté, MG  
*Biopharm Drug Dispos* 31: 476-485 (2010)

## Trabajos presentados en Congresos

### Nacionales

1.

“Control de calidad de comprimidos de Oxcarbazepina 600 mg y comparación de perfiles de disolución”

Ruiz, ME; Gregorini, A; Volonté, MG

XX Congreso Farmacéutico Argentino. COFA 2011

Potrero de los Funes, San Luis, agosto de 2011

2.

“Biodisponibilidad Individual vs. Biodisponibilidad Media: un ejemplo para Fenitoína”

Ruiz, ME; Fagiolino, P; M. de Buschiazzo, P; Volonté, MG

VI Congreso y Exposición de Tecnología Farmacéutica. ETIF 2010

Buenos Aires, octubre de 2010

3.

“Estudio de Biodisponibilidad Relativa en saliva de dos formulaciones de Fenitoína 100 mg, cápsulas de liberación inmediata”

Ruiz, ME; Fagiolino, P; M. de Buschiazzo, P; Volonté, MG

X Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial. JorFyBI 2009

Buenos Aires, octubre de 2009

4.

“Genéricos, similares y sustitución: el problema de la transitividad”

Ruiz, ME; Gregorini, A; Talevi, A; Volonté, MG

X Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial. JorFyBI 2009

Buenos Aires, octubre de 2009

5.

“Desarrollo y validación de una metodología analítica por HPLC aplicable al monitoreo terapéutico de Carbamazepina en plasma humano”

Ruiz, ME; Conforti, P; Volonté, MG

XVIII Congreso Farmacéutico Argentino. COFA 2007

Mendoza, octubre de 2007

## Internacionales

6.

“Estudio de Biodisponibilidad Relativa en saliva de dos formulaciones de Carbamazepina 200 mg. Comparación con datos in vitro”

Ruiz, ME; Alvariza, S; Conforti, P; Fagiolino, P; Volonté, MG

XII Congreso de la Federación Sudamericana. FEFAS 2008

Montevideo, noviembre de 2008

7.

“Estudio comparativo de los perfiles de disolución de comprimidos conteniendo Carbamazepina 200 mg”

Alvariza, S; Ruiz, ME; Perdomo, V; González, N

XIII Jornadas Rioplatenses de Farmacia Hospitalaria

Montevideo, noviembre de 2007



## Anexo III

### Protocolos de los estudios con pacientes/voluntarios y su aprobación por el Comité de Ética

#### I. Monitorización de niveles plasmáticos y salivales de CBZ en pacientes

TITULO DEL ESTUDIO: “Intercambiabilidad de medicamentos bioequivalentes: desde la farmacocinética a la terapéutica”

El presente estudio clínico se llevará a cabo según un protocolo adecuado, acorde con las disposiciones de ANMAT, sobre el Régimen de buenas prácticas de investigación en estudios de Farmacología Clínica (Disposición 5330/97), y en estudios de Bioequivalencia (Disposición 3185/99 y Disposición 3598/02). Se desarrollará siguiendo las GCPs (Buenas Prácticas Clínicas), propuestas por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), que se basan en la documentación existente sobre el tema, generada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), y la Conferencia Internacional de Armonización (ICH). Así mismo, serán respetados los principios éticos originados por la Declaración de Helsinki.

El lenguaje que se ha utilizado en este modelo de consentimiento informado es práctico, simple y coloquial, comprensible para una persona de cualquier nivel de escolaridad. En el caso de que el voluntario no entendiera alguna terminología, los investigadores le explicarán su significado.

Este modelo consta de dos partes:

1. Información para el voluntario.
2. Modelo de Consentimiento para la firma

#### 1. INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE

Lo invitamos a formar parte de un estudio clínico en el cual participan solamente las personas que por libre voluntad desean hacerlo. A continuación, le proporcionaremos la información necesaria para que usted comprenda las características del estudio.

#### Objetivos

En este estudio se compararán los niveles en sangre y en saliva, de la droga con la que Ud. se encuentra medicado (Carbamacepina), utilizando comprimidos de dos marcas distintas, para analizar los efectos que este intercambio pueda tener.

#### Diseño del estudio

Para ser aceptado como participante de este estudio el único requisito es que se encuentre medicado con Carbamacepina 200 mg.

Usted recibirá su medicación en forma habitual, a través de la farmacia del hospital, en cantidad necesaria para 30 días. En este período, deberá acudir al hospital

dos veces, una la tercera y otra la cuarta semana, para realizarse una extracción de sangre y de saliva cada vez.

Cuando acuda para la segunda extracción se le volverá a entregar su medicación para otros 30 días, en los que se repetirá el esquema de dos extracciones, en la séptima y octava semana nuevamente.

Es muy importante que Ud. tome los comprimidos entregados y no otros que pudiera tener en su domicilio.

La duración total del estudio será de 8 semanas aproximadamente, las primeras cuatro tomando una medicación y realizando dos extracciones, y las cuatro semanas restantes tomando otra medicación y realizando dos extracciones más. La última vez que acuda al hospital se le entregará la medicación para que continúe su tratamiento normalmente.

Los días de extracción deberá concurrir al hospital a las 10:00 horas aproximadamente, con un ayuno no menor a 2 horas. Lo más importante de la hora de extracción es que sea siempre antes de una toma de medicamento.

Se le extraerá una muestra de sangre (aprox. 5 ml) y otra de saliva (aprox. 2 ml).

