



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

“Evaluación del comportamiento *in vitro* de los perfiles de disolución de un medicamento conteniendo BRAG-II con fines de correlación *in vitro-in vivo*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN FARMACIA

PRESENTA:
L.F. GUADALUPE MICAELA BADILLO LUGO

DIRECTOR DE TESIS
DRA. DEA HERRERA RUÍZ

CUERNAVACA, MORELOS. NOVIEMBRE 2022

OFICIO DE ASIGNACIÓN DE JURADO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



L.F. GUADALUPE MICAELA BADILLO LUGO
ALUMNA DE MAESTRÍA EN FARMACIA

P R E S E N T E

Por este medio le informo que Sesión Ordinaria del Consejo Interno de Posgrado (CIP), celebrada el día 11 de mayo de 2022, se analizó su solicitud para la asignación de la Comisión Revisora y Jurado para la tesis titulada "Evaluación del comportamiento *in vitro* de los perfiles de disolución de un medicamento conteniendo BRAG-II con fines de correlación *in vitro-in vivo*", la cual estuvo bajo la dirección de la Dra. Dea Herrera Ruiz. Así, tomando en cuenta la propuesta de posibles sinodales, el CIP designó los siguientes:

Sinodal	Procedencia	
Dr. Julio César Rivera Leyva	Facultad de Farmacia-UAEM	Presidente
Dr. Jesús Rivera Islas	Facultad de Farmacia-UAEM	Secretario
Dr. Juan Pablo Senosiain	Laboratorios SENOSIAIN S.A. de C.V.	Vocal 1
M. en F. Magali Rodríguez Soto	Laboratorios Pisa	Suplente 1
Dr. Dea Herrera Ruiz	Facultad de Farmacia-UAEM	Suplente 2

Se le solicita entregar el manuscrito de tesis para revisión a esta comisión y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Nota: los sinodales deberán entregar a la alumna los comentarios u observaciones al escrito de tesis en un plazo máximo de 20 días hábiles a partir de la recepción del documento. La alumna deberá hacer las correcciones pertinentes. Los sinodales emitirán su voto aprobatorio o no aprobatorio un plazo máximo de 10 días hábiles a partir de la recepción de las correcciones realizadas.

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dr. Sergio Alcalá Alcalá
Jefe del Posgrado en Farmacia

ccp: archivo.

Dr. Julio César Rivera Leyva; Dra. Jesús Rivera Islas; Dr. Juan Pablo Senosiain; M. en F. Magali Rodríguez Soto; Dr. Dea Herrera Ruiz

Este proyecto de tesis se desarrolló en el Laboratorio 2 de Farmacia Industrial de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la tutoría de la Dra. Dea Herrera Ruiz.

Agradezco al CONACyT por el financiamiento a través de la beca de maestría con número de registro 1045032 y a Laboratorios Senosiain S.A. de C.V. quien proporcionó las formulaciones evaluadas así como recursos durante el desarrollo del proyecto.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y a la Facultad de Farmacia por haberme permitido culminar mis estudios de maestría y fomentar mi desarrollo profesional.

A mi directora de tesis, la Dra. Dea Herrera, así como al Dr. Juan Pablo Senosiain, por haber depositado su confianza en mí para ser partícipe de este trabajo de investigación.

Agradezco la valiosa contribución del Dr. Hugo Morales y el Dr. Sergio Alcalá por haberme brindado sin limitación alguna su conocimiento científico, guía y apoyo durante todo el desarrollo del proyecto.

A mi jurado revisor: Dr. Julio César Rivera, Dr. Jesús Rivera, Dr. Juan Pablo Senosiain, M.F. Flor Magali Rodríguez, Dra. Dea Herrera, agradezco su apoyo y participación en la revisión de esta tesis. Las observaciones y recomendaciones llevadas a cabo para completar de manera satisfactoria este proyecto de investigación.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, Reynaldo, Christian, Alondra, Andrés y Rebeca por su apoyo y maravilloso ambiente que con su buena actitud crearon. Además de sus consejos bien atinados para el desarrollo del proyecto.

Agradezco a Dios por brindarme sabiduría, fortaleza y salud para completar esta etapa profesional. Por estar conmigo en todo momento, cuidarme y bendecir mi camino al rodearme de las mejores personas con las que puedo convivir. Especialmente aquellas que forman parte importante de mi vida: Arturo, Saraí y Paloma, a quienes valoro muchísimo.

Dedico el producto de este proyecto con todo mi amor y respeto a mi familia. Por siempre apoyarme en la toma de decisiones y nunca abandonarme ante las adversidades presentadas. A mi madre, mis hermanos (Diego, Luis, Beto) y mis hermosos sobrinitos Sofi y pipuche, a quienes amo con todo mi ser y alegran tanto mi vida. Muchas gracias por su apoyo y su presencia.

ÍNDICE GENERAL

1.0 RESUMEN	8
2.0 ABSTRACT	9
3.0 ANTECEDENTES	10
3.1 Hipertensión.....	10
3.1.1 Epidemiología de la hipertensión.....	11
3.1.2. Tratamiento	14
3.2 BRAG-II	17
3.2.1 Indicaciones terapéuticas:	17
3.2.2 Dosis y vía de administración:	17
3.2.3 Propiedades fisicoquímicas:	17
3.2.4 Propiedades farmacológicas	19
3.2.5 Toxicidad y efectos adversos	21
3.2.6 Situación actual.....	22
3.3 Disolución de medicamentos	23
3.3.1 Medios biorrelevantes	25
3.3.2 Aparato 4 USP	27
3.4 Correlación <i>in vitro- in vivo</i> (CIVIV)	33
3.4.1 Métodos modelo dependientes	38
3.4.2 Métodos independientes de modelo	41
3.5 Estudios de bioequivalencia	46
3.6 Estudios de biodisponibilidad de BRAG-II	50
3.7 Estabilidad de principios activos contenidos en el medicamento de prueba de BRAG-II	51
4.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA O JUSTIFICACIÓN	54
5.0 HIPÓTESIS	55
6.0 OBJETIVO GENERAL	56
6.1 Objetivos particulares.....	56
7.0 MATERIALES Y EQUIPOS	57

7.1 Equipos.....	57
7.2 Reactivos sólidos	57
7.3 Insumos	57
7.4 Reactivos líquidos.....	58
8.0 METODOLOGÍA.....	59
8.1 Diagrama general de trabajo.....	59
8.2 Validación del método de cuantificación para BRAG-II por CLAR con detección UV.....	59
8.2.1 Preparación de soluciones	59
8.2.2 Preparación de curva de calibración	60
8.3 Método de disolución	61
8.3.1 Condiciones de disolución en aparato 4 USP, de flujo continuo.	61
8.4 Comparación de cinética de disolución en equipo 2 USP vs 4 USP	64
8.5 Correlación <i>in vitro- in vivo</i>	65
8.5.1 Determinación de parámetros farmacocinéticos	65
8.5.2 Determinación de la fracción absorbida.....	65
9.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
9.1 Descripción de las formulaciones en estudio.....	67
9.2 Método analítico de cuantificación	68
9.2.1 Validación del método analítico de cuantificación.....	70
9.3 Método de disolución	75
9.4 Perfiles de disolución en equipo 2 USP vs 4 USP	83
9.5 Correlación <i>in vitro - in vivo</i>	88
10.0 CONCLUSIONES	94
11.0 ANEXOS.....	95
Bibliografía.....	105

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grado/etapa de hipertensión.....	11
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de BRAG-II.....	18
Tabla 3. Composición de medios biorrelevantes.....	26
Tabla 4. Elaboración de curva de calibración.....	60
Tabla 5 Tiempos de muestreo durante la prueba de disolución	63
Tabla 6. Parámetros de validación del método analítico de cuantificación de BRAG-II71	
Tabla 7. Determinación del factor de similitud (f2) empleando el aparato 2 USP en medio FaSSGF pH 1.6.	85
Tabla 8. Determinación del factor de similitud (f2) empleando el aparato USP 4 en medio FaSSIF pH 6.5.....	87
Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos de las formulaciones F1R y F1P.....	90
Tabla 10. Determinación de fracciones absorbidas y disueltas de la formulación F1R 92	
Tabla 11. Determinación de fracciones absorbidas y disueltas de la formulación F1P 92	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales sistemas neuroendocrinos implicados en la regulación de la presión arterial.	10
Figura 2. Prevalencia de la hipertensión por regiones del mundo en 2010, en a) hombres y b) mujeres.....	12
Figura 3. Causas de muerte a nivel mundial atribuidas al aumento de la presión arterial en 2015.....	13
Figura 4. Ensanut 2018-19: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19; Ensanut 2020: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2020. AHA: Incluye diagnóstico médico previo + hallazgo de la encuesta usando el punto de corte tensión arterial sistólica ≥ 130 y tensión arterial diastólica ≥ 80 mmHg.....	14
Figura 5. Base estructural de la molécula de BRAG-II	18
Figura 6. Acción de los bloqueadores de los receptores de angiotensina en la disfunción endotelial relacionada con la angiotensina II.....	20
Figura 7. Reacciones adversas que se producen con una incidencia $\geq 2\%$ en pacientes tratados con BRAG-II y con una frecuencia mayor que en los pacientes tratados con placebo.....	22
Figura 8. a) Composición del equipo disolutor 4 USP de flujo continuo y b) diferentes celdas de flujo.....	28
Figura 9. Esquematización del sistema abierto y el tipo de resultados que pueden obtenerse.....	30
Figura 10. Esquematización del sistema cerrado y el tipo de resultados que pueden obtenerse	31
Figura 11. Condiciones de disolución en aparato 4 USP.	33
Figura 12. Deconvolución implícita mediante regresión no lineal. El ajuste conjunto de las funciones respuesta y función respuesta al impulso unitario permite extraer los parámetros de la función de entrada.....	43
Figura 13. Perfil farmacocinético en voluntarios sanos después de la administración de las formulaciones F1P y F1R (promedio \pm EE).	51

Figura 14. Configuración del armado de celdas: a) con perlas de vidrio de 1 mm de diámetro, b) con perlas de vidrio de 2 mm de diámetro y c) sin perlas de vidrio.....	62
Figura 15. Armado de celda para cápsulas (a), para tabletas (b) y para granulado (c).	63
Figura 16. Formulaciones evaluadas. a) F1R; b) F0P, F1P, F2P y F2P1; c) F1M.....	68
Figura 17. Espectros de absorción UV-vis de a) activo 1, b) activo 2, c) activo 3 partiendo de un stock disuelto en metanol y diluídas con metanol para obtener diferentes niveles de concentración.	70
Figura 18. Cromatogramas BRAG-II en a) medio FaSSGF Ph 1.6 y b) medio FaSSIF pH 6.5	72
Figura 19. Cromatograma obtenido de las cápsulas de placebo, F0P, en a) medio FaSSGF pH 1.6 y b) medio FaSSIF pH 6.5.	72
Figura 20. Efecto de la presencia de pepsina en el medio de disolución FaSSGF pH 1.6. Cápsulas F1P.	76
Figura 21. Perfiles de disolución para seleccionar la mejor condición de armado de celda a) en términos de concentración de BRAG-II disuelto y b) en % disuelto acumulado. Se utilizó una velocidad de 8 mL/min contemplando 3 condiciones de armado de la celda. (promedio \pm DE). Cápsulas F2P	77
Figura 22. Perfiles de disolución para seleccionar la velocidad de flujo óptima a) en términos de concentración de BRAG-II y b) como % disuelto acumulado. Perfiles a 4 mL/min y 8 mL/min (promedio \pm DE). Formulación F1M.	79
Figura 23. Perfil de disolución in vitro en aparato 4 USP de las formulaciones F1R y F1P (promedio \pm DE). Primeros 30 min en medio FaSSGF pH 1.6, cambio de medio a partir de este tiempo y hasta acabar prueba con FaSSIF pH 6.5.	80
Figura 24. Perfil de disolución in vitro en aparato 4 USP de la formulación F2P optimizada para la liberación de BRAG-II, en comparación con los perfiles de F1R y F1P (promedio \pm DE). Primeros 30 min en medio FaSSGF pH 1.6, cambio de medio a partir de este tiempo y hasta acabar prueba con FaSSIF pH 6.5.	81

Figura 25. Perfil de disolución in vitro de las formulaciones F2P y F2P1, a) concentración de BARG-II disuelta y b) % disuelto acumulado (promedio \pm DE) en medio FaSSGF pH 1.6.	82
Figura 26. Perfil de disolución in vitro en aparato 2 USP de las formulaciones F1R y F1P (promedio \pm DE). Medio FaSSGF pH 1.6, 50 rpm, 37°C.	84
Figura 27. Perfil de disolución in vitro en aparato 4 USP de las formulaciones F1R y F1P (promedio \pm DE). Medio FaSSGF pH 1.6, 8 mL/min, 37°C.....	86
Figura 28. Perfil de disolución in vitro de las formulaciones F1R y F1P (promedio \pm DE), concentración de BRAG-II vs tiempo.	89
Figura 29. Perfil farmacocinético de las formulaciones F1P, cápsulas lote 01101801 y F1R, tabletas de referencia (n=53 \pm EE).....	89

ABREVIATURAS

AUC = ABC

Área bajo la curva

BD

Biodisponibilidad

BE

Bioequivalencia

BRAG-II

Telmisartán

CIVIV

Correlación In vitro-In vivo

CLAR

Cromatografía de líquidos de alta resolución

DE

Desviación estándar

DRXP

Difracción de rayos X de polvos

ECA

Enzima convertidora de angiotensina

ECV

Enfermedad cardiovascular

f₂

Factor de similitud

FaSSGF

Fluido gástrico simulado en estado de ayuno
(Fasted State Simulated Gastric Fluid)

FaSSIF

Fluido intestinal en estado de ayuno (Fasted
State Simulated Intestinal Fluido)

FD

Factor de dilución

FDA

Food and Drug Administration

IFA

Ingrediente Farmacéutico Activo

LC

Límite de cuantificación

LD

Límite de detección

SCB

Sistema de Clasificación Biofarmacéutica

TMD

Tiempo medio de disolución

TMR

Tiempo medio de residencia

USP

United States Pharmacopeia

UV

Ultravioleta

EE

Error experimental

1.0 RESUMEN

La identificación del ingrediente farmacéutico activo de interés de la presente investigación será denominado como BRAG-II.

BRAG-II es un fármaco derivado del bencimidazol que pertenece a la clase II del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica y está indicado para el tratamiento de la hipertensión arterial. Actualmente, en la región asiática se comercializa un medicamento innovador en forma de tabletas recubiertas, el cual está constituido por tres principios activos que están indicados para el tratamiento de la hipertensión. Estos son administrados en dosis de 80, 12.5 y 5 mg de los activos 1 (BRAG-II), 2 y 3 respectivamente. Dicha presentación farmacéutica reúne las características de calidad farmacéutica, así como de seguridad y eficacia. Un desarrollo farmacéutico nacional de una composición farmacéutica que contenga a estos principios activos permitiría mejorar el apego al tratamiento de la hipertensión, enfermedad con una alta prevalencia en nuestro país.

Este trabajo se centró en establecer las bases para establecer una correlación *in vitro-in vivo*, mediante estudios de disolución que permitieron simular las condiciones en el tracto gastrointestinal empleando medios biorrelevantes y el aparato 4 USP. Las formulaciones prueba desarrolladas por un laboratorio farmacéutico fueron estudiadas bajo las condiciones de disolución establecidas en este trabajo, como una herramienta para la optimización de la formulación y el paso previo para el desarrollo del estudio clínico con fines de intercambiabilidad. Se evaluaron 3 formulaciones (F1R, F1P y F2P). Mediante el uso de este método de disolución se demostró que F1P y F2P no presentan equivalencia farmacéutica con F1R por lo que fue necesario optimizar la formulación hasta la obtención de aquella que demuestre equivalencia farmacéutica con F1R empleando el método de disolución desarrollado.

2.0 ABSTRACT

The identification of the active pharmaceutical ingredient of interest in this research will be called BRAG-II.

BRAG-II is a benzimidazole derivative drug that belongs to class II of the Biopharmaceutical Classification System and is indicated for the treatment of arterial hypertension. Currently, in the Asian region, an innovative drug is marketed in the form of coated tablets, which is composed of three active ingredients that are indicated for the treatment of hypertension. These are administered in doses of 80, 12.5 and 5 mg of active ingredients 1 (BRAG-II), 2 and 3 respectively. This pharmaceutical presentation meets the characteristics of pharmaceutical quality, as well as safety and efficacy. A national pharmaceutical development of a pharmaceutical composition containing these active ingredients would improve adherence to treatment of arterial hypertension, a highly prevalent disease in our country.

This work focused on laying the foundations to establish an in vitro-in vivo correlation, through dissolution studies that allowed simulating the conditions in the gastrointestinal tract using biorelevant media and the 4 USP apparatus. The test formulations developed by a pharmaceutical laboratory were studied under the dissolution conditions established in this work, as a tool for the optimization of the formulation and a previous step to the development of the clinical study for interchangeability purposes. Three formulations (F1R, F1P and F2P) were evaluated. Using this dissolution method, it is revealed that F1P and F2P do not present pharmaceutical equivalence with F1R, so it was necessary to optimize the formulation until obtaining the one that demonstrates pharmaceutical equivalence with F1R using the developed dissolution method.

3.0 ANTECEDENTES

3.1 Hipertensión

La presión arterial está determinada por varios parámetros del sistema cardiovascular. Entre esos parámetros se incluye el volumen sanguíneo, el gasto cardíaco, el equilibrio del tono arterial que se ve afectado por el volumen intravascular y los sistemas neurohumorales (mecanismos de compensación que se activan para mantener la estabilidad hemodinámica cuando se reduce el gasto cardíaco). El mantenimiento de los niveles fisiológicos de la presión arterial involucra una interacción compleja de varios elementos de un sistema neuro-humoral integrado que incluye el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), el papel de los péptidos natriuréticos y el endotelio, el sistema nervioso simpático (SNS) y el sistema inmunitario tal como se esquematiza en la Figura 1 (Oparil, y otros, 2019) (Tsimihodimos, Gonzalez-Villalpando, Meigs, & Ferrannini, 2018). El mal funcionamiento de estos factores de control puede conducir directa o indirectamente a aumentos en la presión arterial, lo que con el tiempo da como resultado daños en los órganos diana, provocando así enfermedades cardiovasculares (ECV) (Minkyung, y otros, 2017) (Thomas, Karin, & Mirjam, 2020).