Los gastos ocasionados por su traslado (ida y vuelta) al hospital los cuatro días de extracción, serán cubiertos por el equipo de investigación.

#### Posibles riesgos y/ o molestias

Debido a que el presente estudio se realiza con la medicación que Ud. toma habitualmente, no presenta riesgos ni molestias adicionales a los que normalmente le produce su medicamento. Por otro lado, la Carbamacepina es una droga bien tolerada. La mayoría de las reacciones adversas se manifiestan cuando se administran dosis muy altas de este medicamento y se dan principalmente al comienzo del tratamiento, desapareciendo solas con el paso del tiempo.

#### Posibles beneficios

Esperamos que la información que se obtenga como resultado de esta investigación beneficie en el futuro a Ud. y a los demás pacientes tratados con Carbamacepina.

#### Derechos del voluntario:

La participación en este estudio es voluntaria. Usted puede escoger no participar o puede abandonar el estudio en cualquier momento, sin tener que dar una razón. El equipo de investigación puede decidir dar por terminada su participación en el caso de que Ud. no cumpla con la conducta a seguir antes y durante el estudio, detallada en el diseño del estudio.

En cualquier caso Ud. seguirá recibiendo su medicación en forma habitual.

## 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por la presente presto mi consentimiento para participar voluntariamente en el presente estudio, donde se me extraerán cuatro muestras de sangre y cuatro de saliva durante mi tratamiento habitual con Carbamacepina 200 mg, comprimidos.

Declaro que he tenido tiempo suficiente para leer y analizar toda la información referida a las características y objetivos del estudio, y que me han respondido satisfactoriamente todas mis inquietudes.

Mi participación es voluntaria y si me negara a participar o me retirara antes de finalizar el estudio no recibiré ningún tipo de sanción y tampoco perderé alguno de mis derechos. Podrán presentarse circunstancias que provoquen que los investigadores me retiren del estudio sin mi consentimiento, las que se deberán al incumplimiento de las premisas exigidas.

También entiendo que todas las muestras que se obtengan durante este estudio (muestras de sangre y saliva) serán utilizadas para la investigación. No se realizarán estudios genéticos en ninguna de las muestras recolectadas.

Autorizo a los investigadores que realizan este estudio, al Comité de Revisión y Ética y a las Autoridades Sanitarias a tener acceso a mis registros médicos.

Firma del Voluntario: .....

Nombre y Apellido: .....

Domicilio: .....

Documento: .....

Lugar y Fecha: .....

Firma del Investigador: .....

Nombre y Apellido: .....

Domicilio: .....

Documento: .....

Lugar y Fecha: .....

Se firmarán 2 copias, una para el equipo de investigación y otra para el voluntario.



Avenida 51 entre 29 y 30 – 1900 – La Plata – Buenos Aires – Argentina  
Departamento de Docencia e Investigación: Comité de Bioética – Teléfono 0221-4535000 internos 307 – E-mail docencia@netverk.com.ar

La Plata, 29 de Agosto de 2006

Por la presente le informo que este Comité ha evaluado y aprobado el Protocolo correspondiente al Proyecto **“Intercambialidad de Medicamentos Bioequivalentes: desde la farmacocinética a la terapéutica”** realizado en el Hospital Prof. Dr. Rodolfo Rossi y en la Cátedra de Control de Calidad de Medicamentos de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP).

Adjunto encontrará la lista de miembros de este Comité que participó de la revisión y aprobación de la documentación presentada.

Atentamente.

**Coordinador:** Dr. Julio C. Brolese  
Dr. Jorge Binetti  
Dr. Ricardo J. Cerdá  
Filos. Marta Pérez  
Lic. Fernando Poletta  
Dr. Alfredo Uranga

Dr. Julio C. Brolese

Coordinador  
Comité de Bioética

## II. Estudio de Biodisponibilidad Relativa de comprimidos de CBZ 200 mg en voluntarios sanos

TITULO DEL ESTUDIO: “Estudio de Biodisponibilidad Relativa entre distintas formulaciones sólidas orales de Carbamazepina 200 mg, administradas en dosis única y monitorizadas en saliva”

El presente estudio clínico se llevará a cabo según un protocolo adecuado, acorde con las disposiciones de ANMAT, sobre el Régimen de buenas prácticas de investigación en estudios de Farmacología Clínica (Disposición 5330/97), y en estudios de Bioequivalencia (Disposición 3185/99 y Disposición 3598/02). Se desarrollará siguiendo las GCPs (Buenas Prácticas Clínicas), propuestas por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), que se basan en la documentación existente sobre el tema, generada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), y la Conferencia Internacional de Armonización (ICH). Así mismo, serán respetados los principios éticos originados por la Declaración de Helsinki.

El lenguaje que se ha utilizado en este modelo de consentimiento informado es práctico, simple y coloquial, comprensible para una persona de cualquier nivel de escolaridad. En el caso de que el voluntario no entendiera alguna terminología, los investigadores le explicarán su significado.

Este modelo consta de dos partes:

1. Información para el voluntario.
2. Modelo de Consentimiento para la firma

### 1. INFORMACIÓN PARA EL VOLUNTARIO

#### Introducción

Lo invitamos a formar parte de un estudio clínico (un tipo de estudio de investigación), en el cual participan solamente las personas que por libre voluntad desean hacerlo. Esté seguro de su decisión sobre participar en esta investigación. A continuación, le proporcionaremos la información requerida para que usted comprenda las características del estudio, dedique el tiempo que necesite para leerla con atención y consulte si así lo desea con su familia, amigos y médico general o de familia.

#### Objetivos

El objetivo de este estudio es comparar los niveles de una droga en saliva y el tiempo en el cual se alcanza la máxima concentración, es decir su Biodisponibilidad, después de administrar un comprimido conteniendo dicha droga, en medicamentos de diferentes marcas.

#### Características de la droga en evaluación

La droga utilizada en este estudio es Carbamazepina, que se usa para el tratamiento de crisis epilépticas. La epilepsia es una afección caracterizada por ataques

repetidos. Tales ataques se producen cuando los mensajes del cerebro hacia los músculos no son debidamente transmitidos por las vías nerviosas del organismo. Carbamazepina contribuye al control de la transmisión de estos mensajes. Se emplea así mismo, contra algunas enfermedades neurológicas y ciertas condiciones psiquiátricas tales como un trastorno llamado manía y un determinado tipo de depresión.

#### Protocolo del estudio

El estudio se realizará sobre 8 voluntarios sanos, con edades entre 18 y 50 años, divididos en dos grupos.

Si Ud. acepta integrar uno de estos grupos recibirá en dos ocasiones un comprimido de cada uno de los medicamentos, con un intervalo de 15 días entre cada toma, para permitir que la dosis previa se haya eliminado del organismo.

La duración total del estudio será de 3 semanas, durante las cuales será evaluado ambulatoriamente hasta las 48 horas de recibida la medicación. Esta metodología se repetirá cada vez que tome el medicamento, es decir dos en total.

Ud. será asignado al azar a uno de los grupos, al azar significa que lo colocan en un grupo el cual es determinado a la suerte.

Si Ud. decide participar en esta investigación será evaluado por un médico, quien le indicará una serie de análisis bioquímicos y le realizará un examen clínico, para la detección de síntomas, signos, y/o patologías asociadas, a través del llenado de una planilla confeccionada a tal fin, y verificará si reúne los requisitos necesarios para participar del estudio.

Para ser aceptado como voluntario, debe reunir ciertas condiciones que se detallan a continuación:

- Ser una persona sana, entre 18 y 50 años de edad
- No fumador, sin historia de alcoholismo o abuso de drogas.
- Tener un peso normal
- Exámenes bioquímicos normales
- HIV negativo
- Test de embarazo negativo (para voluntarios de sexo femenino)

Los criterios de exclusión comprenden:

- Anormalidad en alguno de los exámenes realizados
- Obesos / Desnutridos
- Enfermedades asociadas
- Embarazo o amamantamiento (en voluntarios de sexo femenino)
- Antecedentes de Alergia
- Participación en otro estudio clínico como voluntario en los últimos 30 días.
- Donación de sangre dentro de los últimos 3 meses.
- Ingesta crónica de medicamentos
- Ingesta de cualquier medicamento en la semana previa al estudio
- Adicciones a drogas
- Ingesta de alimentos asados al carbón en la semana previa al estudio
- Ingesta de alcohol 48 horas antes del estudio
- Ingesta de té, mate, café, 24 horas antes del estudio

- Actividad física intensa 24 horas antes del estudio

Aquellos voluntarios que no reúnan los requisitos necesarios para participar en el estudio debido a que se ha detectado alguna anomalía o patología al realizarle los exámenes correspondientes serán derivados dentro del centro de salud para que reciban el tratamiento correspondiente.

Durante los períodos de toma de muestras:

- No podrá realizar actividad física
- Deberá consumir una dieta equilibrada, normocalórica, igual a la de los demás voluntarios.
- No consumirá tabaco, alcohol, medicamentos
- No ingerirá alimentos o bebidas que puedan alterar la función circulatoria, gastrointestinal, hepática o renal (por ejemplo, té, café, mate, etc.)

El día del inicio del estudio, deberá concurrir al hospital a las 07.00 horas, con un ayuno no menor a 12 horas.

Luego de permanecer en reposo durante 60 minutos, se le extraerá una muestra de saliva (hora cero), previamente a la ingesta de un comprimido de 200 mg de Carbamazepina (de la marca que le haya tocado al azar), con una cantidad constante de agua, por ejemplo 150 ml. Inmediatamente después de la administración deberá enjuagarse exhaustivamente la boca con agua. Las tomas de muestra se repetirán a los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 10, 12, 24, 36 y 48 horas de haber recibido una dosis única del medicamento. En caso de ser necesario, podrá masticar para-film para facilitar la producción de saliva.

Es decir, se le realizarán 17 muestreos en total para cada período de evaluación:

14 durante el primer día, y 3 más en los días siguientes, de forma ambulatoria.

Durante los dos días que dura el estudio en cada ciclo, Ud. tendrá un control clínico para identificar la aparición de cualquier reacción adversa, que pueda estar relacionado con el uso de la Carbamazepina. Se le realizarán controles de presión arterial y la frecuencia del pulso cada hora, durante las primeras cuatro horas.

Posibles riesgos y/ o molestias

Mientras esté participando en este estudio, usted podría presentar algún efecto secundario del medicamento. Sin embargo, la Carbamazepina es una droga bien tolerada. La mayoría de las reacciones adversas se manifiestan cuando se administran dosis muy altas de este medicamento y se dan principalmente al comienzo del tratamiento, desapareciendo solas con el paso del tiempo. Tenga en cuenta que en este estudio Ud. recibirá una dosis terapéutica única de cada medicamento a evaluar, por lo que sería muy poco probable que aparezcan efectos adversos, dado que los mismos suelen ocurrir durante tratamientos prolongados.