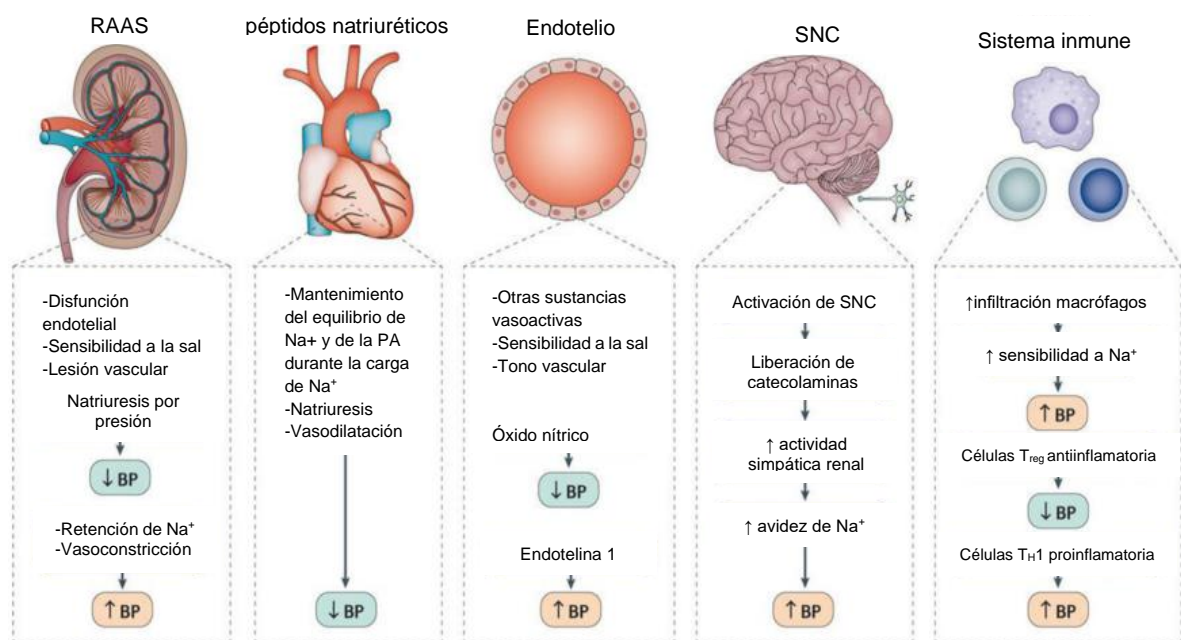


Figura 1. Principales sistemas neuroendocrinos implicados en la regulación de la presión arterial. Modificado de (Oparil, y otros, 2019)

Existe también una predisposición genética (algunas variantes alélicas) que se adiciona a una serie de factores ambientales, como una ingesta elevada de sodio, la mala calidad del sueño, la ingesta excesiva de alcohol y el alto estrés mental que contribuyen al desarrollo de la hipertensión. Además, la probabilidad de desarrollar hipertensión

aumenta con la edad debido al endurecimiento progresivo de la vasculatura arterial causado, entre otros factores, por cambios lentos en el colágeno vascular y aumentos en la aterosclerosis (Marianne E., Norm, & Xin-Hua, 2014).

Sin duda alguna el estilo de vida de la población, así como los factores antes mencionados, con el paso de los años ha modificado los niveles de presión arterial sistólica de 115 mm Hg y diastólica de 75 mm Hg (115/75 mm Hg) (Oparil, y otros, 2019).

De acuerdo con diversas referencias, el mantener una presión arterial superior a los 140/90 mm Hg es indicador de hipertensión arterial, existiendo a su vez diferentes grados que son clasificados de acuerdo con el valor de presión arterial registrado, Tabla 1 (Mills, Stefanescu, & He, 2020) (Oparil, y otros, 2019).

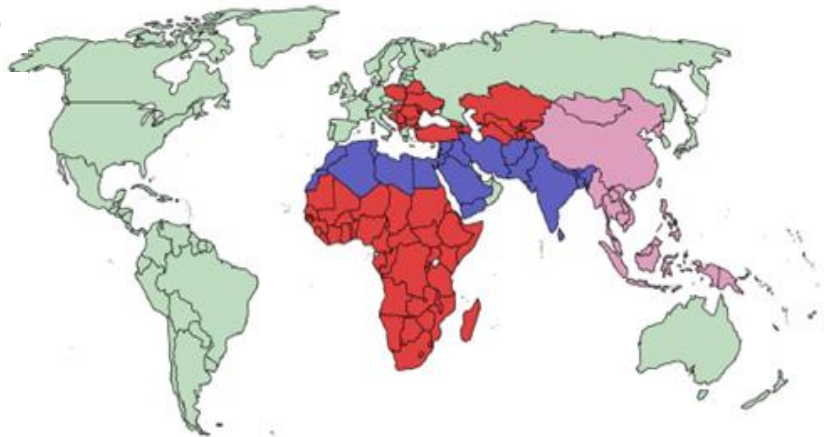
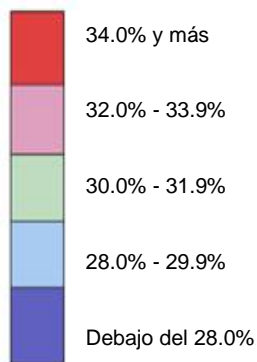
Tabla 1. Grado/etapa de hipertensión. Modificado de (Mills, Stefanescu, & He, 2020) (Oparil, y otros, 2019)

Grado/etapa de hipertensión	Intervalo de presión
1	140/90 mm Hg – 159/99 mm Hg
2	160/100 mm Hg – 179/109 mm Hg
3	≥180/110 mm Hg

3.1.1 Epidemiología de la hipertensión

Mills y colaboradores (2020) estimaron, con base en un análisis de datos de 135 estudios basados en la población que incluyeron a 968 419 adultos de 90 países, que en 2010 la prevalencia global de hipertensión estandarizada por edad (definida como presión arterial $\geq 140/90$ mm Hg) fue del 31.1%. La prevalencia de hipertensión estandarizada por edad fue ligeramente mayor en los hombres (31.9 %) que en las mujeres (30.1 %) y fue menor en los países de ingresos altos (28.5 %) que en los países de ingresos bajos y medianos (31.5 %). La prevalencia más baja de hipertensión en los hombres se encontró en el sur de Asia (26.4 %), mientras que la prevalencia más alta se registró en Europa del Este y Asia Central (39.0%). En las mujeres, la prevalencia de hipertensión fue más baja en los países de ingresos altos (25.3 %) y más alta en el África subsahariana (36.3 %), ver Figura 2. Es probable que la falta de proporcionalidad en las prevalencias descritas anteriormente estuviesen influenciadas por la diversidad de los factores de riesgo de la hipertensión (Roth, y otros, 2017).

Prevalencia de hipertensión a)



b)

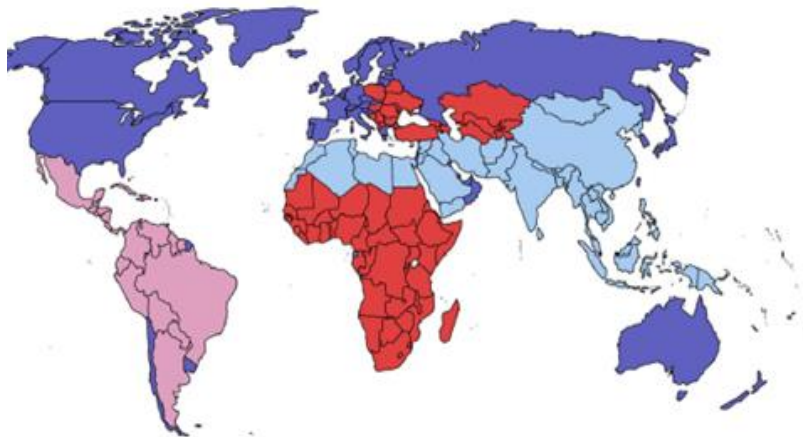


Figura 2. Prevalencia de la hipertensión por regiones del mundo en 2010, en a) hombres y b) mujeres. Modificado de (Roth, y otros, 2017).

En la Figura 3 se observan las causas de muerte asociadas a una presión arterial ≥ 140 mmHg, correspondiente a 7.8 millones (14.0 % de todas las muertes). De acuerdo con las tendencias en prevalencia de la hipertensión, el número estimado de muertes por todas las causas relacionadas con la presión arterial y por ECV (enfermedad cerebrovascular) aumentó sustancialmente entre 1990 y 2015, especialmente en los países de ingresos bajos y medianos (Mills, Stefanescu, & He, 2020).

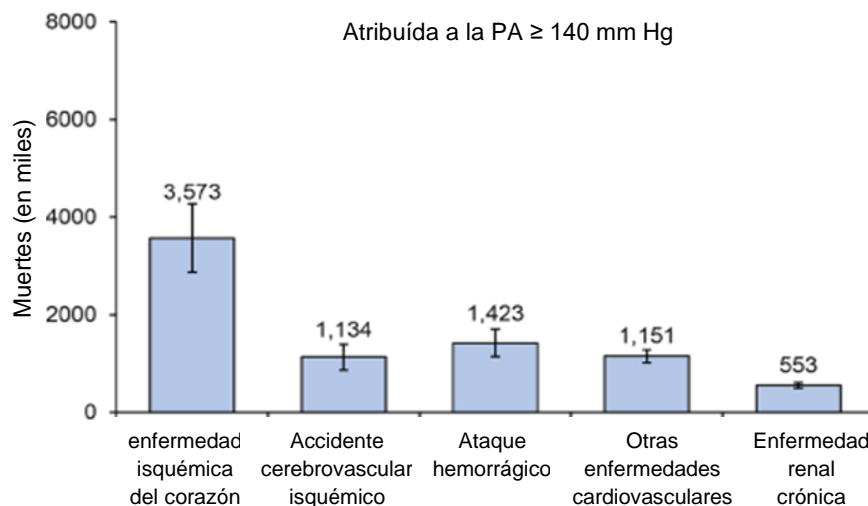


Figura 3. Causas de muerte a nivel mundial atribuidas al aumento de la presión arterial en 2015. Modificado de (Mills, Stefanescu, & He, 2020).

Resulta evidente que la hipertensión en la población, independientemente de su origen, converge en una alta incidencia de morbilidad y mortalidad a nivel mundial propiciando particularmente enfermedades cardiovasculares. Datos más recientes emitidos por la Organización Mundial de la Salud (2019), refiere que las ECV son una de las causas más frecuentes de mortalidad en todo el mundo, y contribuyen a 17.9 millones de muertes cada año (aproximadamente el 31% de todas las muertes globales).

El Instituto Nacional de Salud Pública en México, por su parte, el año 2000 ha referido que la prevalencia de casos de hipertensión arterial varía con la edad de los individuos. La más alta se encontró en los individuos con edad entre los 70 y los 79 años (53.6 %) y la más baja en los de 20 a 29 años (17.0%). Observando que el porcentaje de hipertensos tenía una tendencia creciente conforme avanza la edad. Antes de los 50 años la prevalencia de hipertensión arterial fue mayor en los hombres, llegando en el grupo de 40 a 49 años a 40.7 % y, a partir de esta edad, el porcentaje fue mayor en las mujeres, en las cuales se observaron prevalencias desde 54.6%, para el grupo de 50 a 59 años, hasta de 60.3 % para el grupo de 80 y más años. La enfermedad fue más frecuente en los estados de Tamaulipas (38.7%), Zacatecas (36.3%) y Coahuila (35.9 %). Las prevalencias más bajas se encontraron en los estados de Puebla (24.1%), Oaxaca (23.3 %) y Chiapas ((23.0 %) (cuadro 9.2 y figura 9.2). Los estados con las razones diagnóstico sobre hallazgo más altas fueron Baja California Sur y el Estado de México, ambos con 1.1; mientras que las entidades con las menores razones diagnóstico sobre hallazgo fueron Nuevo León, Quintana Roo, Tabasco, Tamaulipas y Veracruz, todas con 0.4. (Instituto Nacional de Salud Pública, 2000).

Por otro lado, en 2020, de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (Ensanut), la prevalencia de hipertensión arterial en adultos mexicanos fue de 49.4 % (44.0 % en mujeres y 55.3 % en hombres). En estos adultos el 70.0 % fue diagnosticado con hipertensión arterial (HAT) hasta el momento de realizar la encuesta y el 30% desconocía tener esta enfermedad. En relación con el grupo de edad, se observó una tendencia creciente en la prevalencia de hipertensión arterial a medida que aumentaba la edad, dicha información es presentada gráficamente en la Figura 4. En comparación con los participantes con concentraciones séricas normales de triglicéridos, colesterol LDL, ácido úrico, glucosa y HbA1c (hemoglobina glicosilada), en los adultos con concentraciones séricas elevadas de estos biomarcadores, la prevalencia de HAT fue mayor. En los adultos con diagnóstico previo de diabetes, la prevalencia de HAT fue 63% más alta que en las personas que no tenían diabetes (Campos-Nonato, y otros, 2021).

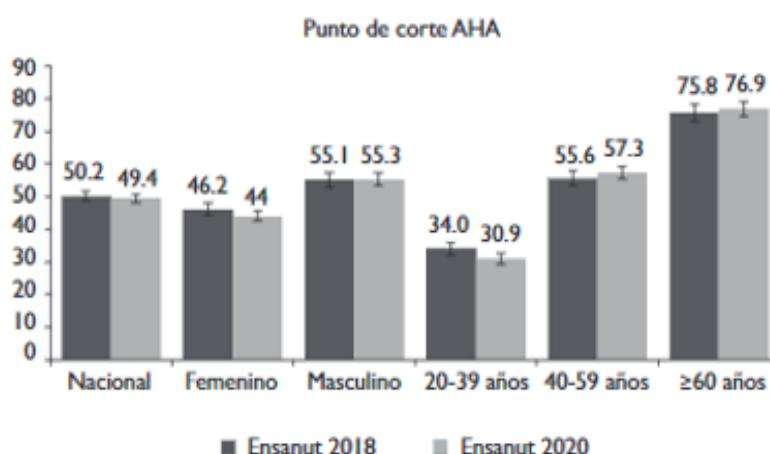


Figura 4. Ensanut 2018-19: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19; Ensanut 2020: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2020. AHA: Incluye diagnóstico médico previo + hallazgo de la encuesta usando el punto de corte tensión arterial sistólica ≥ 130 y tensión arterial diastólica ≥ 80 mmHg. (Campos-Nonato, y otros, 2021)

3.1.2. Tratamiento

Existen tratamientos para la hipertensión que consisten en el cambio de hábitos del paciente y el uso de medicamentos. El tratamiento antihipertensivo ha ido modificando a través de los años ya que han surgido medicamentos con diferentes rutas de acción para la reducción de los niveles de presión arterial, así como la aplicación del sinergismo de varios de ellos en su tratamiento. Actualmente existen diferentes clases de fármacos y una amplia variedad de combinaciones de dosis fijas. (Oparil, y otros, 2019) (P., Maillard, & Michel, 2007) (Jitsu, Issei, & Toshio, 2017).

Por lo general, la farmacoterapia antihipertensiva comienza con medicamentos antihipertensivos de primera línea, ya sea en monoterapia o en combinación. La terapia combinada puede ser preferible en pacientes con niveles más altos de presión arterial previa al tratamiento. Los medicamentos antihipertensivos de primera línea incluyen inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), bloqueadores de los receptores de angiotensina II (también conocidos como sartanes por la terminación en su nombre, por ejemplo: Azilsartán (Edarbi), Candesartán (Atacand), Eprosartán, Irbesartán (Avapro), Losartán (Cozaar), Olmesartán (Benicar), Telmisartán (Micardis), Valsartán (Diovan)) bloqueadores de los canales de calcio dihidropiridínicos y diuréticos tiazídicos. Los bloqueadores beta también están indicados en pacientes con insuficiencia cardíaca y fracción de eyección del ventrículo izquierdo reducida o después de un infarto de miocardio, y algunas guías recomiendan los bloqueadores *beta* como medicamentos antihipertensivos de primera línea. La elección debe basarse en la eficacia y la tolerabilidad individuales. La dosificación dividida de los medicamentos antihipertensivos tiende a disminuir la adherencia y debe evitarse cuando es posible que la presión no pueda controlarse con monoterapia en muchos pacientes, particularmente aquellos con hipertensión severa. (Oparil, y otros, 2019) (P., Maillard, & Michel, 2007) (Jitsuo, Issei, & Toshio, 2017).

Los inhibidores de la ECA o los bloqueadores de los receptores de la angiotensina II, los diuréticos tiazídicos y los bloqueadores de los canales de calcio dihidropiridínicos se suman para reducir la presión arterial y se pueden combinar como terapias de combinación doble o triple. Tal como lo aplica Japón, ya que siendo uno de los países con mayor prevalencia de la hipertensión, especialmente en mujeres, ha implementado pautas para el manejo de la hipertensión. La Sociedad Japonesa de Hipertensión establece que el tratamiento antihipertensivo de primera línea debe consistir en un bloqueador de los canales de calcio (BCC), un bloqueador del receptor de angiotensina (BRAG), inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o un diurético, en pacientes hipertensos. El uso de dos o tres fármacos en combinación (de diferentes clases) a menudo es necesario para alcanzar la presión arterial objetivo. Las combinaciones recomendadas de dos fármacos son un inhibidor de la ECA+BCC, un BRAG+BCC, un inhibidor de la ACE+diurético, un BRAG+diurético o un BCC+diurético. A los pacientes que no respondan a una combinación de dos fármacos se les debe recetar una terapia de combinación triple. Además, las guías y otros estudios muestran que la simplificación de la prescripción mediante fármacos de combinación fija puede

mejorar la adherencia. (Oparil, y otros, 2019) (P., Maillard, & Michel, 2007) (Jitsuo, Issei, & Toshio, 2017).

A continuación, se muestran algunos ejemplos de los fármacos categorizados de acuerdo con sus mecanismos de acción, ECA, BCC y acción diurética mencionados anteriormente para cada mecanismo de acción.

Ejemplos de fármacos con acción inhibidora de la ECA son: Benazepril (Lotensin), Captopril, Enalapril (Vasotec), Fosinopril, Lisinopril (Prinivil, Zestril), Moexipril, Perindopril, Quinapril (Accupril), Ramipril (Altace), Trandolapril. ((MFMER), Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, 2021).

Ejemplos de fármacos con acción BCC son: Amlodipino (Norvasc), Diltiazem (Cardizem, Tiazac, etc.), Felodipino, Isradipino, Nicardipino, Nifedipina (Procardia), Nisoldipino (Sular), Verapamilo (Calan SR, Verelan). ((MFMER), Bloqueadores de los canales de calcio, 2021).

Ejemplos de fármacos con acción diurético tiazídico son: Clorotiazida, Clortalidona, Hidroclorotiazida, Indapamida, Metolazona. ((MFMER), Diuréticos, 2021).

La combinación de este tipo de dosis fijas (BRAG+diurético) reduce eficazmente la presión arterial tan pronto como 1 a 4 semanas después de comenzar el tratamiento. Sin embargo, después del tratamiento con algunos pacientes tienen síntomas persistentes no controlados y puede ser necesario un régimen de terapia triple. Uno de estos regímenes es BRAG+diurético en combinación con BCC en una dosis de 80/12.5/5 mg respectivamente. Debido a que los BCC tienen fuertes efectos reductores de la presión arterial, disminuyen la variabilidad de la presión arterial sistólica más que otras clases de fármacos.

Por el contrario, la combinación de inhibidores de la ECA y bloqueadores de los receptores de la angiotensina II agrega poca reducción de la presión arterial y aumenta el riesgo de disfunción renal e hiperpotasemia

Se han llevado estudios en pacientes con insuficiencia cardíaca con fracción de eyección del ventrículo izquierdo reducido o con nefropatía diabética demostrando eficacia y seguridad de los inhibidores de la ECA y los bloqueadores de los receptores de la angiotensina II por lo que son una opción particularmente buena en este tipo de población. Adicionalmente tienden a mejorar el metabolismo de la glucosa por lo que puede ser una alternativa en pacientes con condiciones que predisponen a la diabetes

mellitus tipo 2, incluida la obesidad y el síndrome metabólico (Oparil, y otros, 2019) (P., Maillard, & Michel, 2007) (Jitsuo, Issei, & Toshio, 2017).

3.2 BRAG-II

3.2.1 Indicaciones terapéuticas:

BRAG-II es un antagonista específico del receptor de angiotensina II tipo 1 utilizado en el tratamiento de la hipertensión. Se sabe que interviene en la mayoría de las acciones fisiológicas relacionadas con la regulación de la presión arterial; al bloquear los efectos vasoconstrictores y secretores de aldosterona de la angiotensina II, reduce la presión arterial independientemente de la vía de síntesis de angiotensina II en modelos animales de hipertensión, así como en humanos. (Jaiswal, Aggarwal, Leelakumari Harikumar, & Singh, 2014). BRAG-II se encuentra indicado para el tratamiento de la hipertensión arterial de acuerdo con el “cuadro básico y catálogo de medicamentos” emitido por el Consejo de Salubridad General 2017.