Además, Ud. recibirá atención médica y un control clínico para identificar la aparición de algún evento adverso. Si durante el período ambulatorio, Ud. advierte algún síntoma que lo preocupe, puede comunicarse con el centro de Investigación, y será atendido inmediatamente.

A continuación se detallan estos efectos adversos, ordenados según el sistema u órgano que puedan afectar:

**Sistema Cardiovascular:** Se han reportado unos pocos casos de bloqueo aurículo-ventricular reversible (trastorno cardíaco), bradicardia (pulso lento) y arritmia (latidos cardíacos irregulares), y un caso de insuficiencia cardíaca congestiva (disminución de la capacidad de funcionamiento del corazón). Además raramente se han observado trastornos de la conducción cardíaca, hipertensión (presión arterial alta) o hipotensión (presión arterial baja), agravamiento de la coronariopatía (trastorno de las arterias cardíacas), tromboflebitis (inflamación de las venas de las piernas producida por la presencia de un coágulo sanguíneo) y tromboembolia (bloqueo de un vaso sanguíneo debido a la obstrucción producida por un cuerpo extraño que puede ser por ejemplo un coágulo).

**Aparato Respiratorio:** Hipersensibilidad pulmonar caracterizada por fiebre, dificultad para respirar, neumonía (muy raro).

**Sistema Nervioso:** Los más frecuentes son somnolencia, visión borrosa o doble, fatiga, nistagmo (movimientos involuntarios de los ojos en varios sentidos), vértigo, dolor de cabeza, dificultad para moverse, mareos. Raramente se han presentado movimientos involuntarios anormales, por ejemplo temblores y tics, trastornos del habla, debilidad muscular, entumecimiento u hormigueo de las extremidades, alucinaciones, pérdida del apetito, nerviosismo, agitación, conducta agresiva u otros cambios del humor o mentales.

**Sistema endocrino y metabolismo:** La Carbamazepina puede causar ocasionalmente retención de líquidos, disminución de los niveles de sodio en sangre y aumento de peso. En pocos casos se han reportado variaciones de las concentraciones de hormonas tiroideas, aumento de los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre y disminución del calcio plasmático que puede dar lugar a problemas óseos.

**Sangre:** En el 20% de los pacientes se ha observado durante los primeros meses de tratamiento, una disminución de la cantidad de glóbulos blancos, y menos frecuentemente un descenso en el número de plaquetas. También se han reportado algunos tipos de anemia.

**Hígado:** Se han presentado casos de hepatitis y alteraciones de las enzimas hepáticas.

**Sistema Gastrointestinal:** Los efectos más comunes son náuseas, vómitos, sequedad de boca, y ocasionalmente se ha observado diarrea, estreñimiento y dolor abdominal.

**Sistema Urogenital:** Puede producir una disminución de la función renal (muy raro) y alteraciones tales como oscurecimiento de la orina, necesidad frecuente de orinar, descenso del volumen de orina. En casos aislados se ha observado impotencia y otros trastornos sexuales.

**Piel y Anexos:** Los más frecuentes son reacciones alérgicas que pueden ser graves y picazón. Ocasionalmente se ha presentado dermatitis exfoliativa (descamación de la piel), síndrome de Stevens-Johnson (enfermedad inflamatoria que afecta las mucosas de labios, ojos y nariz y puede estar acompañada de fiebre). Además, se han observado en muy pocos casos la aparición de hematomas inexplicables, enrojecimiento y manchas en la piel, acné y caída de cabello.

Reacciones de hipersensibilidad: Son relativamente comunes. En general se manifiestan con alteraciones en la piel, pero se han informado casos en los que han resultado afectados la médula ósea, el hígado, el corazón, los pulmones y el sistema gastrointestinal.

Sistema óseo y muscular: Se han reportado ocasionalmente dolores articulares, musculares y calambres.

Órganos sensoriales: Muy raros: trastornos auditivos, del gusto y conjuntivitis. La Carbamazepina es carcinógena en la rata, aunque no se han reportado estudios que demuestren que lo sea en el ser humano.

#### Posibles beneficios

Esperamos que la información que se obtenga como resultado de esta investigación beneficien en el futuro a los pacientes tratados con Carbamazepina.

#### Derechos del voluntario

##### Participación voluntaria y retiro

La participación en este estudio es voluntaria. Usted puede escoger no participar o puede abandonar el estudio en cualquier momento, sin tener que dar una razón. Ud. no tiene obligación de finalizar el estudio, pero desearíamos que así lo hiciese. El retirarse del estudio no le representará ninguna penalidad.

##### Notificación de nuevos hallazgos

Ud. será informado durante todo el ensayo de cualquier evento que se produzca o cualquier nueva información relevante ocurrida durante el transcurso del estudio que pudiera afectar su salud, bienestar o interés por continuar en el estudio.

##### Salida del estudio

El equipo de investigación puede decidir dar por terminada su participación en el caso de que Ud. no cumpla con la conducta a seguir antes y durante el estudio, detallada en el diseño del estudio (no realizar actividad física, no consumir café, té, mate, etc).

##### Confidencialidad

Todos los datos obtenidos en el ensayo con relación a su persona serán custodiados, garantizando discreción y confidencialidad sobre su identificación y para esto en la documentación generada en el ensayo clínico sólo se recogerán las iniciales de sus nombres y apellidos.

Los miembros del comité de Revisión y de Ética y las Autoridades Sanitarias tendrán libre acceso a su Historia Clínica para la verificación de los procedimientos y/ o datos del ensayo clínico sin violar su confidencialidad hasta donde lo permitan las leyes y regulaciones aplicables. Al firmar este consentimiento usted está autorizando dicho acceso.

##### Pago por Participación

La participación es voluntaria, no habiendo un pago por la misma.

Costos

No hay costos adicionales para usted al participar en este estudio.

Preguntas/ Contactos

Si durante el curso del estudio Ud. tiene preguntas acerca de la naturaleza del mismo o sobre sus derechos o cree que ha sufrido una lesión relacionada con el estudio clínico o necesita tratamiento médico de emergencia, debe contactar al médico encargado de la investigación.

No firme el formulario de consentimiento a menos que Ud. haya tenido la oportunidad de realizar preguntas y obtenido respuestas satisfactorias a las mismas. Su consentimiento debe ser dado voluntariamente, sin coerción o forzado.

Ud. debe recibir y conservar en su poder un original de la hoja de información y del formulario de consentimiento escrito firmado.

2. CONSENTIMIENTO PARA LA FIRMA

Por la presente presto mi consentimiento para participar como voluntario en el presente Estudio de Biodisponibilidad Relativa, donde se me administrarán 200 mg de Carbamazepina, en comprimidos. Declaro que he tenido tiempo suficiente para leer y analizar toda la información referida a las características y objetivos del estudio, de la droga en evaluación y los potenciales efectos adversos que pudiesen sobrevenir y que me han respondido satisfactoriamente todas mis inquietudes.

Mi participación es voluntaria y si me negara a participar o me retirara antes de finalizar el estudio no recibiré ningún tipo de sanción.

Entiendo que durante este estudio, pueden surgir nuevos hallazgos tanto positivos como negativos respecto a la seguridad de este tratamiento. En dicho caso seré informado. Podrán presentarse circunstancias que provoquen que los investigadores me retiren del estudio sin mi consentimiento. Estas incluyen: incumplimiento de las premisas exigidas durante el período del estudio o la aparición de un efecto adverso inesperado que pueda afectar mi salud.

También entiendo que todas las muestras que se obtengan durante este estudio (saliva) serán utilizadas para la investigación. No se realizarán estudios genéticos en ninguna de las muestras recolectadas.

Si surge algún problema o tengo alguna duda durante el estudio con respecto a la investigación deberé comunicarme con el médico del estudio.

Autorizo a los investigadores que realizan este estudio, al Comité de Revisión y Ética y a las Autoridades Sanitarias a tener acceso a mis registros médicos.

Firma del Voluntario: .....

Nombre y Apellido: .....

Domicilio: .....

Documento: .....

Fecha: .....

Nombre y Apellido: .....  
Domicilio: .....  
Documento: .....  
Fecha: .....

Firma del Investigador Principal: .....  
Nombre y Apellido: .....  
Domicilio: .....  
Documento: .....  
Fecha: .....



Avenida 51 entre 29 y 30 – 1900 – La Plata – Buenos Aires – Argentina  
Departamento de Docencia e Investigación; Comité de Ética de la Investigación – Teléfono 0221-4535000 interno 307 – Fax 0221-4531551

La Plata, 6 de Diciembre de 2007

Ref.: Trabajo de Investigación titulado **"Estudio de Biodisponibilidad Relativa entre distintas formulaciones sólidas orales de Carbamazepina 200 mg, administradas en dosis única y monitorizadas en saliva"**

Por medio de la presente, le notificamos que este Comité de Ética de la Investigación ha evaluado y aprobado los siguientes documentos relacionados al estudio de referencia:

- Protocolo de Investigación en Español.
- Consentimiento Informado en Español.

Adjunto encontrará la lista de miembros de este Comité que participó de la revisión y aprobación de la documentación presentada.

Atentamente.

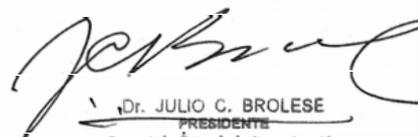
Presidente: Dr. Julio C. Brolese

Miembros: Dr. Jorge Binetti

Dr. Ricardo J. Cerdá

Dr. José Ferre

Dr. Arturo López Akimenco



Dr. JULIO C. BROLESE  
PRESIDENTE  
Comité de Ética de la Investigación  
Hospital Italiano de La Plata

### III. Estudio de Biodisponibilidad Relativa de cápsulas de PHT 100 mg en voluntarios sanos

TITULO DEL ESTUDIO: “Estudio de Biodisponibilidad Relativa entre distintas formulaciones sólidas orales de Fenitoína 100 mg, administradas en dosis única y monitorizadas en saliva”

El presente estudio clínico se llevará a cabo según un protocolo adecuado, acorde con las disposiciones de ANMAT, sobre el Régimen de buenas prácticas de investigación en estudios de Farmacología Clínica (Disposición 5330/97), y en estudios de Bioequivalencia (Disposición 3185/99 y Disposición 3598/02). Se desarrollará siguiendo las GCPs (Buenas Prácticas Clínicas), propuestas por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), que se basan en la documentación existente sobre el tema, generada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), y la Conferencia Internacional de Armonización (ICH). Así mismo, serán respetados los principios éticos originados por la Declaración de Helsinki.