3.2.2 Dosis y vía de administración:

Actualmente BRAG-II pertenece al cuadro básico de medicamentos indicado para el tratamiento de enfermedades cardiacas en México, específicamente para el tratamiento de hipertensión arterial. De acuerdo con el “cuadro básico y catálogo de medicamentos” emitido por el Consejo de Salubridad General, la presentación farmacéutica en la que actualmente se administra este fármaco, es a través de la vía oral, en forma de tableta con una dosis de 40 mg cada 24 horas (Consejo de Salubridad General, 2017).

3.2.3 Propiedades fisicoquímicas:

BRAG-II es un fármaco derivado del bencimidazol cuya molécula se encuentra constituida por 3 grupos funcionales principales, metilbencimidazol, fenil-bencimidazol y ácido metil fenilbenzónico, en la Figura 5 se representa gráficamente la base de la estructura de este fármaco. Por otra parte, algunas características fisicoquímicas relevantes se resumen en la

Tabla 2. (Son, y otros, 2018) (Pubchem, 2020) (Bajaj, Rao, Pardeshi, & Sali, 2012) (Zhong, Zhu, Luo, & Weike, 2013)

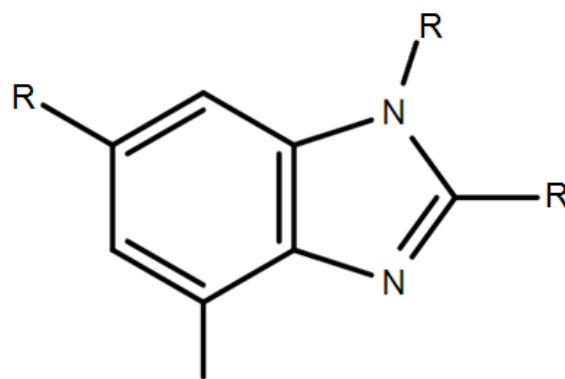


Figura 5. Base estructural de la molécula de BRAG-II

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de BRAG-II. (Drug bank, 2020) (Son, y otros, 2018) (Pubchem, 2020) (Bajaj, Rao, Pardeshi, & Sali, 2012) (Zhong, Zhu, Luo, & Weike, 2013) (Wienen, y otros, 2000) (Kundu, y otros, 2018) (Giri, y otros, 2021)

Fármaco	BRAG-II	
Derivado	Bencimidazol	
PM (g/mol)	514.6	
Solubilidad ($\mu\text{g/mL}$)	Agua	4.42 ± 0.25
	pH 1.2	97.18 ± 18.24
	pH 4.0	2.46 ± 0.39
	pH 6.8	1.26 ± 0.37
	pH 10.0	2557.77 ± 171.02
Log P	3.2 (n-octanol/buffer pH 7.4)	
pK _a	3.65	
	4.45	
	6.13	
Clasificación Biofarmacéutica (SCB)	II	
Punto de fusión (°C)	261 -263	

BRAG-II es poco soluble en agua y aceites, es de naturaleza lipofílica y pertenece al grupo de la clase II de acuerdo con el sistema de clasificación biofarmacéutica (SCB) y la guía correspondiente emitida por la FDA, debido a la alta permeabilidad y baja solubilidad que presenta. Su alto punto de fusión es indicativo de una alta energía cristalina lo que reduce su tendencia a disolverse en cualquier disolvente. Se fabrica y se suministra en forma de ácido libre y se caracteriza por su muy baja solubilidad intestinal, que depende del pH del medio, siendo muy soluble a pH muy ácidos y/o muy básicos (Bajaj, Rao, Pardeshi, & Sali, 2012) (Zhong, Zhu, Luo, & Weike, 2013) (Wienen, y otros, 2000) (Kundu, y otros, 2018).

3.2.4 Propiedades farmacológicas

a) Farmacodinamia

BRAG-II es un antagonista específico de los receptores de la angiotensina II (tipo AT1), activo por vía oral. BRAG-II desplaza a la angiotensina II, con una afinidad muy elevada, de su lugar de unión al receptor subtipo AT1, el cual es responsable de las conocidas acciones de la angiotensina II.

En humanos, una dosis de 80 mg de BRAG-II inhibe casi completamente el aumento de la presión arterial producido por la angiotensina II. El efecto inhibitor se mantiene durante 24 horas y es todavía medible hasta las 48 horas (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), 2017).

La angiotensina II se forma a partir de la angiotensina I en una reacción catalizada por la enzima convertidora de angiotensina (ACE, quinasa II). La angiotensina II es el principal agente presor del sistema renina-angiotensina, con efectos que incluyen vasoconstricción, estimulación de la síntesis y liberación de aldosterona, estimulación cardíaca y reabsorción renal de sodio. BRAG-II bloquea los efectos vasoconstrictores y secretores de aldosterona de la angiotensina II al bloquear selectivamente la unión de la angiotensina II al receptor AT1 en muchos tejidos, como el músculo liso vascular y la glándula suprarrenal. Por lo tanto, su acción es independiente de las vías para la síntesis de angiotensina II (Radenkovic, Stojanović, Nešić, & Prostran, 2016).

También se encuentra un receptor AT2 en muchos tejidos, pero no se sabe que AT2 esté asociado con la homeostasis cardiovascular. BRAG-II tiene una afinidad mucho mayor (> 3,000 veces) por el receptor AT1 que por el receptor AT2. El bloqueo del sistema renina-angiotensina con inhibidores de la ECA, que inhibe la biosíntesis de angiotensina II a partir de angiotensina I, se usa ampliamente en el tratamiento de la hipertensión. Los inhibidores de la ECA también inhiben la degradación de la bradiquinina, una reacción también catalizada por la ECA. Debido a que BRAG-II no inhibe la ECA (quinasa II), no afecta la respuesta a la bradiquinina. Aún no se sabe si esta diferencia tiene relevancia clínica. BRAG-II no se une ni bloquea otros receptores hormonales o canales iónicos que se sabe que son importantes en la regulación cardiovascular. El esquema del mecanismo de acción se ilustra en la Figura 6 (Radenkovic, Stojanović, Nešić, & Prostran, 2016).

El bloqueo del receptor de angiotensina II inhibe la retroalimentación reguladora negativa de la angiotensina II sobre la secreción de renina, pero el aumento de la

actividad de la renina plasmática resultante y los niveles circulantes de angiotensina II no superan el efecto del BRAG-II en la presión arterial (Boehringer Ingelheim, 2009) (Radenkovic, Stojanović, Nešić, & Prostran, 2016) (Dmitry & Peter E., 2012).

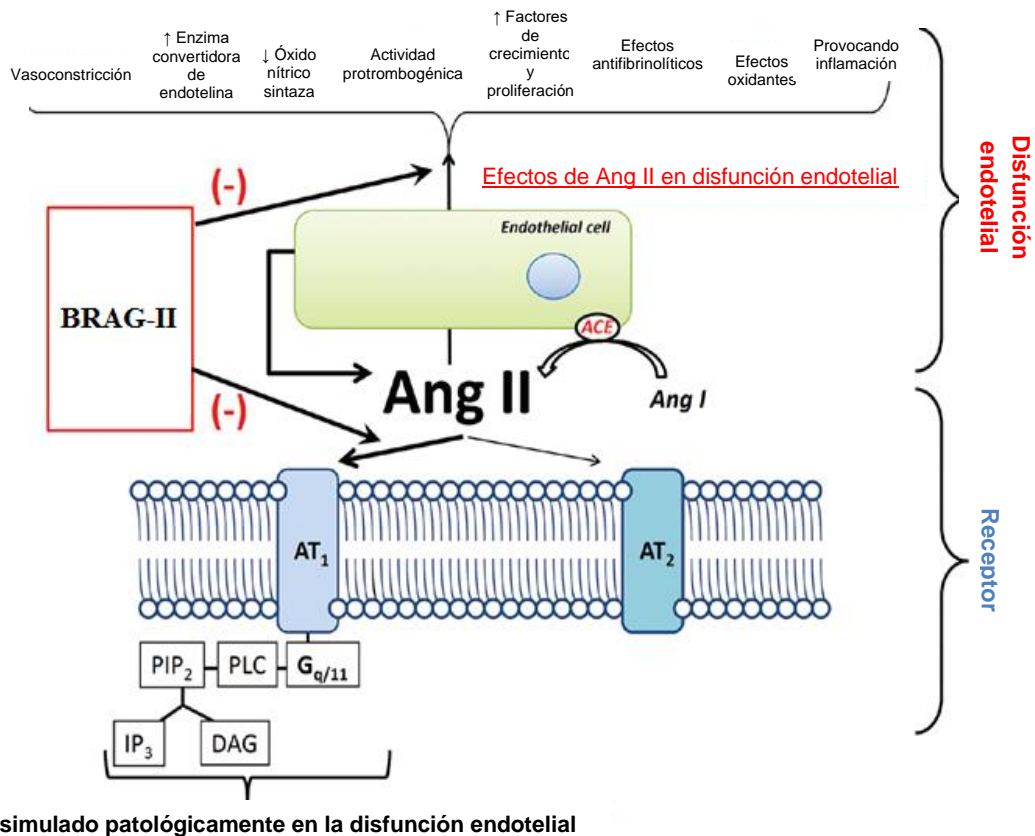


Figura 6. Acción de los bloqueadores de los receptores de angiotensina en la disfunción endotelial relacionada con la angiotensina II. Modificado de (Radenkovic, Stojanović, Nešić, & Prostran, 2016).

b) Farmacocinética

La farmacocinética de BRAG-II administrado oralmente es no lineal sobre el intervalo de dosis de 20 a 160 mg. BRAG-II se absorbe rápidamente en el estómago después de su administración oral, mientras que debido a su escasa solubilidad en el intestino su tasa de absorción se ve limitada en esta región. (Cao, Shi, Cao, Yang, & Cuia, 2016) BRAG-II alcanza concentraciones máximas ($C_{m\acute{a}x}$) aproximadamente de 0.5 a 1 hora después de la administración oral con una biodisponibilidad dependiente de la dosis, que puede ir de 30% –60% (aunque puede observarse una disminución de aproximadamente 6% cuando se administra con alimentos), con 40 y 160 mg, la biodisponibilidad es del 42% y 58%, respectivamente. BRAG-II muestra una cinética de descomposición bi-exponencial con una vida media de eliminación de aproximadamente 24 horas y se elimina principalmente en las heces por excreción biliar (> 97%). El aclaramiento plasmático total de BRAG-II es > 800 mL/min (Boehringer Ingelheim, 2009).

BRAG-II presenta una alta unión a proteínas plasmáticas (> 99.5%), principalmente con la albúmina y la glicoproteína ácida, en donde, la unión no depende de la dosis administrada. Presenta además un volumen muy alto de distribución (~ 500 L), lo que indica su internalización tisular.

Se metaboliza mínimamente por conjugación para formar un acilglucurónido farmacológicamente inactivo; el glucurónido del compuesto original es el único metabolito que se ha identificado en el plasma humano y la orina. Las isoenzimas del citocromo P450 no están involucradas en el metabolismo de este fármaco. (Kang, y otros, 2018), (Moon, y otros, 2019), (Pubchem, 2020)

3.2.5 Toxicidad y efectos adversos

No se tienen datos de intoxicaciones por BRAG-II. Entre las manifestaciones clínicas más tempranas de toxicidad por sobredosis con BRAG-II se encuentran: hipotensión, mareos y taquicardia; la bradicardia puede ocurrir por estimulación parasimpática (vagal). (Drug bank, 2020)

Se ha descrito que los efectos adversos de BRAG-II son leves y transitorios. Se ha evaluado la seguridad del medicamento de referencia de BRAG-II en más de 1700 pacientes, incluidos 716 tratados por hipertensión durante más de 6 meses y 420 durante más de 1 año en donde las reacciones adversas que ocurren lo hacen con una incidencia del 2% en pacientes tratados con BRAG-II y en una tasa mayor que en pacientes tratados con placebo, ver Figura 7 (WebMDRx, 2020).

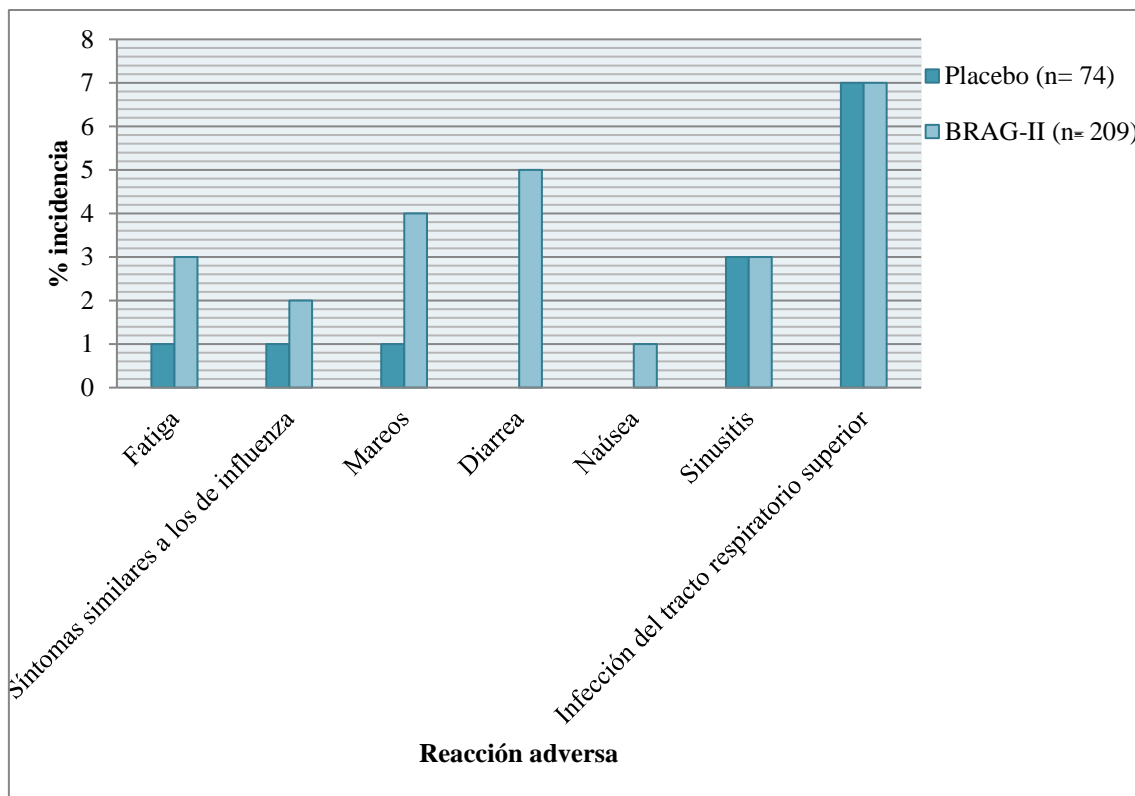


Figura 7. Reacciones adversas que se producen con una incidencia $\geq 2\%$ en pacientes tratados con BRAG-II y con una frecuencia mayor que en los pacientes tratados con placebo. Modificado de (WebMDRx, 2020).

3.2.6 Situación actual

Actualmente BRAG-II se comercializa en México en presentación de tabletas de 40 mg y 80 mg, así como tabletas y cápsulas de gelatina blanda de 80 mg de BRAG-II y en combinación con 12.5 mg de un fármaco con acción diurética.

En Estados Unidos y Europa BRAG-II se comercializa de forma similar o en combinación con alguno de los IFAs referidos en la sección 3.1.2.

En particular, este fármaco se comercializa en la región asiática como un medicamento en forma de tabletas recubiertas, constituido por tres principios activos que están indicados para el tratamiento de la hipertensión y que son administrados en dosis de 80, 12.5 y 5 mg de los activos 1 (BRAG-II), 2 y 3 respectivamente (el activo 2 tiene un efecto diurético y el activo 3 es un bloqueador de canales de calcio indicado para reducir la presión arterial). La administración concomitante de los tres fármacos reúne las características de seguridad y eficacia requeridos para la implementación de esta terapia en otros países. (Segura & Ruilope, 2013). La presentación de este medicamento conteniendo los 3 activos podría mejorar el apego al tratamiento de la hipertensión; ya que en nuestro país no existe una formulación semejante.

3.3 Disolución de medicamentos

El tema de la disolución de medicamentos merece atención especial por su gran importancia en los sistemas farmacéuticos. Generalmente podemos anticipar que un fármaco debe estar en solución para que pueda ejercer su efecto.

Típicamente, el tipo de sistema que encontramos es una sustancia sólida pura (el soluto) en contacto con un líquido puro (el solvente). Permitimos que se logre el equilibrio a temperatura y presión fijas, de modo que en el equilibrio el sistema se componga de la fase sólida pura (en exceso) y una solución líquida de soluto disuelto en el disolvente. A temperatura y presión fijas, al llegar al equilibrio la concentración del soluto disuelto es constante. A esta concentración disuelta invariante la llamamos la solubilidad al equilibrio del soluto, a la temperatura y en el solvente establecido (Connors, 2010).

Por su parte, la disolución es el proceso por el cual un sólido entra en solución (se disuelve) a una velocidad de disolución expresada, en lo general, con la ecuación de Noyes-Whitney (Ecuación 1). (Lu, Tupper, & Murray, 2020)

$$\text{Velocidad de disolución} = \frac{dm}{dt} = \frac{D * A * (C_s - C)}{h}$$

Ecuación 1. Ecuación de Noyes-Whitney

Dónde:

dm/dt = tasa de disolución

D = coeficiente de difusión de la molécula en estudio

A = área de superficie disponible para disolución

C_s = solubilidad del compuesto

C = concentración de soluto en la solución a granel en el tiempo t

H = espesor de la capa estacionaria de difusión

La ecuación anterior demuestra que existen diferentes factores que impactan en el proceso de disolución y estas particularidades son importantes debido a que para llevar a cabo el proceso de absorción de un Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA), es necesario que este se encuentre en solución.

El proceso de disolución se compone de varios subprocesos: disgregación o desintegración de la forma farmacéutica, disolución del fármaco en el medio y por último, en el supuesto de haber sido administrado el medicamento a un organismo vivo, permeación del IFA en solución hacia el lugar de absorción (paso a través de la

membrana). En esta secuencia, la solubilización del IFA y la velocidad a la cual ocurre esto, en general, se considera como una de las fases más importantes, puesto que, es uno de los factores limitativos de la disposición del IFA en el sitio de absorción.

Adicionalmente la evaluación del proceso de disolución de un medicamento siempre ha sido un aspecto importante en el aseguramiento de calidad y es un requerimiento farmacopéico para las formas de dosificación orales sólidas (Rubio, Portilla, Fuentes, Aguilar, & Hernández, 2006).

Los factores que afectan la velocidad de disolución de medicamentos pueden clasificarse en tres categorías:

* Factores que se relacionan con el sólido a disolver, el IFA: Tamaño de partícula, hidrosolubilidad/ lipofilicidad, capacidad de ionización.

*Factores que se relacionan con las condiciones de la prueba. Temperatura a la que se lleva a cabo el proceso de disolución, intensidad de agitación y de acuerdo con la composición del medio de disolución: el pH, la tensión superficial, la viscosidad y la presencia de adsorbentes, sales u otros compuestos.

*Factores que se relacionan con los preparados sólidos. Como los aditivos del preparado, que pueden ser diluyentes, tinturas, fijadores, agentes de granulación, desintegrantes y lubricantes (Genaro, 2003).

Por tanto, es necesario controlar estos factores para poder establecer de manera segura y confiable el desarrollo de ensayos de disolución que sean aplicables en el desarrollo de medicamentos. Considerando que los estudios del proceso de disolución constituyen un intento de garantizar hasta cierto punto si la biodisponibilidad del IFA (la magnitud y velocidad de su absorción) será la adecuada, esta puede ser empleada como una herramienta predictiva del comportamiento del producto *in vivo*, cuando existe una correlación *in vitro-in vivo* (CIVIV). Este último término se abordará más adelante en un apartado específico para su mejor entendimiento (Doménech-Berrozpe, y otros, 2005).

Partiendo de ello a continuación se abordarán aquellos factores que generan un mayor impacto en el desarrollo de un método de disolución, *in vitro*, para establecer una posible CIVIV.

3.3.1 Medios biorrelevantes

Los medios de disolución biorrelevantes se han diseñado para simular las condiciones fisiológicas en el tracto gastrointestinal distinguiendo entre las diferentes zonas, estómago versus intestino, así como las condiciones de ayuno o la presencia de alimentos. Esto es especialmente importante para los fármacos con una solubilidad baja, para los que la composición de los fluidos luminales *in vivo* puede influir de manera importante en su disolución.

Modificaciones a los medios farmacopéicos documentados pueden encontrarse en los capítulos generales de Disolución <711> y Desintegración y disolución de suplementos dietéticos <2040> de la USP, donde se permite, por ejemplo, la adición de enzimas al medio de disolución cuando las cápsulas de gelatina dura o blanda y las tabletas recubiertas de gelatina no se ajustan a la especificación de la prueba de disolución respectiva. La adición de pepsina en medios de disolución con valores de pH inferiores a 6.8 y pancreatina para medios de disolución con valores de pH iguales o superiores a 6.8, es recomendada. Hay que tomar en consideración que la pepsina es estable en el intervalo de pH de 1 a 6 y tiene una buena actividad de proteasa en valores de pH de hasta 4, teniendo una actividad máxima a pH 2, el 70% de la actividad péptica todavía está presente a pH 4.5 y casi ninguna actividad péptica se presenta a pH 5.5. Por encima de pH 6, la pepsina se inactiva rápidamente de forma irreversible y a pH 8 se inactiva por completo (Gray, y otros, 2014).

Otro factor importante para considerar es el volumen acuoso contenido en la región del tracto gastrointestinal (TGI) y el tiempo en que mantiene el medio contacto directo con la forma farmacéutica administrada. En el estómago en estado de ayuno, los volúmenes son bajos y se ha estimado de 25 mL. Sin embargo, cuando se administra una tableta o cápsula, esta se administra con líquido; en estudios farmacocinéticos este volumen suele estar en el intervalo de 200 a 250 mL. Suponiendo secreciones a una velocidad de poco menos de 1 mL/min, se esperan alrededor de 50 mL de volumen de secreción en 1 h, el período promedio durante el cual se espera que una forma de dosificación de liberación inmediata se vacíe totalmente del estómago en ayuno. Por lo tanto, un volumen realista para simular el líquido total disponible en el estómago para disolver formas de dosificación simples durante su residencia gástrica que se vacían con el líquido después de la administración en ayunas estaría en el intervalo de 250 a 300 mL durante un período aproximado de 1 hora (Vertzoni, Dressman, Butler, Hempenstall, & Reppas, 2005).

La Tabla 3 muestra la composición de medios biorrelevantes para emular la disolución de medicamentos en un sistema *in vivo*. Estos medios combinan la presencia de los surfactantes naturales que permiten una solubilización micelar y los valores de pH promedio que prevalece en el estómago y el intestino delgado.

Tabla 3. Composición de medios biorrelevantes. Modificado de (Nitin, y otros, 2014) (González, Fernández, Ruíz, & Bermejo, 2002)

Fluido intestinal simulado en estado de ayuno			Fluido intestinal simulado en presencia de alimentos		Fluido gástrico simulado en estado de ayuno	
pH	6.8	6.5	pH	5.0	pH	1.6
Osmolaridad (mOsmol)	280 – 310 ± 10	270 ± 10	Osmolaridad (mOsmol)	635 ± 10	Osmolaridad (mOsmol)	120.7 ± 2.5
Taurocolato sódico	5 mM	3 mM	Taurocolato sódico	15 mM	NaCl	34.2 g
Lecitina	1.5 mM	0.75 mM	Lecitina	3.75 mM	Lecitina	20 mM
KH ₂ PO ₄	0.029 mM	3.9 g	Ácido acético	8.65 g	Pepsina	0.1 mg/mL
KCl	0.22 M	7.7 g	KCl	15.2 g	Taurocolato de sodio	80 µm
NaOH	csp pH 6.8	csp pH 6.5	NaOH	csp pH 5.0	Tensión superficial	42.6 mN/m
Agua desionizada	csp 1 litro	csp 1 litro	Agua desionizada	csp 1 litro	N/A	N/A

El hecho de cambiar a fluido intestinal simulado en ayunas podría ayudar a comprobar la posibilidad de precipitación en este sitio. La comparación de resultados con un fluido intestinal simulado en presencia de alimentos permitiría establecer la conveniencia de administrar una formulación antes o después de los alimentos.

En el caso de bases débiles de clase II su disolución en estómago es muy relevante, así que se puede utilizar un fluido gástrico simulado para comprobar la disolución inicial. La presencia de surfactantes es también necesaria en este medio para simular las condiciones fisiológicas gástricas.

En caso de ácidos débiles conviene comprobar su disolución en condiciones intestinales durante el período de ayuno y esto se puede modelar con un fluido intestinal simulado

en presencia y ausencia de alimentos. (González, Fernández, Ruíz, & Bermejo, 2002) (Nitin, y otros, 2014)

3.3.2 Aparato 4 USP

Entre los diferentes sistemas *in vitro* disponibles para las pruebas, el aparato 4 de disolución de USP ofrece una opción viable para llevar a cabo las pruebas de disolución de nuevas formas de dosificación. El aparato 4 de disolución de USP es útil para: probar la robustez de la formulación con respecto a las variaciones en el entorno intraluminal, generar una hidrodinámica semejante a la observada *in vivo* dado el flujo continuo del medio, mantener las condiciones *sink* para fármacos poco solubles y permite cambiar el pH del medio de disolución de forma simple. (Namita B. Prabhu, y otros, 2008)

El equipo se compone de un depósito y una bomba para el medio de disolución, celdas de flujo y un baño de agua que mantiene el medio de disolución a la temperatura deseada, generalmente a $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ para medicamentos de administración oral, además de un colector de fracciones y un selector de medios (Figura 8). Se debe usar la celda del tamaño especificado en la monografía individual del fármaco, en caso de existir y con fines de control de calidad. La función de la bomba es la de desplazar el medio de disolución a través de la celda de flujo en dirección ascendente. La bomba tiene un intervalo de operación de 240 ml a 960 ml por hora y las velocidades de flujo estándares son de 4 ml, 8 ml y 16 ml por minuto. Debe suministrar un flujo constante ($\pm 5\%$ de la velocidad de flujo nominal); el perfil del flujo es sinusoidal con una pulsación de 120 ± 10 pulsos por minuto, se puede usar también una bomba no pulsátil. Los procedimientos de la prueba de disolución en los que se usa una celda de flujo deben estar caracterizados con respecto a la velocidad y a las pulsaciones, las cuales son controladas mediante el uso de la bomba del equipo.

a)



b)



Figura 8. a) Composición del equipo disolutor 4 USP de flujo continuo y b) diferentes celdas de flujo (Badillo Lugo, 2017)

Existen diferentes tipos de celdas de flujo, dependiendo del sistema de liberación de fármacos que se requiera evaluar, Figura 8b. La celda de flujo continuo está montada verticalmente con un sistema de filtro que evita el escape de partículas no disueltas desde la parte superior de la celda. El cono inferior de la celda generalmente se llena con pequeñas perlas de vidrio (1 mm \varnothing) y un rubí (5 mm \varnothing), los cuales son colocados en el vértice para proteger el tubo de entrada de fluido. Para las formas farmacéuticas sólidas administradas por vía oral, se utilizan dos celdas estándar: la celda grande (22.6 mm de diámetro interno) y la celda pequeña (12 mm de diámetro interno). Por lo general, se usa un soporte para tabletas para colocar la forma de dosificación.

Aunque actualmente no existe un método único para evaluar los procedimientos de disolución que se basen en el Aparato 4 descrito en la Farmacopea, Eaton et al. (2012) evaluaron las tabletas de ácido salicílico como material de referencia candidato y propusieron una prueba de verificación de rendimiento que demostró ser capaz de probar los efectos de varios parámetros críticos del Aparato 4: el tamaño de las perlas de vidrio, la temperatura de la celda, la velocidad de flujo y el nivel de desaireación del medio.

Shiko y col. (2011) estudiaron la hidrodinámica dentro de la celda de flujo continuo utilizando imágenes de resonancia magnética y enfatizaron la necesidad de comprender

la influencia de las condiciones de prueba en el comportamiento de disolución para definir métodos de disolución de flujo continuo robustos. Establecieron las condiciones que ofrecían perfiles de flujo más uniformes al usar la celda más ancha, colocando la tableta verticalmente y utilizando tasas de flujo más bajas. Cabe señalar que la extracción de las perlas de 1 mm y la operación con solo la perla de rubí de 5 mm en su lugar produjo un campo de flujo caótico y asimétrico en el diámetro interno vacío de 12 mm, incluso con el caudal más bajo de 4 mL/min. El uso de perlas de 1 mm amortiguó el comportamiento de chorro y actuó como distribuidor del flujo, aunque no fue suficiente para asegurar un perfil de flujo laminar completamente desarrollado. Sin embargo, otros autores han cuestionado la asignación de la hidrodinámica a un flujo verdaderamente laminar o turbulento en ausencia de perlas de vidrio de 1 mm. (Kostewicz, Abrahamsson, Brewster, & et.al., 2014)

La elección del filtro apropiado también puede convertirse en un problema al evaluar la disolución de micropartículas o cuando se hace evidente que las partículas insolubles o pegajosas bloquean el filtro y generan contrapresión en la celda.

El aparato 4 USP puede funcionar como un sistema abierto con el medio de disolución del depósito pasando continuamente a través de la celda o como un sistema cerrado, donde se recicla un volumen fijo de medio de disolución.

El sistema abierto permite mantener condiciones “*sink*” o de “*no saturación*” lo que facilita la disolución de fármacos poco solubles y el recambio continuo del medio de disolución a lo largo de la prueba en un intervalo de valores de pH de relevancia fisiológica. Cuando se opera el aparato 4 USP como un sistema abierto, los datos brutos (es decir, las cantidades disueltas durante intervalos de tiempo específicos) se recopilan de forma no acumulativa. Dependiendo del intervalo de tiempo seleccionado, esto puede permitir la estimación de las tasas de liberación del IFA. Por lo tanto, los resultados se generan en forma de velocidades de disolución, es decir, fracción disuelta por unidad de tiempo. En la Figura 9 se muestra un esquema del sistema abierto y la representación de los resultados que arroja el ensayo bajo este esquema.

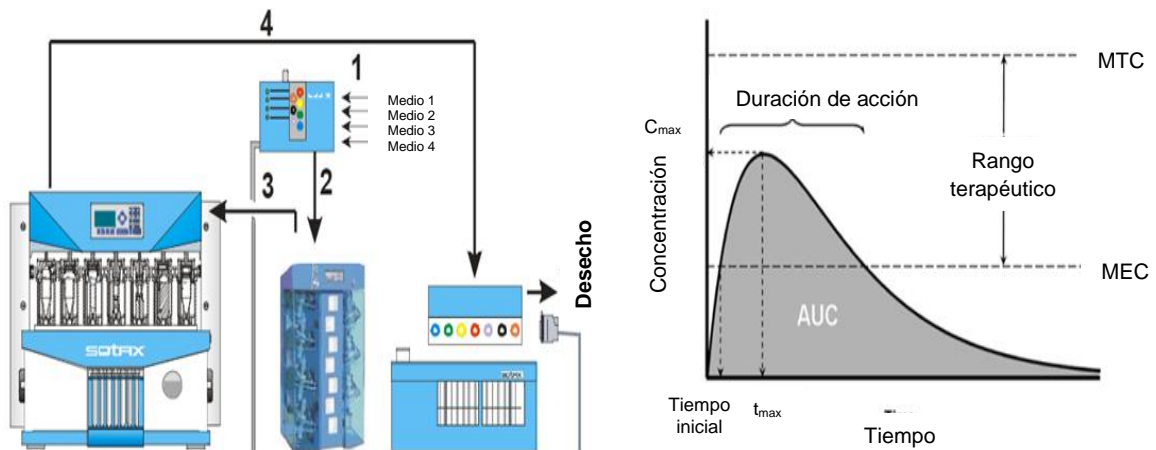


Figura 9. Esquematización del sistema abierto y el tipo de resultados que pueden obtenerse (Badillo Lugo, 2017).

Los resultados obtenidos de las pruebas en sistemas con celdas de flujo continuo necesitan ser transformados para poder ser presentados como un perfil de disolución donde se evalúa la cantidad disuelta. Para poder obtener el porcentaje de fármaco disuelto acumulado es necesario determinar la cantidad disuelta en mg obtenida al *i*-ésimo tiempo de muestreo a partir de la Ecuación 2:

$$\text{masa disuelta}_t = \frac{(C_m)(v)(t)(F_d)}{1000}$$

Ecuación 2. Determinación de cantidad disuelta en mg

Dónde:

C_m = concentración de la muestra en mg/mL

v = velocidad de flujo en mL/min

t = intervalo de tiempo en minutos

F_d = factor de dilución, sólo en caso de realizar diluciones.

Una vez obtenida la cantidad disuelta en cada tiempo, el cálculo del porcentaje disuelto en cada intervalo de tiempo se determina mediante la Ecuación 3:

$$\% \text{ disuelto}_t = \frac{C_d}{C_t} * 100$$

Ecuación 3. Determinación del % disuelto en cada intervalo de tiempo

Dónde:

C_d = cantidad disuelta del fármaco en mg

C_t = contenido teórico de fármaco depositado en la celda

A partir de este resultado puede obtenerse el % disuelto acumulado al sumar los % de cada intervalo de tiempo de manera tal que la adición de todos ellos resultará en la representación gráfica del perfil de disolución similar al obtenido empleando el sistema cerrado (ver Figura 10) (Badillo Lugo, 2017).

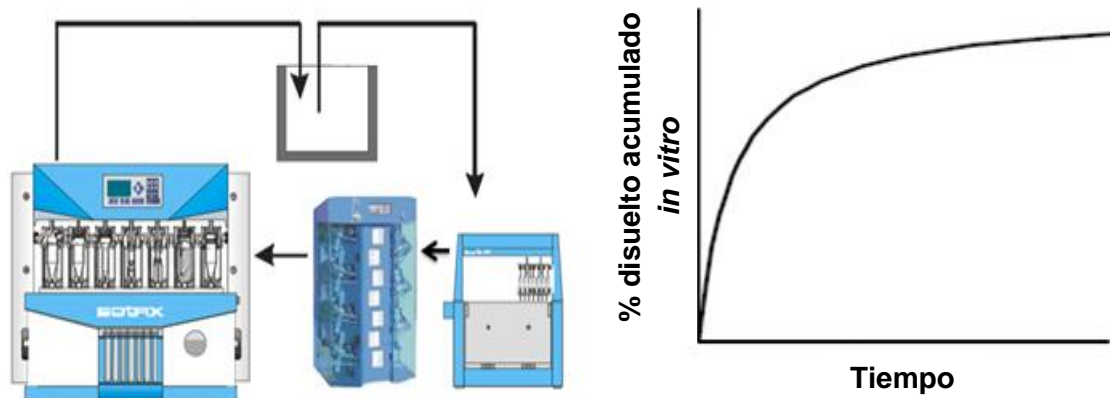


Figura 10. Esquematación del sistema cerrado y el tipo de resultados que pueden obtenerse (Badillo Lugo, 2017).

Cuando el objetivo es caracterizar la cinética del proceso, se debe evitar la transformación de datos a la forma acumulativa, ya que cualquier error asociado con la estimación del fármaco total liberado durante un intervalo de tiempo específico se acumulará en intervalos de tiempo posteriores y se vulnera la independencia de los errores (Vertzoni et al., 2006). Fang y col. (2010) describieron un método de disolución *in vitro* biorrelevante utilizando la forma no acumulativa de datos recopilados con el aparato 4 USP que podrían aplicarse en las áreas de selección de formulaciones, variabilidad de lote a lote y efecto de los alimentos; con el fin de predecir el desempeño *in vivo* del fármaco en la fase inicial del desarrollo de la formulación. Cuando los datos se utilizan en su forma no acumulativa, las tasas de disolución/liberación estimadas dependen en gran medida de la duración del intervalo de tiempo. Como resultado, cuando la disolución limita la absorción, los datos acumulativos a menudo se comparan directamente con los perfiles plasmáticos desconvolucionados acumulados.

El aparato de disolución 4 USP ha sido ampliamente estudiado para la predicción del rendimiento *in vivo* de formas de dosificación administradas por vía oral como cápsulas de amoxicilina, paracetamol, carbamazepina, cápsulas de danazol, espirolactona. La comparación de los perfiles de disolución con métodos empleando el aparato 4 USP y el 2 USP demostró que el aparato 4 USP generaba una mayor sensibilidad y capacidad discriminativa versus el aparato 2 USP, detectando diferencias en el comportamiento de disolución de resinosos estudiados y una relevancia potencialmente mejorada para las características de liberación del fármaco *in vivo*. (Namita B. Prabhu, y otros, 2008)

Por otro lado, Kalantzi y col. (2005) demostraron que la disolución del paracetamol a partir de formulaciones de liberación inmediata utilizando el aparato de flujo continuo es rápida y completa en medios que simulan el estado de ayuno, mientras que se retrasa sustancialmente en los medios correspondientes que simulan el estado alimentado. Estos datos reflejan los tiempos de desintegración retardados de estas tabletas en el estómago en estado alimentado. Los experimentos *in vitro* con medios biorrelevantes modificados en términos de niveles de sales biliares y fosfolípidos para condiciones de ayuno o alimentación con el aparato de celda de flujo continuo dieron buenas IVIVC para las cápsulas de danazol en ambas condiciones simuladas. (Kostewicz, Abrahamsson, Brewster, & et.al., 2014)

Información previa demuestra que el sistema de flujo continuo ha demostrado ser útil en el desarrollo de un método de disolución más discriminatorio que el oficial en el aparato 2 USP para el albendazol, compuesto poco soluble, y para establecer una relación *in vitro-in vivo* de supositorios de paracetamol, un medicamento de clase IV. (Molina, Salazar, Hurtado, Cortés, & Domínguez-Ramírez, 2014)

Adicional a ello, en estudios previos del Grupo Interdisciplinario de Investigación en Farmacia y Química del Estado Sólido FF: CIQ, UAEM se ha evaluado el efecto del gradiente de pH generado por el aparato 4 USP, en la disolución de una fase cocrystalina de Praziquantel (CC-PZQ), un fármaco con efecto antiparasitario. El aparato USP 4 permitió llevar a cabo el cambio de medio por lapsos de tiempo establecidos (permitiendo simular el ambiente encontrado en el tracto gastrointestinal con el uso de medios biorrelevantes). De acuerdo con los resultados obtenidos se pudo diferenciar el efecto en la cinética de disolución debida tanto a la fase sólida, como a los componentes del medio de disolución y se pudo concluir que el uso de este equipo representa una alternativa para establecer una correlación *IV/IV* significativa. (Badillo Lugo, 2017)

Por otro lado, de acuerdo con estudios realizados en la Universidad Miguel Hernández en España se ha desarrollado con éxito un método de disolución predictivo *in vitro-in vivo* para tres formulaciones de liberación inmediata oral de BRAG-II, el producto de referencia y dos formulaciones genéricas (X1 y X2). Respecto a diversas condiciones de disolución analizadas, solo el aparato USP IV con cambio de medios, - medios de disolución con pH 1.2, 4.5 y 6.8- y en presencia del 0,05% de Tween 80 (la información del tiempo de muestreo establecido en el estudio de disolución se observa en la Figura 11), pudo ordenar las formulaciones *in vitro* en la misma secuencia obtenida *in vivo*. Los valores f_2 de los perfiles de disolución en esta condición confirmaron la similitud de las formulaciones bioequivalentes y la no similitud de las no bioequivalentes. (Picazo, y otros, 2018)

Medio de disolución	Velocidad de flujo (mL/min)	Tiempos de muestreo (min)
Medio Ph. Eur.		
pH 1.2 (durante 15 min)	8	5, 10, 15
pH 4.5 (durante 15 min)	8	20, 30
pH 6.8 (durante 15 min)	8	45, 60, 90, 120
Medio Ph. Eur. con surfactante		
pH 1.2 con Tween 80 (0.05% (15'))	8	5, 10, 15
pH 4.5 con Tween 80 (0.05% (15'))	8	20, 30
pH 6.8 con Tween 80 (0.05% (15'))	8	45, 60, 90, 120
Medio biorrelevante FaSSIF	8	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120

Figura 11. Condiciones de disolución en aparato 4 USP. Modificado de (Picazo, y otros, 2018)

Por lo anterior, el uso del equipo 4 USP resulta ser una herramienta altamente efectiva para el desarrollo del presente estudio dadas las ventajas documentadas hasta ahora.