El lenguaje que se ha utilizado en este modelo de consentimiento informado es práctico, simple y coloquial, comprensible para una persona de cualquier nivel de escolaridad. En el caso de que el voluntario no entendiera alguna terminología, los investigadores le explicarán su significado.

Este modelo consta de dos partes:

1. Información para el voluntario.
2. Modelo de Consentimiento para la firma

#### 1. INFORMACIÓN PARA EL VOLUNTARIO

##### Introducción

Lo invitamos a formar parte de un estudio clínico (un tipo de estudio de investigación), en el cual participan solamente las personas que por libre voluntad desean hacerlo. Esté seguro de su decisión sobre participar en esta investigación. A continuación, le proporcionaremos la información requerida para que usted comprenda las características del estudio, dedique el tiempo que necesite para leerla con atención y consulte si así lo desea con su familia, amigos y médico general o de familia.

##### Objetivos

El objetivo de este estudio es comparar los niveles de una droga en saliva y el tiempo en el cual se alcanza la máxima concentración, es decir su Biodisponibilidad, después de administrar un comprimido conteniendo dicha droga, en medicamentos de diferentes marcas.

##### Características de la droga en evaluación

La droga utilizada en este estudio es Fenitoína, que se usa para el tratamiento de crisis epilépticas. La epilepsia es una afección caracterizada por ataques repetidos.

Tales ataques se producen cuando los mensajes del cerebro hacia los músculos no son debidamente transmitidos por las vías nerviosas del organismo. La Fenitoína contribuye al control de la transmisión de estos mensajes. Se emplea así mismo, contra algunas enfermedades neurológicas y ciertas condiciones psiquiátricas tales como un trastorno llamado manía y un determinado tipo de depresión.

#### Protocolo del estudio

El estudio se realizará sobre 16 voluntarios sanos, con edades entre 18 y 50 años, divididos en cuatro grupos.

Si Ud. acepta integrar uno de estos grupos recibirá en cuatro ocasiones un comprimido de cada uno de los medicamentos, con un intervalo de 15 días entre cada toma, para permitir que la dosis previa se haya eliminado del organismo.

La duración total del estudio será de 7 semanas, durante las cuales será evaluado ambulatoriamente hasta las 24 horas de recibida la medicación. Esta metodología se repetirá cada vez que tome el medicamento, es decir cuatro en total.

Ud. será asignado al azar a uno de los grupos, al azar significa que lo colocan en un grupo el cual es determinado a la suerte.

Si Ud. decide participar en esta investigación será evaluado por un médico, quien le indicará una serie de análisis bioquímicos y le realizará un examen clínico, para la detección de síntomas, signos, y/o patologías asociadas, a través del llenado de una planilla confeccionada a tal fin, y verificará si reúne los requisitos necesarios para participar del estudio.

Para ser aceptado como voluntario, debe reunir ciertas condiciones que se detallan a continuación:

- Ser una persona sana, entre 18 y 50 años de edad
- No fumador, sin historia de alcoholismo o abuso de drogas.
- Tener un peso normal
- Exámenes bioquímicos normales
- HIV negativo
- Test de embarazo negativo (para voluntarios de sexo femenino)

Los criterios de exclusión comprenden:

- Anormalidad en alguno de los exámenes realizados
- Obesos / Desnutridos
- Enfermedades asociadas
- Embarazo o amamantamiento (en voluntarios de sexo femenino)
- Antecedentes de Alergia
- Participación en otro estudio clínico como voluntario en los últimos 30 días.
- Donación de sangre dentro de los últimos 3 meses.
- Ingesta crónica de medicamentos
- Ingesta de cualquier medicamento en la semana previa al estudio
- Adicciones a drogas
- Ingesta de alimentos asados al carbón en la semana previa al estudio
- Ingesta de alcohol 48 horas antes del estudio
- Ingesta de té, mate, café, 24 horas antes del estudio
- Actividad física intensa 24 horas antes del estudio

Aquellos voluntarios que no reúnan los requisitos necesarios para participar en el estudio debido a que se ha detectado alguna anomalía o patología al realizarle los exámenes correspondientes serán derivados dentro del centro de salud para que reciban el tratamiento correspondiente.

Durante los períodos de toma de muestras:

- No podrá realizar actividad física
- Deberá consumir una dieta equilibrada, normocalórica, igual a la de los demás voluntarios.
- No consumirá tabaco, alcohol, medicamentos
- No ingerirá alimentos o bebidas que puedan alterar la función circulatoria, gastrointestinal, hepática o renal (por ejemplo, té, café, mate, etc.)

El día del inicio del estudio, deberá concurrir al hospital a las 07.00 horas, con un ayuno no menor a 12 horas.

Luego de permanecer en reposo durante 60 minutos, se le extraerá una muestra de saliva (hora cero), previamente a la ingesta de un comprimido de 100 mg de Fenitoína (de la marca que le haya tocado al azar), con una cantidad constante de agua, por ejemplo 150 ml. Inmediatamente después de la administración deberá enjuagarse exhaustivamente la boca con agua. Las tomas de muestra se repetirán a los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 10, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 horas de haber recibido una dosis única del medicamento. En caso de ser necesario, podrá masticar parafilm para facilitar la producción de saliva.