3.4 Correlación *in vitro- in vivo* (CIVIV)

Las especificaciones de disolución *in vitro* se establecen para garantizar la consistencia de un lote a otro, al tiempo que se señalan los posibles problemas con la biodisponibilidad *in vivo* entre diferentes productos farmacéuticos. En las primeras etapas del desarrollo de la formulación, las pruebas de disolución *in vitro* proporcionan una guía para optimizar la liberación del fármaco de las formulaciones. Mientras que, en etapas posteriores, puede emplearse como un indicador del comportamiento *in vivo* de

los medicamentos para reducir potencialmente el número de estudios de biodisponibilidad/ bioequivalencia (Namita B. Prabhu, y otros, 2008)

La USP y la FDA proponen cada una su definición de correlación *in vivo-in vitro*:

USP: El establecimiento de una relación entre una propiedad biológica o un parámetro derivado de una propiedad biológica producida por una forma dosificada, y una característica fisicoquímica de la misma forma dosificada.

FDA. Mostrar una relación entre 2 parámetros. Típicamente se obtiene una relación entre la velocidad de disolución *in vitro* y la velocidad de entrada *in vivo*. (Kayali, 1994)

A partir de estas definiciones y de la experiencia acumulada por muchos investigadores que han trabajado desde principios de la década de 1960 sobre este tema, se ha diferenciado la manera de obtener correlaciones *in vitro-in vivo* en 3 niveles; en orden descendiente según su capacidad para predecir la curva plasmática completa que resultará de la administración de una forma de dosificación dada. Sin embargo, independientemente del nivel de correlación que se obtenga, lo que se busca es obtener una prueba de disolución que evite estudios clínicos durante la optimización de formulaciones, el escalado o cambios en el sitio de manufactura y equipos; además de permitir ajustar especificaciones de disolución para cada formulación en particular. A continuación, se definen los 3 niveles propuestos (Recio, Delgado, Ruano, & Fernández, 1999):

Nivel A. Relación punto a punto entre la velocidad de disolución *in vitro* y la velocidad de entrada *in vivo* del fármaco a partir de la forma dosificada. Por tanto, este nivel puede reflejar la curva completa de niveles plasmáticos y la curva de disolución *in vitro* que puede servir como sustituto del comportamiento *in vivo*. Es por esto que cualquier cambio en el sitio y/o método de manufactura, sustitución de materias primas y modificaciones menores en la formulación, pueden ser justificados sin la necesidad de estudios en humanos adicionales. Para este tipo de correlación se pueden establecer los extremos de disolución *in vitro* por un procedimiento de convolución o deconvolución. Además, es un fiel control de calidad que predice el comportamiento *in vivo* de los lotes. El desarrollo de este nivel de correlación se puede llevar a cabo tomando dos consideraciones; la primera, cuando la velocidad de disolución es dependiente de las condiciones de prueba y la segunda, cuando la velocidad de disolución es independiente de las condiciones de prueba. El desarrollo de la correlación de nivel A, cuando la velocidad de disolución es dependiente de las condiciones de prueba, se puede realizar considerando los pasos siguientes:

-
1. Estudio *in vivo* de la formulación para comprobar si cumple los requerimientos *in vivo* (estudio de biodisponibilidad (BD) y/o bioequivalencia (BE)).
 2. Identificar variables de manufactura críticas.
 3. Desarrollo de varios métodos de disolución (estudios *in vitro* en diferentes medios de disolución, velocidades de agitación, aparatos, etc.) y obtención de perfiles de disolución.
 4. Someter los resultados de los perfiles de disolución obtenidos en el paso anterior a un proceso de convolución matemática, modelo-independiente o técnicas de modelo-dependiente como Wagner-Nelson o Loo-Riegelman para obtener curvas de nivel plasmático simuladas.
 5. Comparar las curvas simuladas (paso 4) con la curva obtenida experimentalmente en el estudio *in vivo* (paso 1), para seleccionar las condiciones de disolución que brindan la curva que se superpone más adecuadamente a la real (*in vivo*).
 6. Validación de las condiciones de disolución.
 - a) Preparar uno o más lotes con diferente velocidad de disolución (uno con mayor y otro con menor velocidad que el lote usado en el estudio de BD/BE), medida con el método de disolución escogido en el paso anterior.
 - b) Determinar comportamiento *in vivo* de los lotes. Si se superpone la curva simulada a la obtenida en el estudio *in vivo* queda validado el método de disolución.
 7. Establecer especificaciones de disolución.
 8. Validación de la correlación.

Nivel B. Utiliza los principios del análisis de momentos estadísticos. Se compara el tiempo medio de disolución *in vitro* (TMD) con el tiempo medio de residencia (TMR). No es una correlación punto a punto pues no refleja la curva de niveles plasmáticos, debido a que diferentes curvas *in vivo* producen valores similares de TMR. Por esta razón no se puede confiar sólo en el nivel B para justificar modificaciones en la formulación, cambios en el sitio de manufactura, etc. Los datos *in vitro* obtenidos de esta correlación no pueden usarse para establecer los extremos de disolución.

Nivel C. Esta categoría relaciona un punto de tiempo de disolución y un parámetro farmacocinético como ABC, $C_{m\acute{a}x}$ y $t_{m\acute{a}x}$. Este nivel tampoco refleja la curva plasmática y generalmente sólo se usa como guía en el desarrollo de la formulación o como control de calidad. Al igual que el nivel B, no justifica variaciones en la manufactura. Teniendo en cuenta el criterio de aceptación de las guías de la FDA que indican que si el promedio del porcentaje absoluto del error de predicción (% EP) es del 10 % o menos, para $C_{m\acute{a}x}$ y el ABC se establece un buen nivel de predicción. Además, en ninguna formulación el % EP debe superar el 15 %. (Cárdenas Cuadros, 2015)

Nivel C múltiple. En este caso se relaciona uno o más parámetros farmacocinéticos de interés con la cantidad de fármaco disuelto en diferentes tiempos del perfil de disolución. Debe ser demostrada una relación en cada punto de tiempo con el mismo parámetro, de tal manera que el efecto sobre el desempeño *in vivo* después de algún cambio en la disolución pueda ser determinado. Este nivel puede ser igual de útil al obtenido en el nivel A. (Cárdenas Cuadros, 2015)

Para obtener una correlación, es imprescindible desarrollar y validar un método de disolución que sea lo suficientemente sensible, como para detectar diferencias en las velocidades de disolución entre los lotes, de manera que sirva como sustituto del estudio *in vivo*. Se pueden diseñar estudios con diferentes aparatos, a varios pHs, a diferentes velocidades de agitación entre otras variaciones, incluyendo las que propone la farmacopea. Luego se selecciona entre todas, cuál es la que mejor discrimina entre distintos lotes con diferentes velocidades de disolución, que fueron fabricados teniendo en cuenta las variables críticas encontradas para la formulación en particular. Así, con el método de disolución escogido y los datos obtenidos en los estudios de biodisponibilidad ó bioequivalencia, se obtienen las especificaciones de disolución *in vitro* en el cual pueden moverse los lotes de una formulación y aun así resultar bioequivalentes. (Recio, Delgado, Ruano, & Fernández, 1999)

El desarrollo de una correlación tipo A se puede hacer en una o dos etapas. En la primera etapa se desarrollan formulaciones con distinta velocidad de liberación, por ejemplo, lenta, media y rápida. Se obtienen los perfiles de disolución *in vitro* y los perfiles *in vivo* de concentración plasmática para todas las formulaciones. A partir de las curvas de nivel plasmático se obtienen las curvas de cantidades absorbidas o disueltas *in vivo*. La segunda etapa consiste en establecer la correlación entre las cantidades disueltas *in vitro* y las absorbidas *in vivo* a los mismos tiempos y finalmente, la predicción de los niveles plasmáticos a partir de datos *in vitro* usando el modelo establecido.

El primer problema a abordar es calcular las cantidades absorbidas a cada tiempo a partir de las curvas de concentraciones plasmáticas. Para ello es importante recalcar que el concepto de fracción absorbida de fármaco debe diferenciarse de biodisponibilidad sistémica. La disponibilidad sistémica se puede expresar con la Ecuación 4.

$$F_{sys} = F_a(1 - E_g)(1 - E_h)$$

Ecuación 4. Disponibilidad sistémica

Donde F_a es la fracción absorbida, E_g es la tasa de extracción intestinal y E_h la tasa de extracción hepática. De modo que F_a representa el límite máximo de biodisponibilidad oral en ausencia de pérdidas por metabolismo presistémico.

Para cuantificar la cantidad de fármaco absorbido es conveniente determinar la naturaleza de la cinética de entrada del medicamento en el torrente sanguíneo. Esto puede lograrse mediante una evaluación apropiada de los datos de concentración hemática (sérica o plasmática) y tiempo y, a veces, mediante datos de excreción urinaria. El método de Wagner-Nelson se basa en el modelo abierto monocompartimental, pero, en ciertos casos, proporciona soluciones correctas cuando se aplica a datos que encajan en un modelo abierto bicompartimental. El método de Loo-Riegelman se basa en el modelo abierto bicompartimental. Para este último método se requiere que el medicamento se administre por vía endovenosa (a tiempo diferente) al mismo individuo cuyos datos de administración oral o intramuscular van a evaluarse; mientras que el método de Wagner-Nelson no exige este condicionante. Por aplicación de ambos métodos se obtiene la cantidad de fármaco que se ha absorbido en un instante determinado dividido por un volumen de distribución, como función del tiempo. Cuando los datos encajan en el modelo abierto bicompartimental, el volumen afectado es $V_{d_{area}}$ en el caso del método de Wagner-Nelson y V_1 en el método de Loo-Riegelman. Al emplear, cualquiera de los dos métodos, lo mejor es tratar de resolver la curva de concentración vs tiempo resultante para determinar la cinética de absorción, y no convertir en “porcentaje absorbido” como se indica en los artículos originales. Cuando se hace la conversión a “porcentaje absorbido”, se debe suponer que se conoce la asíntota de la curva de concentración vs tiempo, pero frecuentemente el valor asíntótico no es muy exacto.

3.4.1 Métodos modelo dependientes

a) Método Wagner-Nelson.

El análisis de Wagner Nelson se puede aplicar a los fármacos monocompartimentales. Este método se basa en el balance de masas.

$$Q_{at} = Q_{ct} + Q_{et}$$

Ecuación 5. Balance de masas de fármacos monocompartimentales

Donde Q_{at} es la cantidad de fármaco absorbida que es igual a la cantidad de fármaco en el organismo (Q_{ct}) más la cantidad de fármaco eliminada (Q_{et}).

La cantidad de fármaco en el organismo (Q_{ct}) a tiempo t se puede calcular a partir de la concentración plasmática y del volumen de distribución. La cantidad de fármaco eliminado se calcula mediante el producto de la constante de velocidad de eliminación, el volumen de distribución y el área bajo la curva de tiempo cero a tiempo t .

$$Q_{ct} = C * V_d$$

Ecuación 6. Cantidad de fármaco en el organismo

$$Q_{et} = k_{el} * V_d * AUC_0^\infty$$

Ecuación 7. Cantidad de fármaco eliminado

Sustituyendo las expresiones en el balance de masas:

$$Q_{at} = C_t * V_d + k_{el} * V_d * AUC_0^t$$

Ecuación 8. Balance de masas sustituido

A partir del cociente entre estas dos ecuaciones se puede calcular la fracción absorbida.

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = \frac{C_t * V_d + k_{el} * V_d * AUC_0^t}{k_{el} * V_d * AUC_0^\infty}$$

Ecuación 9. Fracción absorbida

$$Q_{at}/V_d = Q_{ct}/V_d + Q_{el}/V_d$$

Ecuación 10. Fracción absorbida simplificada

Se pueden transformar cantidades en concentraciones dividiendo todos los términos en las ecuaciones por V_d , de manera que la expresión final es la siguiente:

$$\frac{A_t}{A_\infty} = \frac{C_t + k_{el} * AUC_0^t}{k_{el} * AUC_0^\infty}$$

Ecuación 11. Fracción absorbida en términos de concentración

$$1 - \frac{A_t}{A_\infty} = \text{fracción remanente}$$

Ecuación 12. Fracción remanente

Esta ecuación representa la fracción de la dosis disponible que se ha absorbido a tiempo t y la segunda la fracción remanente que queda por absorber.

Las gráficas de fracciones absorbidas de Wagner Nelson alcanzan siempre el 100% incluso si la biodisponibilidad es completa, ya que se calcula la fracción de la cantidad biodisponible no de la fracción de dosis.

Al hacer el balance de masas, no se asume ningún modelo cinético para el proceso de absorción del fármaco, pero obviamente, el diagrama de Wagner Nelson será diferente dependiendo de la cinética de absorción.

Cuando se aplica el análisis monocompartimental a los niveles de plasma, los diagramas de Wagner Nelson alcanzan valores superiores al 100% y no es posible calcular la constante de velocidad de absorción ni las fracciones absorbidas o remanentes.

Para fármacos bicompartimentales, es necesario tener en cuenta en el balance de masas la cantidad de fármaco en el compartimento periférico.

Una de las ventajas del método de Wagner-Nelson es que los cálculos pueden realizarse a partir de las curvas de niveles plasmáticos tras la administración oral sin necesidad de realizar una administración intravenosa del fármaco, puesto que se parte de la premisa de que la constante de eliminación puede obtenerse a partir del tramo final de la curva oral.

Un problema que puede presentarse es que cuando la velocidad de absorción es el paso limitante de la eliminación y la pendiente del tramo final representa dicho proceso de absorción. Esto suele suceder al evaluar productos de liberación controlada o fármacos clase III y IV del SCB. Una solución razonable es utilizar una estimación de la constante de velocidad de eliminación obtenida tras una administración intravenosa o tras la administración de una forma de dosificación de liberación inmediata en los mismos individuos. Por supuesto, se asume que no hay variaciones significativas entre la cinética de disposición entre ambas administraciones en cada sujeto.

b) Modelo Loo-Riegelman.

Este modelo, al igual que el método Wagner Nelson, no implica ninguna suposición referente a la cinética de absorción del fármaco. Una ventaja adicional es que las cantidades absolutas se pueden calcular partiendo de los datos de la curva intravenosa (del volumen de distribución central).

El balance de masas según Loo-Riegelman es similar al de Wagner-Nelson:

$$\frac{Q_a}{V_c} = \frac{Q_c + Q_e + Q_p}{V_c}$$

Ecuación 13. Balance de masas según Loo-Riegelman

$$A_t = C_t + E_t + P_t$$

Ecuación 14. Balance de masas según Loo- Riegelman en términos de concentración

Las cantidades se transforman en concentraciones dividiéndolas por el volumen central. El problema ahora es el cálculo de la cantidad y la concentración de fármaco en el compartimiento periférico.

$$A_t = C_t + k_{10} * V_d * AUC_0^t + P_t$$

Ecuación 15. Cantidad de fármaco total

$$P_t = k_{12} * e^{-k_{21}*t} * \int_0^t C * e^{k_{21}*t} * \partial t$$

Ecuación 16. Cantidad de fármaco en el compartimento periférico

$$P_t = P_{t-1} * e^{-k_{21}*\Delta t} + \frac{k_{12}}{k_{21}} * C_{t-1} (1 - e^{-k_{21}*\Delta t}) + \frac{k_{12}}{2} * \Delta C * \Delta t$$

Ecuación 17. Solución de la ecuación de Loo-Riegelman

La ecuación anterior es la solución exacta a la ecuación de Loo-Riegelman que fue publicada por Wagner y la que se muestra a continuación es una solución aproximada, que puede aplicarse cuando los intervalos de muestreo son cortos y si el cambio de la concentración entre dos tiempos consecutivos se puede aproximar mediante una función lineal.

$$\text{cantidad} = f(\tau_n) * \Delta\tau$$

Ecuación 18 Ecuación de Loo-Riegelman aplicada

Para realizar estos cálculos son necesarios los parámetros del fármaco obtenidos tras la administración intravenosa en los mismos sujetos.

3.4.2 Métodos independientes de modelo

a) Método de deconvolución.

Los métodos de deconvolución no asumen ningún modelo cinético para la disposición del fármaco. La convolución se puede aplicar a los sistemas lineales, o en otras palabras, la integral de convolución es la definición matemática de un sistema lineal.

Para entender mejor estos métodos, primero se definirán todos los términos y se procederá a derivar la integral de convolución.

Un sistema se caracteriza por su punto de entrada o impulso (que corresponde con la zona de absorción) y por la respuesta, considerando la respuesta aquella variable que se mide como consecuencia de un impulso.

La función de entrada más importante es el impulso unitario. En términos matemáticos se conoce como función delta (δ). Un bolus IV es una buena aproximación o descripción del impulso unitario. La respuesta al impulso unitario se llama C_δ o función característica. La respuesta al impulso unitario es la respuesta a un impulso dividido por la magnitud del mismo. En términos prácticos es el perfil concentración-tiempo después de administrar un bolus intravenoso dividido por la dosis.

Un sistema para ser lineal requiere dos características: superposición e invarianza con el tiempo.

El principio de la superposición significa que si el impulso unitario (δ) produce la respuesta al impulso unitario (C_δ), si se utiliza A veces el impulso unitario se obtendrá A veces la respuesta al impulso unitario.

La invarianza en el tiempo se refiere a que el impulso unitario produce la misma respuesta independientemente de cuando se inicie dicho impulso.

Al aplicar ambos principios, si se tienen dos impulsos, se obtendrá la suma de las respuestas a ambos impulsos. Para obtener la respuesta se tienen que aplicar los principios de invarianza y superposición. La respuesta corresponde a la suma de todas

las respuestas y cada respuesta es el producto de la respuesta al impulso unitario y la cantidad de entrada.

Se puede simplificar esta expresión, y cuando el intervalo del tiempo tiende a cero se obtiene la integral de convolución.

$$C(t) = [f(\tau_0) * \Delta\tau] * C_\delta * (t - \tau_0) + [f(\tau_1) * \Delta\tau] * C_\delta * (t - \tau_1) + \dots [f(\tau_n) * \Delta\tau] * C_\delta * (t - \tau_n)$$

Ecuación 19. Integral de convolución

La deconvolución se puede utilizar para estimar una función de entrada dada la respuesta correspondiente del sistema y la respuesta al impulso unitario de ese sistema. La respuesta al impulso unitario debe obtenerse mediante una administración de referencia. Generalmente se usa una administración intravenosa pero una administración oral de una solución o una forma de dosificación de liberación inmediata pueden también ser válidas.

A continuación se exponen tres procedimientos matemáticos para realizar la deconvolución:

*Deconvolución analítica mediante transformadas de Laplace.

Las transformadas de Laplace simplifican la resolución de la integral de la convolución.

Para convolucionar dos funciones:

1. se determina la transformada de Laplace de cada función.
2. se multiplican las funciones transformadas.
3. se calcula la transformada inversa.

Así pues, la convolución de dos funciones es la inversa de la transformada de Laplace del producto de ambas funciones en el dominio de Laplace.

*Deconvolución implícita mediante regresión.

Si se asume que la función de entrada es una función con p parámetros, el problema de deconvolución se transforma en un problema de regresión en el cual los parámetros son estimados mediante regresión no lineal.

La deconvolución mediante regresión implica el ajustado simultáneo de la función respuesta (curva oral) y de la respuesta al impulso unitario (curva intravenosa). De esta

manera, se obtienen los parámetros de disposición, y se pueden extraer los parámetros de la función de entrada, tal como se esquematiza en la siguiente Figura 12:

Deconvolución implícita mediante regresión

$$c_s(t) = \frac{1}{D} \cdot \left(\frac{D}{V_c} \cdot e^{-k_d t} \right) \quad c(t) = \frac{F \cdot D \cdot k_a}{V_c \cdot (k_d - k_a)} \cdot (e^{-k_d t} - e^{-k_a t})$$

1: Ajuste simultáneo
2: Extracción de los parámetros de la función de entrada

$$f(t) = F \cdot D \cdot k_a \cdot e^{-k_a t}$$

Figura 12. Deconvolución implícita mediante regresión no lineal. El ajuste conjunto de las funciones respuesta y función respuesta al impulso unitario permite extraer los parámetros de la función de entrada (González, Fernández, Ruíz, & Bermejo, 2002).

El mismo método se puede aplicar a la disposición multiexponencial. Se puede, por lo tanto, representar la disposición multiexponencial y la función de entrada como polinomios o funciones tipo spline.

*Método numérico de deconvolución: método punto-área.

En el método de deconvolución punto-área el principal supuesto es que, en un intervalo corto, la función de entrada es constante así que se puede extraer fuera el término de la integral.

Con la sustitución apropiada de variables y cuando $\Delta\tau$ (delta tau) es constante, se obtiene una expresión numérica para las velocidades de entrada.

$$R_n = \frac{C_n - \sum_{i=2}^n R_{i-1} * AUC_{\delta_{n-i+1}}^{n-i+2}}{AUC_0^1}$$

Ecuación 20 Velocidad de entrada del fármaco al organismo

Esta ecuación da el nombre al método porque se utilizan para el cálculo de las concentraciones plasmáticas orales y las áreas bajo la curva, (AUC) de la respuesta al impulso unitario.

Una vez calculadas las velocidades de entrada sucesivas, si se multiplica cada velocidad por el intervalo de tiempo, se obtienen las concentraciones acumuladas y se

pueden calcular los residuales. Es apreciable en algunos ejemplos de fármacos bicompartimentales que los resultados obtenidos con Loo-Riegelman y el método de deconvolución son muy similares.

Cuando los datos llevan asociado error experimental los métodos de deconvolución pueden presentar ciertos problemas. Existen programas que ofrecen esta herramienta como Winnonlin, Kinetica o Gastroplus.

Hay que recordar que con los métodos de Loo-Riegelman y de Wagner Nelson se obtenía la fracción biodisponible. Con el método de deconvolución-convolución la función *in vivo* que se obtiene depende de la referencia usada durante el proceso de deconvolución.

Si se utiliza una administración intravenosa como referencia, la respuesta al impulso unitario del sistema corresponde a la disposición del fármaco y, por tanto, la función de entrada incorpora todos los procesos anteriores, es decir, la absorción del fármaco, su disolución y el efecto de primer paso.

En el caso de una solución oral como referencia, la respuesta del impulso unitario incluye ya la absorción, el primer paso y la disposición, así que, mediante la deconvolución, la función de entrada que obtenemos corresponde a la velocidad de liberación.

Si la referencia es una forma de dosificación de liberación inmediata del fármaco, la respuesta del impulso unitario incorpora la disolución desde la forma de dosificación inmediata, así que la función de entrada representa la velocidad de liberación de la forma de dosificación.

Con cualquiera de los métodos descritos hasta el momento se obtiene el perfil de absorción *in vivo*. El paso siguiente es establecer la correlación *in vivo- in vitro*, es decir la función matemática que relaciona disolución *in vitro* y absorción *in vivo*. En la segunda etapa, el objetivo consiste en predecir a partir de los datos *in vitro*, las concentraciones plasmáticas.

El método de una sola etapa implica un paso de convolución y en este caso, se comparan directamente concentraciones plasmáticas predichas y observadas. Para estos métodos, una administración de referencia podría ser útil, pero la correlación se puede desarrollar sin ella. Las ventajas de este método en relación con el de deconvolución (dos etapas), son que la relación entre la liberación *in vitro* y las

concentraciones plasmáticas de fármaco se establecen en un solo paso, así que el modelado se centra en la capacidad de predecir el comportamiento *in vivo*. Los resultados se pueden interpretar en términos del efecto de la velocidad de liberación *in vitro* sobre los parámetros habituales de bioequivalencia. Es más fácil trabajar con un método que no requieren la administración intravenosa o de una solución oral o forma de liberación inmediata como referencia.

Una vez que se obtiene las fracciones disueltas *in vitro* e *in vivo* se deben hacer superponibles mediante una corrección de escala de tiempo basada en un gráfico de Levy. El enfoque habitual y empírico para construir la gráfica de Levy es explorar el % de FD observado y la fracción (de dosis biodisponible) absorbida (% de FD_{abs}) y tratar de igualarlos mediante la captura de proximidad de los dos tiempos correspondientes y crear los ejes de la gráfica. Se crea una relación entre los tiempos *in vitro* e *in vivo* correspondientes a fracciones de disolución/absorciones similares y se representa gráficamente en un gráfico de tiempo *in vitro* frente a tiempo *in vivo* donde se pueden aplicar regresiones. (Cardot, Lukas, & Muniz, 2018)

3.4.3 Validación de la correlación y alternativas para el establecimiento de la IVIVC

La validación del modelo consiste en estimar la magnitud del error para predecir el AUC, C_{max} y T_{max} a partir del perfil de disolución. La capacidad de predicción interna corresponde a los errores de estimación de C_{max} y AUC de los datos que se han utilizado en el desarrollo de las correlaciones, mientras que la capacidad de predicción externa se refiere a la bondad de las predicciones para los datos de lotes o formas farmacéuticas no usados en el desarrollo de la correlación. La capacidad de predicción se evalúa en términos del error relativo medio.

En una correlación lineal del nivel A las curvas de disolución-absorción *in vitro* e *in vivo* son superponibles. Cuando esto no se consigue, se pueden seguir dos estrategias: la primera de ellas es encontrar un modelo matemático alternativo, que describa la relación entre ambas curvas y la segunda es cambiar el medio de disolución *in vitro* con el fin de encontrar las condiciones adecuadas para que las curvas sean superponibles.

Solo para fármacos de la clase II es previsible obtener correlaciones de tipo lineal mientras que para fármacos pertenecientes a otra clase del SCB, la relación entre disolución *in vitro* y absorción *in vivo* es más compleja (no lineal) así que son necesarios modelos alternativos. Dado que la molécula de BRAG-II pertenece a la clase II de acuerdo con el SCB, se pretende abordar una correlación de tipo lineal.

Como se mencionó anteriormente, con el fin de encontrar las condiciones adecuadas para que las curvas sean superponibles se debe contemplar el ambiente que puede generarse durante la disolución *in vitro* modificando las condiciones hidrodinámicas y fisicoquímicas del medio de disolución.

3.5 Estudios de bioequivalencia

El poder establecer una correlación *in-vitro-in vivo* resulta muy benéfico en cuanto al tiempo y costo para el desarrollo de nuevas formulaciones de medicamentos, sin embargo, para poder establecerla es necesario realizarla a partir de un estudio de biodisponibilidad, lo cual podría fundamentar el establecimiento de bioequivalencia entre productos.

El término de biodisponibilidad hace referencia a la cantidad de fármaco que llega en forma activa a la circulación sistémica y la velocidad a la que accede a ésta, es decir, la fracción de medicamento capaz de llegar al lugar de acción. Depende de las características fisicoquímicas del principio activo, de los excipientes, del proceso de fabricación y de la conservación de la forma farmacéutica, y también de las características intrínsecas al individuo, como la motilidad intestinal o el pH gástrico.

La bioequivalencia se encuentra definida como la intercambiabilidad de dos especialidades farmacéuticas que tienen el mismo principio activo y biodisponibilidad equivalente. Por lo tanto, dos productos farmacéuticos con una sustancia activa se consideran bioequivalentes si contienen el mismo principio activo, están en la misma dosis molar y sus valores de extensión y velocidad de absorción son tan similares para minimizar el riesgo de cualquier diferencia en su desempeño *in vivo*. (Karalis, Symillides, & Macheras, 2012)

Cualquier modificación en alguno de los factores que afectan la biodisponibilidad de un fármaco, puede alterar tanto la cantidad total de principio activo absorbido como la velocidad a la que se absorbe. Una modificación en la absorción del fármaco en el organismo podría representar, ya sea toxicidad (en caso de concentraciones elevadas) o bien no alcanzar respuesta terapéutica (en caso de concentraciones bajas). Por ello en el desarrollo de una especialidad farmacéutica genérica, a pesar de que se trata del mismo principio activo, la misma dosis y forma farmacéutica o una alternativa a esta, dichos factores pueden determinar una biodisponibilidad distinta a la del producto de referencia.

En consecuencia, dos especialidades farmacéuticas presentan una biodisponibilidad equivalente si tanto la concentración del fármaco activo como la velocidad a la que accede a la circulación sistémica se encuentran dentro de un intervalo considerado equivalente, cuando se administran a las mismas dosis y bajo las mismas condiciones experimentales. Estos límites se especifican en cada expediente de registro y los parámetros farmacocinéticos requeridos para determinar la biodisponibilidad de una especialidad farmacéutica, de acuerdo con lo establecido por la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) y la Agencia Europea de Medicinas (EMA) son:

- Tasa de absorción determinada por la concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$)
- El área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo desde el tiempo 0 hasta el tiempo t final del estudio ($ABC_{0\rightarrow t}$) y hasta el infinito ($ABC_{0\rightarrow inf}$), que cuantifica la cantidad total de principio activo absorbido considerando la velocidad de eliminación del fármaco (k_e).

De los parámetros anteriores el de mayor interés es el ABC, ya que hace referencia a la cantidad total de fármaco que alcanza la circulación sistémica. No obstante, los otros dos parámetros deben también ser considerados. Se deben presentar los datos del intervalo de confianza del 90% (IC90%) de las razones de los parámetros estudiados (por ejemplo: IC90% del cociente media $ABC_{Prueba}/media\ ABC_{Referencia}$) para lo que previamente debe realizarse un análisis de la varianza (ANOVA). (Rey, 2001)

La FDA exige que los intervalos de confianza (IC) del 90% de la proporción de los medicamentos genéricos y de marca para estos 3 criterios estén dentro del 80% y 125%, mientras que la EMA requiere solo $C_{m\acute{a}x}$ y $ABC_{0\rightarrow t}$. (Meersch, Dechartres, & Ravaud, 2011)

Según las regulaciones de la FDA, los solicitantes deben usar el método más preciso, sensible y reproducible disponible para demostrar biodisponibilidad (BD) o bioequivalencia (BE) de un producto (21 CFR 320.24 (a)). La selección del método utilizado para cumplir con un requisito de prueba *in vivo* o *in vitro* depende del propósito del estudio, los métodos analíticos disponibles y la naturaleza del medicamento. De acuerdo con lo señalado en la norma 21CFR 320.24, se pueden usar varios métodos *in vivo* e *in vitro* para medir BD. Estos incluyen, en orden de preferencia general, estudios farmacocinéticos, pruebas *in vitro* predictivas de BD *in vivo* humana (correlación *in vitro-in vivo*), estudios farmacodinámicos, estudios con puntos finales de beneficio clínico y otros estudios *in vitro*. (FDA, 2019)

Por otro lado, la COFEPRIS a través de la NOM-177-SSA1-2015 establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Aquí establece como parámetros farmacocinéticos para las pruebas de intercambiabilidad (biodisponibilidad o bioequivalencia) en humanos el ABC_{0-t} , ABC_{0-inf} , $C_{máx}$, k_e y la $t_{1/2}$ estimada en la fase terminal. Los criterios de análisis son equivalentes a los referidos por la FDA.

Por otro lado, existe una alternativa para la determinación de bioequivalencia de medicamentos y es a través de exenciones y será válido al cubrir los puntos siguientes:

-Para aquellos medicamentos que se presentan en más de una concentración, en la misma forma farmacéutica, se puede realizar el estudio de bioequivalencia con una de las concentraciones, siempre y cuando estén consideradas en el medicamento de referencia. Los resultados pueden ser extrapolables para las otras concentraciones, cumpliendo con los siguientes requisitos:

-Existe proporcionalidad en el contenido del (os) fármaco(s) y aditivo(s) en la fórmula cuali-cuantitativa con respecto al medicamento que fue declarado bioequivalente. La proporcionalidad se determina bajo los siguientes criterios:

-El o los fármaco(s) y el o los aditivo(s) se encuentran en la misma proporción entre las diferentes concentraciones.

-El o los fármaco(s) y el o los aditivo(s) no se encuentran exactamente en la misma proporción entre las diferentes dosis, pero la relación de ingredientes activos con respecto al peso total de la forma de dosificación puede variar hasta un 10% sin que exista impacto en la velocidad de disolución del fármaco.

-Para fármacos de alta potencia, en donde la cantidad de éstos dentro de la forma de dosificación es muy baja (menores a 10 mg), y el peso total de la forma de dosificación es igual en todas las dosis, existe proporcionalidad, si éstas no varían en más del 10% del peso total de la forma de dosificación.

-En el caso de formulaciones de liberación inmediata, los componentes de la recubierta, colorantes, saborizantes y cubierta de la cápsula no deben ser considerados en los cálculos para establecer la proporcionalidad de las fórmulas.

-El perfil de disolución es similar entre el medicamento bioequivalente y el medicamento con la concentración a exentar, mismo que deberá ser realizado por un Tercero Autorizado.

-Deberá presentar la evidencia científica suficiente, para demostrar que el medicamento presenta una farmacocinética lineal en el intervalo de las concentraciones solicitadas.

-Los procesos de fabricación estén validados.

En los casos previos se establece como requisito para demostrar que un medicamento es intercambiable, cumplir con el factor de similitud (f_2), el cual es determinado a partir de los porcentajes disueltos promedio (considerando la dosis nominal del fármaco) en cada uno de los medios de disolución, implementando la ecuación siguiente, solo si el CV% del porcentaje disuelto es menor o igual que el 20% para el primer tiempo de muestreo y menor o igual que el 10% para los tiempos subsecuentes:

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

Ecuación 21. Factor de similitud

Dónde:

n = número de tiempos de muestreo.

R_t = Promedio del porcentaje disuelto del medicamento de referencia en el i-ésimo tiempo de muestreo.

T_t = Promedio del porcentaje disuelto del medicamento de prueba en el i-ésimo tiempo de muestreo.

El valor de f_2 debe ser calculado en cada uno de los medios de disolución y se deben comparar los valores promedio desde el primer tiempo de muestreo hasta máximo un tiempo de muestreo después de que el medicamento de referencia ha alcanzado el 85% del fármaco disuelto con un mínimo de 3 puntos, si el valor de f_2 es mayor o igual a 50, en el medio o en los 3 medios de disolución, según aplique los perfiles de disolución son similares.

A otros valores de pH, en caso de no existir disolución suficiente para aplicar el modelo de f_2 , podrán utilizarse modelos alternativos soportados con diferencias de no más del 10% y en su caso justificar la relevancia del pH en la absorción u otros factores que pudieran afectar como la descomposición química; los tiempos de muestreo deberán ser los mismos de la muestra de alta disolución. (SEGOB, 2013)

La ecuación f_2 es el método más popular utilizado para comparar los datos del perfil de disolución, dado que se recomienda su uso en varios documentos de orientación de la FDA. Las principales ventajas de la ecuación f_2 son que es fácil de calcular y proporciona un solo número para describir la comparación de los datos del perfil de disolución. Sin embargo, hay desventajas. La ecuación f_2 no tiene en cuenta la variabilidad o la estructura de correlación en los datos. Además, los valores de f_2 son sensibles al número de puntos de tiempo de disolución utilizados. Además, la base de los criterios para determinar la similitud entre los perfiles de disolución no está clara. (Duan, Riviere, & Marroum, 2011)

3.6 Estudios de biodisponibilidad de BRAG-II

Existe un estudio de biodisponibilidad para dos preparados orales, el de referencia (medicamento de origen asiático) y de prueba (producto de Laboratorios Senosiain, S.A. de C.V), constituidos por los principios activos 1, 2 y 3 en dosis de 80, 12.5 y 5 mg. Este estudio consistió en un estudio monocéntrico, abierto, aleatorizado, de cuatro períodos, dos tratamientos, dos secuencias, dosis única, cruzado replicado en 53 voluntarios sanos en ayuno.

Los parámetros farmacocinéticos para BRAG-II fueron determinados a través de métodos no compartimentales (modelo independiente). La estadística de bioequivalencia, que es la que determina la posible intercambiabilidad mostró que las formulaciones no eran bioequivalentes (datos no mostrados).

Con la finalidad de visualizar las posibles diferencias entre las formulaciones y/o tratamientos se graficaron los perfiles de concentración plasmática (\pm error estándar) con respecto al tiempo, obtenidos en los voluntarios participantes. La Figura 13 ilustra el perfil obtenido del activo 1, BRAG-II, que es el fármaco para el cual no se cumple con la bioequivalencia. Los activos 2 y 3 sí muestran similitud con el perfil plasmático de la formulación de referencia (datos no mostrados).