Es decir, se le realizarán 21 muestreos en total para cada período de evaluación: 14 durante el primer día, y 7 más en los días siguientes, de forma ambulatoria.

Durante los dos días que dura el estudio en cada ciclo, Ud. tendrá un control clínico para identificar la aparición de cualquier reacción adversa, que pueda estar relacionado con el uso de la Fenitoína. Se le realizarán controles de presión arterial y la frecuencia del pulso cada hora, durante las primeras cuatro horas.

Posibles riesgos y/ o molestias

Mientras esté participando en este estudio, usted podría presentar algún efecto secundario del medicamento. Sin embargo, la fenitoína es una droga bien tolerada. La mayoría de las reacciones adversas se manifiestan cuando se administran dosis muy altas de este medicamento y se dan principalmente al comienzo del tratamiento, desapareciendo solas con el paso del tiempo. Tenga en cuenta que en este estudio Ud. recibirá dos dosis terapéuticas de cada medicamento a evaluar, separadas entre ellas por 15 días, por lo que sería muy poco probable que aparezcan efectos adversos, dado que los mismos suelen ocurrir durante tratamientos prolongados.

Además, Ud. recibirá atención médica y un control clínico para identificar la aparición de algún evento adverso. Si durante el período ambulatorio, ud. advierte algún síntoma que lo preocupe, puede comunicarse con el centro de Investigación, y será atendido inmediatamente.

A continuación se detallan estos efectos adversos, ordenados según el sistema u órgano que puedan afectar:

La fenitoína, aunque mejor tolerada al comienzo del tratamiento que la carbamazepina o el valproato, es más frecuente que produzca efectos secundarios en tratamientos crónicos que con frecuencia pasan inadvertidos. Las reacciones adversas dosis-dependientes suelen observarse con niveles por encima de 20 mg/l.

**Sistema nervioso central:** los efectos más comúnmente encontrados durante la terapia con fenitoína se relacionan con este sistema y suelen ser dosis-dependientes. Incluyen: nistagmo (movimientos involuntarios de los ojos en varios sentidos), visión borrosa y diplopía (visión doble), alteraciones moderadas de la coordinación, confusión mental y disartria (trastorno del habla). También se ha observado insomnio, mareos, nerviosismo transitorio, somnolencia y cefaleas. Han habido reportes que relacionan a la fenitoína como inductora de discinesias (movimientos anormales o involuntarios), incluyendo corea, temblor, distonía y asterixis, similares a los inducidos por fenotiazina y otras drogas neurolépticas.

**Sistema gastrointestinal:** náuseas, vómitos, dolor abdominal, falta de apetito, constipación o estreñimiento, hepatitis tóxica (inflamación del hígado) y daño hepático.

**Sistema tegumentario:** se han observado manifestaciones dermatológicas acompañadas a veces por fiebre, incluyendo rash (erupción en la piel) del tipo escarlatiniforme y morbiliforme. Otras formas más serias y que pueden resultar fatales han incluido dermatitis exfoliativa (descamación de la piel), lupus eritematoso, síndrome de Stevens-Johnson (enfermedad inflamatoria que afecta las mucosas de labios, ojos y nariz y puede estar acompañada de fiebre) y necrólisis epidérmica tóxica (enfermedad cutánea grave).

**Sistema hematopoyético:** se han reportado casos de trombocitopenia, leucopenia, neutropenia, granulocitopenia, pancitopenia (disminución del número de plaquetas, leucocitos, neutrófilos, granulocitos o de todos los componentes celulares de la sangre), con o sin supresión de médula ósea.

Si bien se ha observado anemia macrocítica y megaloblástica, ambas condiciones suelen responder a la terapia con ácido fólico.

Se han reportado linfadenopatías incluyendo hiperplasia benigna de nódulos linfáticos, pseudolinfoma, linfoma y enfermedad de Hodgkin's (afecciones de los ganglios o del tejido linfático).

**Tejido conectivo:** Modificación de las características faciales (engrosamiento de los labios, ensanchamiento de la punta de la nariz, avance del maxilar), hiperplasia gingival (aumento del tamaño de las encías) e hipertrichosis (crecimiento del pelo). El sobrecrecimiento del tejido parece responder a una alteración en el metabolismo del colágeno.

**Sistema Inmune:** síndrome de hipersensibilidad (que puede incluir síntomas como dolor articular, eosinofilia, fiebre, disfunción del hígado, trastornos de los ganglios o erupciones de la piel), lupus eritematoso sistémico (enfermedad autoinmune), periarteritis nudosa (aparición de nódulos en las arterias) y anomalías en la producción de inmunoglobulinas o anticuerpos.

**Sistema Endocrino:** el aumento de glucosa en sangre y su aparición en orina se deberían a la inhibición de la secreción de insulina. También se ha observado

deterioro de la mineralización de los huesos (osteomalacia), con disminución de la concentración de calcio en sangre y aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina, lo que puede ser atribuido tanto a la alteración del metabolismo de la vitamina D como a la inhibición de la absorción intestinal de calcio.

La fenitoína también induce el metabolismo de la vitamina K y disminuye la concentración de proteínas dependientes de dicha vitamina, las que son importantes para el normal metabolismo de calcio en el hueso. Esto explicaría por qué la osteomalacia no siempre disminuye por administración de vitamina D.

#### Posibles beneficios

Esperamos que la información que se obtenga como resultado de esta investigación beneficien en el futuro a los pacientes tratados con Fenitoína.