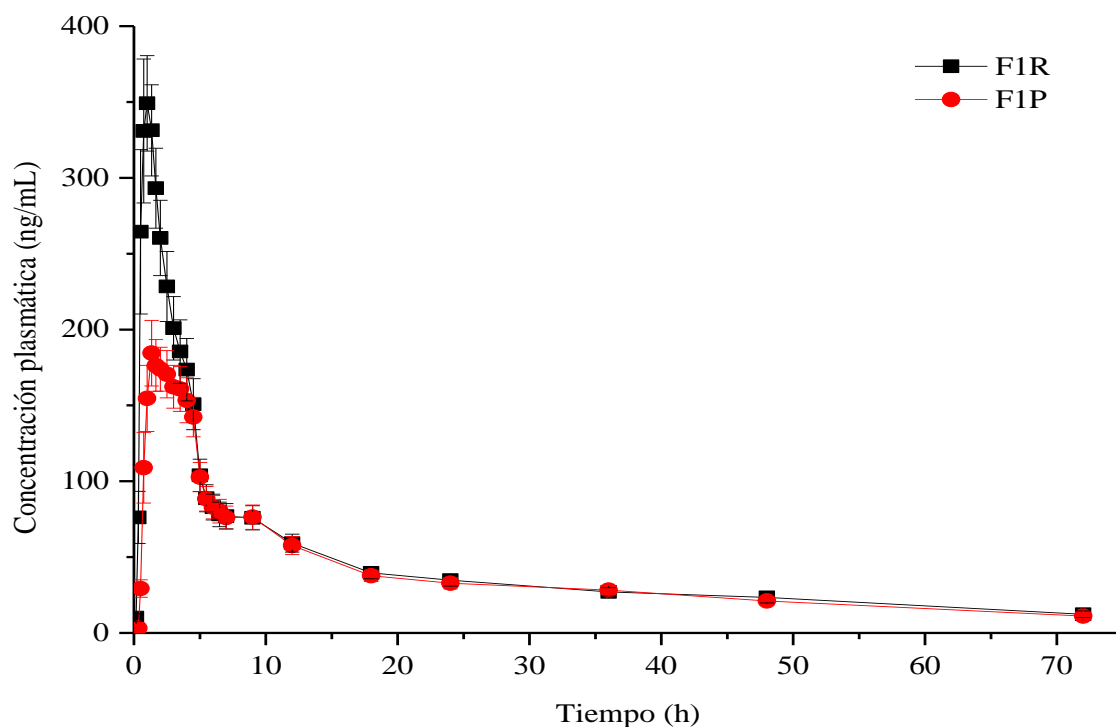


Figura 13. Perfil farmacocinético en voluntarios sanos después de la administración de las formulaciones F1P y F1R (promedio \pm EE).

3.7 Estabilidad de principios activos contenidos en el medicamento de prueba de BRAG-II

Dado que la técnica considerada como herramienta para la cuantificación de analitos en el desarrollo de nuevas formulaciones es por cromatografía de líquidos de alta resolución (por sus siglas en inglés CLAR) es importante conocer la estabilidad con la que cuentan los principios activos contenidos en el medicamento de prueba y la resolución que pueden llegar a presentar al encontrarse posibles impurezas en un método cromatográfico para deducirlo como selectivo o no y aportar un alto grado de confiabilidad en los resultados.

Es por ello que la guía de pruebas de estabilidad de medicamentos Q1A (R2) emitida por la ICH (European Medicines Agency, 2003) sugiere que se deben realizar estudios de estrés en un producto farmacéutico para establecer sus características de estabilidad inherentes, lo que lleva a la identificación de productos de degradación y, por lo tanto, respalda la idoneidad de los procedimientos analíticos propuestos. También requiere que los procedimientos de prueba analítica para muestras de estabilidad sean indicadores de estabilidad y estén completamente validados. Es por ello que se recopiló información de investigaciones previas que demostraran la estabilidad de los componentes activos de BRAG-II y con ello asegurar la integridad del desarrollo del proyecto.

Nalwade Reddy y colaboradores pertenecientes a Dr. Reddy's Laboratories han reportado estudios de descomposición por estrés para un producto similar en composición al que se empleará en este proyecto, dichos estudios fueron realizados bajo una concentración inicial de fármaco de 0.64 mg/mL del activo 1, 0.2 mg/mL del activo 2 y 0.08 mg/mL del activo 3 del medicamento. Los tres activos fueron sometidos bajo las siguientes condiciones:

Degradación acuosa: Se realizó hidrólisis de agua purificada a 60°C durante 6 horas.

Degradación inducida por peróxido de hidrógeno: Los estudios se llevaron a cabo a temperatura ambiente en peróxido de hidrógeno al 1% durante 6 horas.

Degradación ácida: La hidrólisis ácida se realizó en HCl 1 N a 60 ° C durante 6 horas.

Degradación básica: El estudio en solución básica se realizó en NaOH 0.1N a 60 ° C durante 6 horas.

Degradación inducida por calor: El medicamento que contenía los 3 activos se expuso a calor seco a 105 °C durante 24 horas. Las muestras se retiraron en el momento apropiado y se sometieron a análisis UPLC después de una dilución adecuada (0.032 mg/mL del activo 1, 0.01 mg/mL del activo 2 y 0.004 mg/mL del activo 3).

Fotodegradación: Se llevaron a cabo estudios de fotodegradación según la opción 2 de Q1B de las directrices de la ICH. Las muestras se expusieron a la luz para una iluminación general de 1,2 millones de horas luz y una energía ultravioleta cercana integrada de 200 watt*hm². Las muestras se extrajeron en el momento apropiado y se sometieron a análisis por UPLC después de una dilución adecuada (0.032 mg/mL del activo 1, 0.01 mg/mL del activo 2 y 0.004 mg/mL del activo 3).

De acuerdo con los resultados obtenidos de dicho estudio se concluyó que los tres activos son estables bajo condiciones de estrés básico, térmico y fotolítico, mientras que para condiciones de estrés por peróxido de hidrógeno, ácido y por hidrólisis muestra productos de degradación para los activos 2 y 3, aunque todos los productos de degradación mayor y menor se encontraron bien separados de los picos de los activos 1, 2 y 3 bajo un sistema cromatográfico con una fase móvil A que contenía una mezcla de tampón de perclorato de sodio pH 3.2 (0.053 M): acetonitrilo en la proporción 90:10 (v/v) y la fase móvil B que contenía una mezcla de tampón de perclorato de sodio pH 3.2 (0.053 M): acetonitrilo en el relación 20:80 (v/v) al tener un caudal de 0.6 mL/min bajo un gradiente (T/%B) establecido de 0/5, 1.2/5, 1.6/40, 4/40.4, 1/5 y 4.5/5,

manteniendo la temperatura de la columna a 55 °C (NALWADE, REDDY, RAO, & RAO, 2011).

4.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA O JUSTIFICACIÓN

Se cuenta actualmente con una formulación de referencia de BRAG-II con eficacia y seguridad probada en otros países y de interés para su comercialización en México. Esta formulación de referencia, junto con una formulación mexicana preliminar desarrollada por un laboratorio farmacéutico con quien se colabora en este proyecto, fueron evaluados mediante un ensayo clínico en voluntarios sanos para evaluar su biodisponibilidad de las formulaciones. Los resultados iniciales mostraron una equivalencia farmacéutica *in vitro* (bajo las condiciones de estudio evaluadas por el laboratorio), y una no bioequivalencia del estudio clínico preliminar efectuado.

Este resultado evidenció la importancia de generar métodos de disolución *in vitro* que permitan predecir de mejor manera, el comportamiento de los medicamentos bajo condiciones *in vivo*.

Por lo anterior se requiere diseñar y desarrollar una prueba de disolución que sirva como base para establecer una correlación *in vitro- in vivo*, y que sirva como una herramienta de apoyo en el desarrollo farmacéutico de los medicamentos, permitiendo llevar a estudio clínicos solo a aquellas formulaciones que presenten condiciones óptimas, comparadas con la formulación de referencia, bajo condiciones biorrelevantes.

El aparato 4 USP es considerado una alternativa altamente viable para llevar a cabo este estudio dado que permite la disolución *in vitro* de una amplia variedad de formas farmacéuticas y que por las características de flujo continuo de medio, la factibilidad para realizar cambios de composición en este durante la prueba y la hidrodinamia generada por el sistema (que favorecen las condiciones *sink*), permite establecer condiciones que emulan las condiciones *in vivo*, y con ello, generar resultados que podrían permitir hacer predicciones *in vitro- in vivo* para el desarrollo de una formulación optimizada que pudiese generar una bioequivalencia con el medicamento de referencia.

Es así que este proyecto busca obtener una prueba de disolución validada que permita emular las condiciones fisiológicas presentes en el tracto gastrointestinal para el desarrollo u optimización de formulaciones farmacéuticas, evitando estudios clínicos durante la optimización de estas, durante su escalamiento o durante cambios en el sitio de manufactura y equipos, además de permitir adecuaciones a especificaciones de disolución para cada formulación en particular.

5.0 HIPÓTESIS

Si se implementa una metodología de disolución bajo condiciones biorrelevantes con flujo continuo, entonces se podrán obtener parámetros biofarmacéuticos relevantes para la comparación del comportamiento *in vitro* - *in vivo* de medicamentos conteniendo BRAG-II.

6.0 OBJETIVO GENERAL

Establecer las bases para generar una correlación del comportamiento *in vitro* de los perfiles de disolución de formulaciones conteniendo BRAG-II, con el perfil farmacocinético *in vivo* de estas.

6.1 Objetivos particulares

a) Establecer y validar un método analítico de cuantificación de BRAG-II por CLAR con detección UV para muestras provenientes de los estudios de disolución de las formulaciones en estudio.

b) Establecer las condiciones básicas de operación para la evaluación del perfil de disolución de BRAG-II en condiciones biorrelevantes.

c) Evaluar la cinética de disolución para la evaluación de los perfiles obtenidos en formulaciones de prueba y de referencia conteniendo BRAG-II, y con ello poder considerar una posible equivalencia farmacéutica a partir de los resultados *in vitro*.

d) Establecer los parámetros biofarmacéuticos relevantes a partir de los perfiles de disolución, que permitan realizar un análisis de CIVIV de las formulaciones conteniendo BRAG-II.

7.0 MATERIALES Y EQUIPOS

7.1 Equipos

- Balanza analítica OHAUS. Modelo: Adventurer™. Número de serie:1084 1225060407
- Parrilla térmica de agitación magnética Thermolyne Cimarec 2. Modelo: SP46925. No. de serie: 1069020320744
- Destilador de agua ELGA PURELAB. Modelo: option-R7BP. Número de serie: OR07D227538BP
- pH metro ORION STAR A211
- Baño de agua con ultrasonido Elma D-78224 Singen/Htw
- Bomba de vacío VACUUBRAND GMBH+CO KG. Número de serie: 26860115. Presión: 80.0 mbar
- Difractómetro de rayos X Bruker D2 PHASER 2ndGen. (Detector lynxeye 1D Mode, tubo de Cu=1.54184 Å).
- Disolutor IV USP (celda de flujo continuo) SOTAX. Modelo CE7 smart. No. de serie: 030.0138
- Espectrofotómetro UV-visible VARIAN. Modelo: Cary 50 conc. Número de serie: EL04043507
- HPLC, LaChromUltra, VWR

7.2 Reactivos sólidos

- Sal sódica hidratada de taurocolato ácido ($C_{26}H_{44}NNaO_7 \cdot S$). Polvo sólido. Lote: SLBX2412. No. CAS: 345909-26-4. No. de catálogo: T4009. Fabricante: Sigma-Aldrich
- Hidróxido de sodio (NaOH). Gránulos. Lote: MKBQ8944V. No. CAS: 1310-73-2. Fabricante: Sigma-Aldrich
- Fosfato monobásico de sodio (NaH_2PO_4). Polvo sólido. Lote: SLCG0989. No. CAS: 7558-80-7. No. de catálogo: S0751. Fabricante: Sigma-Aldrich.
- L- α -fosfatidilcolina. No. de catálogo: 61755. Lote: BCBD3767V. Fabricante: Sigma-Aldrich.

7.3 Insumos

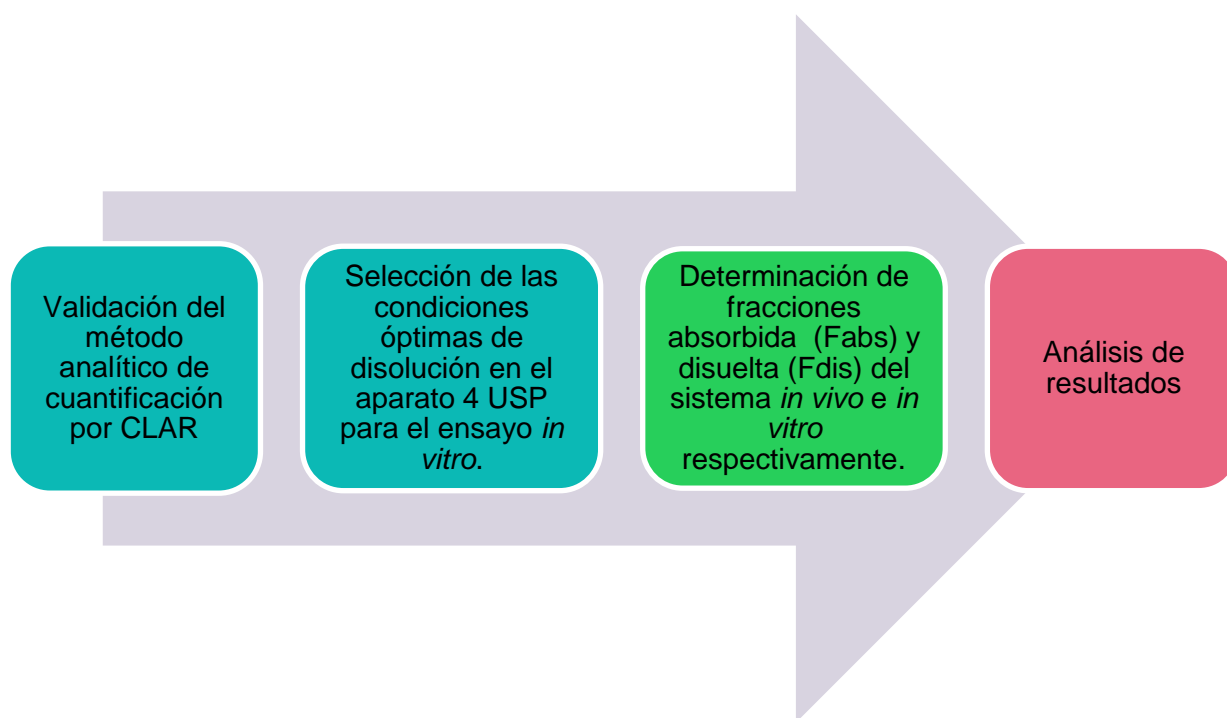
- Filtro de microfibras de vidrio Whatman GF/F. Tamaño de poro: 0.7 μm .
- Filtro de microfibras de vidrio Whatman GF/D. Tamaño de poro: 2.7 μm .

7.4 Reactivos líquidos

- Diclorometano A.C.S. Lote: U0118044. No. CAS: 75-09-2
- Ácido clorhídrico (HCl). 36.5-38.0%. Lote: K14C22 y L20C24. No. CAS: 7647-01-0.
Fabricante: J. T. Baker.

8.0 METODOLOGÍA

8.1 Diagrama general de trabajo



8.2 Validación del método de cuantificación para BRAG-II por CLAR con detección UV

8.2.1 Preparación de soluciones

a) Fase móvil

Buffer de fosfatos pH 2.4: Se disolvieron 2.72 g de fosfato monobásico de potasio en 1 L de agua destilada y se adicionaron 2 mL de trietilamina, posteriormente se ajustó el pH a 2.4 con ácido fosfórico concentrado.

Proporción de fase móvil: Buffer de fosfatos pH 2.4: Acetonitrilo grado CLAR (53:47).

b) Medios biorrelevantes

Medio FaSSGF pH 1.6: A 1 L de agua desionizada ajustar el pH a 1.6 con ácido clorhídrico (al 38%). Agregar 2 g de cloruro de sodio y agitar para homogeneizar la solución. Adicionar 0.043 g de taurocolato de sodio y agitar hasta homogeneizar completamente.

Medio FaSSIF pH 6.5: Adicionar 3.438 g de fosfato de sodio monobásico en conjunto con 4.0103 g de cloruro de sodio en 1 L de agua desionizada, posteriormente ajustar a pH 6.5 con una solución de hidróxido de sodio 0.2 N. Agregar 1.6131 g de taurocolato de sodio y mantener en agitación constante. Posteriormente en 40 mL de diclorometano disolver 0.1536 g de L- α -fosfatidilcolina y adicionar a la mezcla anterior. Con la finalidad de eliminar el diclorometano de la solución calentar la solución a 40°C al vacío y sonicar durante 40 minutos. Finalmente filtrar la solución al vacío con filtros GF/F de fibra de vidrio con tamaño de poro de 0.7 μ m.

Solución NaOH 0.2N: pesar 0.4 g de hidróxido de sodio y aforar con agua destilada a 50 mL.

8.2.2 Preparación de curva de calibración

Se realizaron curvas de calibración, por triplicado durante 3 días distintos, de BRAG-II empleando los medios biorrelevantes FaSSGF pH 1.6 y FaSSIF pH 6.5.

Solución stock: En un matraz aforado de 25 mL se colocaron 25 mg de BRAG-II y se aforó con metanol, posteriormente se sonicó hasta disolver y homogenizar la solución, la concentración de esta solución fue de 1 mg/mL.

Curva de calibración: Se llevaron a cabo 7 diluciones utilizando los medios biorrelevantes FaSSGF pH 1.6 y FaSSIF pH 6.5 a partir de la solución stock de BRAG-II como se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Elaboración de curva de calibración

Concentración (μ g/mL)	Volumen alícuota solución stock (μ L)	Volumen final (mL)
4.4	44	10
8.8	88	10
22	220	10
44	440	10
66	660	10
88	880	10
100	1000	10

8.2.3 Condiciones de análisis

Velocidad de flujo: 1.5 mL/min, considerando Buffer de fosfatos pH 2.4 a 0.8 mL/min y Acetonitrilo grado cromatográfico. Sistema isocrático.

Temperatura del horno en columna: 40 °C

$\lambda = 270 \text{ nm}$

Tiempo de corrida: 2.5 min

Columna: ZORBAX Eclipse XBD-C18 (4.6 X 150mm 5-Micron, SN: USKH109072)

Nota: Es necesario filtrar la fase móvil utilizando un filtro de membrana de 0.45 μm antes de realizar el análisis por CLAR.

Los parámetros de adecuabilidad del sistema, linealidad, precisión, exactitud, repetibilidad, límite de cuantificación (LC) y límite de detección (LD) del método fueron evaluados bajo los criterios establecidos en la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos (2002).

8.3 Método de disolución

8.3.1 Formulaciones en estudio

F0P: formulación placebo, conteniendo los excipientes de la formulación y los activos 2 y 3.

F1M: formulación comercializada en México de activos 1 y 2 en dosis de 80 mg y 12.5 mg, respectivamente.

F1P: medicamento de prueba. Cápsulas de gelatina dura compuestas de los activos 1, 2 y 3 en una dosis de 80 mg, 12.5 mg y 5 mg.

F1R: medicamento de referencia. Tabletas compuestas de los activos 1, 2 y 3 en una dosis de 80mg, 12.5mg y 5mg.

F2P: medicamento de prueba con formulación modificada. Cápsulas de gelatina dura conteniendo los principios activos 1, 2 y 3 en una dosis de 80mg, 12.5mg y 5mg.

F2P1: cápsulas de gelatina dura conteniendo el principio activo 1 en una dosis de 80mg.

8.3.1 Condiciones de disolución en aparato 4 USP, de flujo continuo.

Las condiciones de disolución fueron determinadas a partir de una serie de ensayos preliminares que consistieron en lo siguiente:

1. Efecto de enzimas en el medio en el proceso de disolución de cápsulas

La versión actual del capítulo <711> y <2040> de la USP recomienda el uso de pepsina para medios de disolución con valores de pH inferiores a 6.8 y pancreatina para medios de disolución con valores de pH iguales o superiores a 6.8. Dicho ensayo se llevó a cabo en un vaso de precipitados bajo agitación constante a 60 rpm a 37°C en 100 mL de medio FaSSGF pH 1.6, dado que se esperaba que la cápsula se disolviera en este medio.