#### Derechos del voluntario

##### Participación voluntaria y retiro

La participación en este estudio es voluntaria. Usted puede escoger no participar o puede abandonar el estudio en cualquier momento, sin tener que dar una razón. Ud. no tiene obligación de finalizar el estudio, pero desearíamos que así lo hiciese. El retirarse del estudio no le representará ninguna penalidad.

##### Notificación de nuevos hallazgos

Ud. será informado durante todo el ensayo de cualquier evento que se produzca o cualquier nueva información relevante ocurrida durante el transcurso del estudio que pudiera afectar su salud, bienestar o interés por continuar en el estudio.

##### Salida del estudio

El equipo de investigación puede decidir dar por terminada su participación en el caso de que Ud. no cumpla con la conducta a seguir antes y durante el estudio, detallada en el diseño del estudio (no realizar actividad física, no consumir café, té, mate, etc).

##### Confidencialidad

Todos los datos obtenidos en el ensayo con relación a su persona serán custodiados, garantizando discreción y confidencialidad sobre su identificación y para esto en la documentación generada en el ensayo clínico sólo se recogerán las iniciales de sus nombres y apellidos.

Los miembros del comité de Revisión y de Ética y las Autoridades Sanitarias tendrán libre acceso a su Historia Clínica para la verificación de los procedimientos y/o datos del ensayo clínico sin violar su confidencialidad hasta donde lo permitan las leyes y regulaciones aplicables. Al firmar este consentimiento usted está autorizando dicho acceso.

##### Pago por Participación

La participación es voluntaria, no habiendo un pago por la misma.

### Costos

No hay costos adicionales para usted al participar en este estudio.

### Preguntas/ Contactos

Si durante el curso del estudio Ud. tiene preguntas acerca de la naturaleza del mismo o sobre sus derechos o cree que ha sufrido una lesión relacionada con el estudio clínico o necesita tratamiento médico de emergencia, debe contactar al médico encargado de la investigación.

No firme el formulario de consentimiento a menos que Ud. haya tenido la oportunidad de realizar preguntas y obtenido respuestas satisfactorias a las mismas. Su consentimiento debe ser dado voluntariamente, sin coerción o forzado.

Ud. debe recibir y conservar en su poder un original de la hoja de información y del formulario de consentimiento escrito firmado.

## 2. CONSENTIMIENTO PARA LA FIRMA

Por la presente presto mi consentimiento para participar como voluntario en el presente Estudio de Biodisponibilidad Relativa, donde se me administrarán 100 mg de Fenitoína, en comprimidos. Declaro que he tenido tiempo suficiente para leer y analizar toda la información referida a las características y objetivos del estudio, de la droga en evaluación y los potenciales efectos adversos que pudiesen sobrevenir y que me han respondido satisfactoriamente todas mis inquietudes.

Mi participación es voluntaria y si me negara a participar o me retirara antes de finalizar el estudio no recibiré ningún tipo de sanción.

Entiendo que durante este estudio, pueden surgir nuevos hallazgos tanto positivos como negativos respecto a la seguridad de este tratamiento. En dicho caso seré informado. Podrán presentarse circunstancias que provoquen que los investigadores me retiren del estudio sin mi consentimiento. Estas incluyen: incumplimiento de las premisas exigidas durante el período del estudio o la aparición de un efecto adverso inesperado que pueda afectar mi salud.

También entiendo que todas las muestras que se obtengan durante este estudio (saliva) serán utilizadas para la investigación. No se realizarán estudios genéticos en ninguna de las muestras recolectadas.

Si surge algún problema o tengo alguna duda durante el estudio con respecto a la investigación deberé comunicarme con el médico del estudio.

Autorizo a los investigadores que realizan este estudio, al Comité de Revisión y Ética y a las Autoridades Sanitarias a tener acceso a mis registros médicos.

Firma del Voluntario: .....

Nombre y Apellido: .....

Domicilio: .....

Documento: .....

Fecha: .....

Firma del Testigo: .....  
Nombre y Apellido: .....  
Domicilio: .....  
Documento: .....  
Fecha: .....

Firma del Investigador Principal: .....  
Nombre y Apellido: .....  
Domicilio: .....  
Documento: .....  
Fecha: .....



---

Avenida 51 entre 29 y 30 – 1900 – La Plata – Buenos Aires - Argentina  
Departamento de Docencia e Investigación: Comité de Ética de la Investigación – Teléfono 0221-4535000 interno 307 – Fax 0221-4531551

La Plata, 18 de Marzo de 2009

Ref.: Trabajo de Investigación titulado "Estudio de Biodisponibilidad Relativa entre distintas formulaciones sólidas orales de Fenitoína 100 mg, administradas en dosis única y monitorizadas en saliva"

Por medio de la presente, le notificamos que este Comité de Ética de la Investigación ha evaluado y aprobado los siguientes documentos relacionados al estudio de referencia:

- Protocolo de Investigación en Español.
- Consentimiento Informado en Español.

Adjunto encontrará la lista de miembros de este Comité que participó de la revisión y aprobación de la documentación presentada.

Atentamente.

Presidente: Dr. Julio C. Brolese

Miembros: Dr. Jorge Binetti

Dr. Ricardo J. Cerdá

Dr. José Ferre

Dr. Arturo López Akimenco

Dr. JULIO C. BROLESE  
PRESIDENTE  
Comité de Ética de la Investigación  
Hospital Italiano de La Plata