2. Variaciones en el armado de celdas

Se realizaron pruebas con diferentes configuraciones del armado de celdas tal como se muestra en la Figura 14. Dichas pruebas se realizaron empleando medios FaSSGF y FaSSIF como medio de disolución a 37°C y a una velocidad de flujo de 8 mL/min.

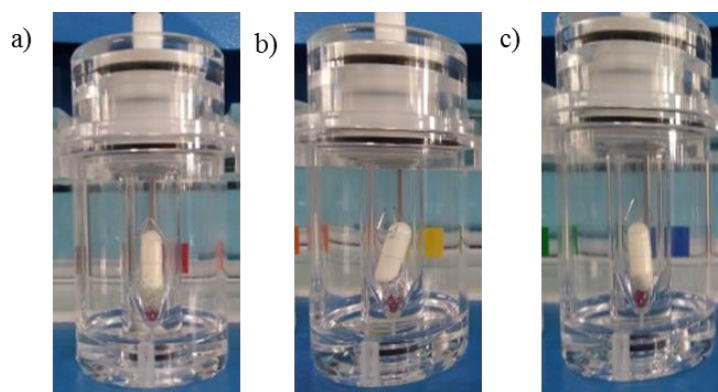


Figura 14. Configuración del armado de celdas: a) con perlas de vidrio de 1 mm de diámetro, b) con perlas de vidrio de 2 mm de diámetro y c) sin perlas de vidrio.

El armado final consistió en lo siguiente: se empleó la celda de 12 mm de diámetro empleada para tabletas y cápsulas, colocándose un rubí y 550 mg de perlas de vidrio de 2 mm de diámetro en la parte inferior de la celda. Sobre ello se colocó la forma farmacéutica (cápsula o tableta) y el clip sujetador del medicamento (pudiendo ser colocada en forma cóncava o convexa, dependiendo de la forma farmacéutica en cuestión). Se colocaron filtros Whatman de microfibra de vidrio GF/D (tamaño de poro= 2.7 μm) y FG/F (tamaño de poro= 0.7 μm) dentro del cabezal del filtro estándar en la parte superior de la celda. La celda fue acoplada en la chaqueta para ser insertada en la base de las celdas. El esquema se muestra en la Figura 15.

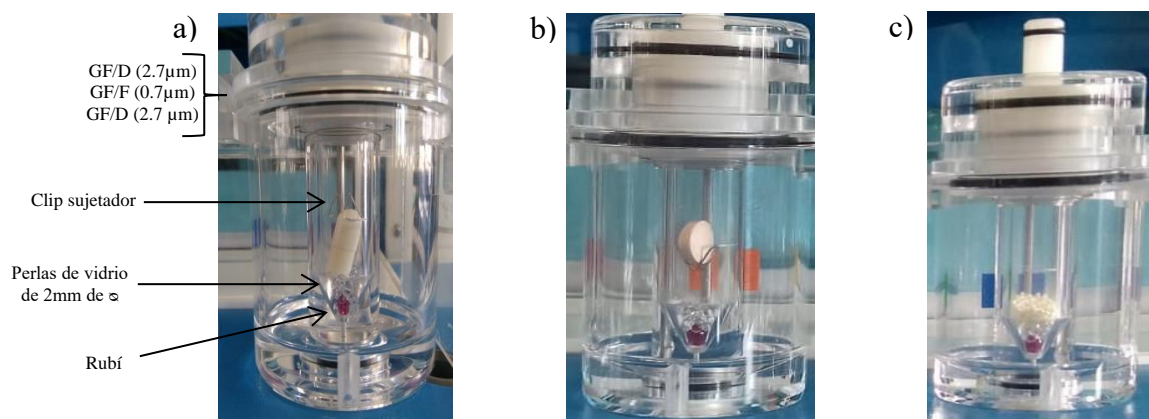


Figura 15. Armado de celda para cápsulas (a), para tabletas (b) y para granulado (c).

3. Determinación de la velocidad de flujo

En investigaciones previas usando el aparato 4 USP a una velocidad de flujo de 8 mL/min fue posible tener una liberación comparable a 50 rpm de disolución usando el aparato 2 USP, lo que sugiere que es posible obtener fuerzas hidrodinámicas comparables a esta velocidad de flujo (Paprskářová, Možná, Oga, Elhissi, & Alhnan, 2015). Es por ello que las condiciones evaluadas incluyeron una prueba a velocidad de flujo de 4 y 8 mL/min correspondientes a 25 y 50 rpm respectivamente.

4. Tiempo total de disolución y de muestreo

Se partió de los tiempos de muestreo mostrados en la Figura 11 (ver antecedentes). Sin embargo, considerando que el tiempo de liberación del activo 1 fue muy rápido, fueron acortados los tiempos de muestreo durante los primeros minutos. Con respecto al tiempo total de disolución, debido a que las concentraciones obtenidas en las muestras de los ensayos no mostraban tener un aumento significativo después de 40 min y hasta los 180 minutos para las formulaciones F1R y F1P respectivamente (Tabla 5), los tiempos posteriores de análisis se acotaron a 40 min. El equipo se programó para que se tomarán 5 mL de muestra a cada tiempo de muestreo.

Tabla 5 Tiempos de muestreo durante la prueba de disolución

Formulación	Medio de disolución	Tiempo de muestreo (min)
F1P y F1R	Medio biorrelevante FaSSGF	1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30
	Medio biorrelevante FaSSIF	40, 50, 60, 90, 120, 180, 240
F2P, y F2P1	Medio biorrelevante FaSSGF	1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 30, 35, 40

Los ensayos preliminares implicaron el uso del medio FaSSGF por 30 min, y el cambio a medio FaSSIF al cabo de este tiempo y hasta el final de la prueba. Como se verá en

la sección de resultados, dados que los tiempos de análisis para algunos estudios se acotaron a 40 min, las formulaciones se evaluaron en medio FaSSGF.

Para la determinación del % disuelto de los ensayos *in vitro* en el aparato 4 USP se aplicó la Ecuación 2 y la Ecuación 3 referidas en la sección de antecedentes.

5. Interacción química entre los componentes activos de BRAG-II.

Se evaluó la posible interacción entre los activos de la formulación, por lo que se llevó a cabo la disolución de la formulación F2P1 bajo las mismas condiciones que F2P, tal como se indica a continuación. Nota: para esta determinación se evaluó el contenido de las cápsulas, es decir, el granulado de cada formulación.

Aparato de disolución: flujo continuo, USP 4

Temperatura del medio de disolución $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$

Velocidad de flujo: 8 mL/min

Tipo de sistema: sistema abierto

Tipo de celda: celda de polvos (12 mm de diámetro)

Volumen de muestra colectada: 5 mL

Medio de disolución	Tiempo de muestreo (min)
Medio biorrelevante FaSSGF	1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 30, 35, 40.

6. Identificación de polvos residuales

Una vez concluidos los ensayos de disolución se realizó la cuantificación del polvo remanente de las celdas para visualizar si existía presencia del Activo 1 sin disolver. Se evaluó por CLAR y se caracterizó por DRXP.

8.4 Comparación de cinética de disolución en equipo 2 USP vs 4 USP

Las condiciones de disolución en el aparato USP 2 con paletas fueron determinadas a partir de las condiciones fijadas en el método de disolución en el aparato 4 USP y consistieron en lo siguiente:

Medio de disolución: FaSSGF pH 1.6

Temperatura: $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$

Velocidad de agitación: 50 rpm

Volumen: 900 mL

Volumen de muestra colectado: 5 mL

Formulaciones: F1R y F1P

Tiempos de muestreo: 1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 30, 35, 40 minutos

Se determinó el factor de similitud para las formulaciones F1P y F1R mediante la obtención de f_2 , empleando la Ecuación 21. Se utilizaron los valores del perfil de disolución en términos de porcentaje disuelto acumulado utilizando la Ecuación 2 para el tratamiento de los datos derivados del ensayo en el aparato 2 USP y 4 USP.

8.5 Correlación *in vitro*- *in vivo*

8.5.1 Determinación de parámetros farmacocinéticos

Se llevó a cabo el análisis de resultados *in vivo* e *in vitro* de las formulaciones F1P y F1R utilizando el PKsolver para Excel para determinar y comparar los valores de C_{max} , t_{max} , $ABC_{0 \rightarrow t}$ y TMR/TMD.

8.5.2 Determinación de la fracción absorbida

Para su determinación fue necesario emplear los datos de tiempo y concentración plasmática proporcionados por Laboratorios Senosiain obtenidos del ensayo clínico realizado previamente para las formulaciones F1R y F1P. Las concentraciones plasmáticas fueron ajustadas a un modelo de Wagner-Nelson para determinar las fracciones absorbidas de acuerdo con los siguientes pasos:

1. Se determinó el área acumulativa bajo la curva de concentración respecto al tiempo mediante la regla de los trapecios.
2. Los datos de concentración comprendidos entre los últimos cinco tiempos del término del pico correspondiente a C_{max} (intervalo correspondiente entre 4 y 6 horas de los datos del ensayo *in vivo*) se usaron para calcular la constante de velocidad K mediante el ajuste de los datos en escala logarítmica.
3. Se aplicó la “ecuación de Wagner-Nelson” a los datos antes obtenidos. Nota: Se obtiene un valor distinto por cada tiempo de muestreo.
4. Para estimar el valor máximo de la función, se aplicó la siguiente ecuación a los cuatro últimos valores obtenidos de la “ecuación de Wagner-Nelson”.

$$C_T + K * \int_0^T C * dt$$

Ecuación 22 Ecuación de Wagner- Nelson

5. Se determinó la fracción absorbida en % a partir de la ecuación siguiente:

$$\frac{C_T + K \int_0^T C * dt}{FD/V}$$

Ecuación 23 Fracción absorbida

El método de Wagner-Nelson fue utilizado debido a que no exige administración endovenosa y no precisa una estimación previa del volumen de distribución, además no presenta limitaciones en cuanto al orden o naturaleza de los procesos de absorción.

9.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Descripción de las formulaciones en estudio

El medicamento en estudio se encuentra en presentación de cápsulas de gelatina dura, en donde el fármaco de interés a evaluar, BRAG-II, se denominó “activo 1”. Este fármaco se encuentra en combinación con dos principios activos adicionales: “activo 2”, indicado para el tratamiento de hipertensión arterial, diabetes insípida, hipercalcemia idiopática y contra edema asociado a insuficiencia cardiaca, renal o hepática; finalmente, el “activo 3” que se encuentra indicado para el tratamiento de la hipertensión arterial y angina de pecho vasoespástica y estable crónica (VADEMECUM , 2018). La dosis del medicamento de prueba es de 80 mg, 12.5 mg y 5 mg de los activos 1, 2 y 3 respectivamente.

Los códigos de identificación a las diferentes formulaciones empleadas durante el estudio se mostraron en la sección experimental, sin embargo, se considera necesario para mayor claridad, retomarla en esta sección:

F1P: medicamento de prueba. Cápsulas de gelatina dura compuestas de los activos 1, 2 y 3 en una dosis de 80 mg, 12.5 mg y 5 mg.

F1R: medicamento de referencia. Tabletas compuestas de los activos 1, 2 y 3 en una dosis de 80mg, 12.5mg y 5mg.

F2P: medicamento de prueba con formulación modificada. Cápsulas de gelatina dura conteniendo los principios activos 1, 2 y 3 en una dosis de 80mg, 12.5mg y 5mg.

F2P1: cápsulas de gelatina dura conteniendo el principio activo 1 en una dosis de 80mg.

Para algunos ensayos preliminares se empleó un medicamento de referencia conteniendo a los activos 1 y 2, que se encuentra comercialmente disponible en México. A este se le denominó F1M: formulación comercializada en México. Este medicamento se presenta en tabletas conteniendo a los principios activos 1 y 2 en una dosis de 80mg y 12.5mg.

Finalmente, también se contó con una formulación “placebo”, denominada F0P, empleada para evaluar la posible interferencia de los activos 2 y 3, así como de los excipientes en el método de cuantificación. La apariencia de las formulaciones se ilustra en la Figura 16.

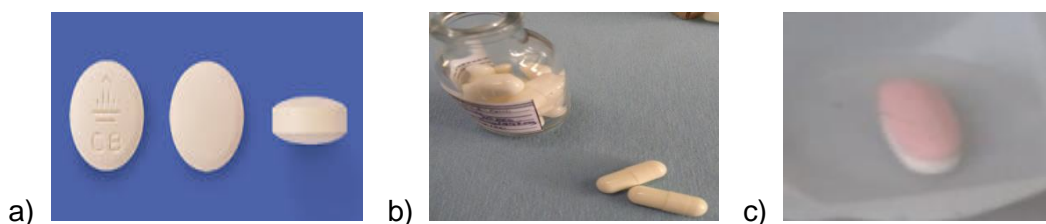


Figura 16. Formulaciones evaluadas. a) F1R; b) F0P, F1P, F2P y F2P1; c) F1M

9.2 Método analítico de cuantificación

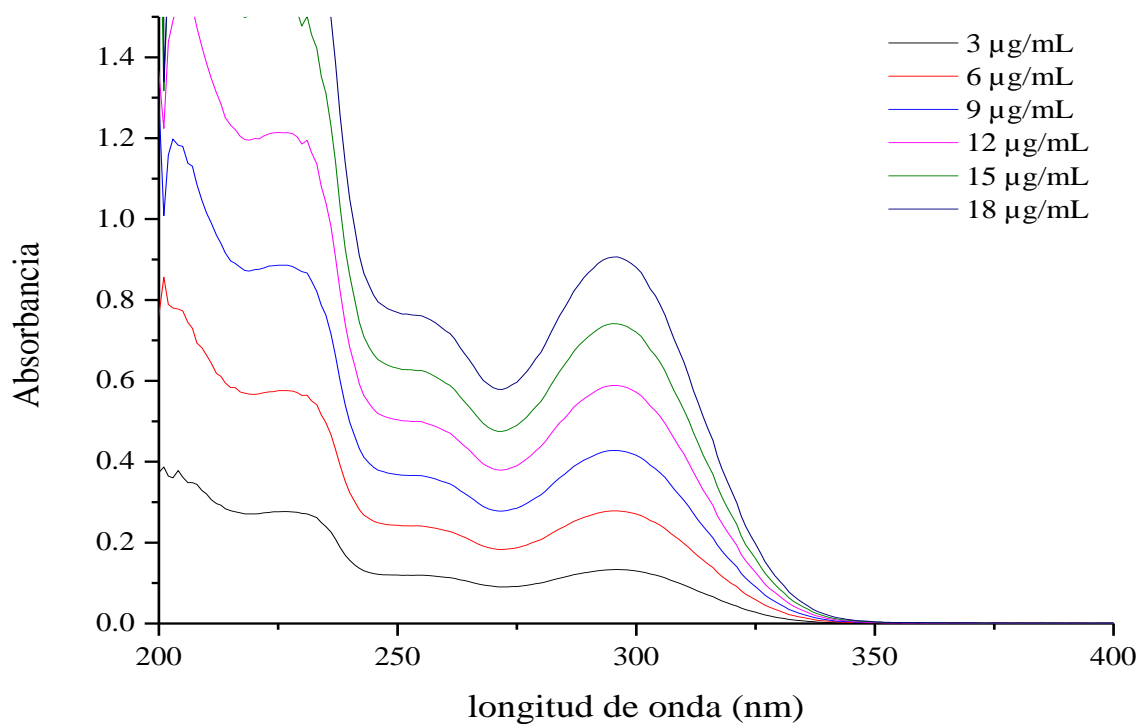
El método de cuantificación de BRAG-II se desarrolló por CLAR para evitar interferencia de los demás componentes de la formulación. Preliminar a esto, fue necesario determinar de manera experimental el espectro de absorción de los principios activos con los que cuenta la forma farmacéutica de BRAG-II y con ello poder seleccionar la longitud de onda adecuada para su cuantificación. Cabe aclarar que el método a desarrollar y validar busca cuantificar únicamente a BRAG-II (activo 1), en presencia de los demás componentes de la formulación.

Determinación del espectro UV-vis de BRAG-II

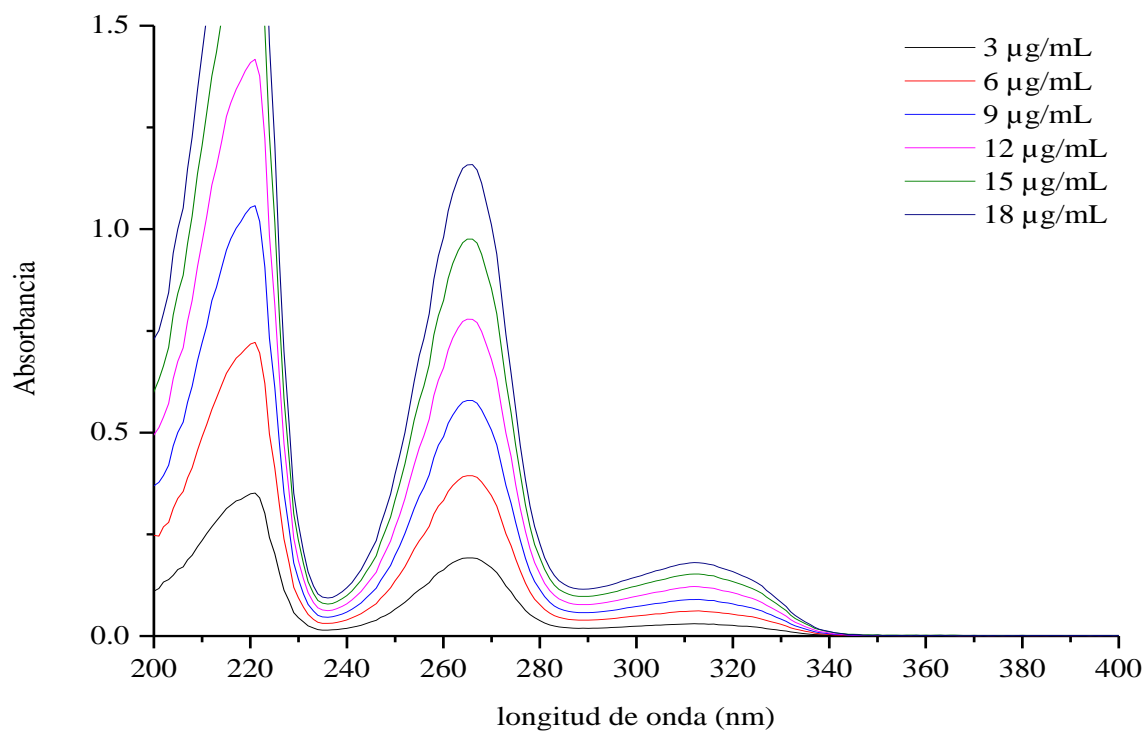
Para poder establecer la longitud de onda ideal para la cuantificación de BRAG-II (activo 1) se evaluaron cualitativamente los espectros de absorción de los activos contenidos en el medicamento de prueba. Para ello se realizó el barrido de absorción de cada uno de los tres activos en el medicamento, utilizando un espectrofotómetro UV-visible VARIAN, modelo Cary 50, partiendo de una solución stock de 1 mg/mL en metanol. En la Figura 17 se muestran los resultados.

Nota: las diluciones fueron realizadas empleando solamente metanol.

a) Espectro de absorción Activo 1 (BRAG-II)



b) Espectro de absorción Activo 2



c) Espectro de absorción Activo 3

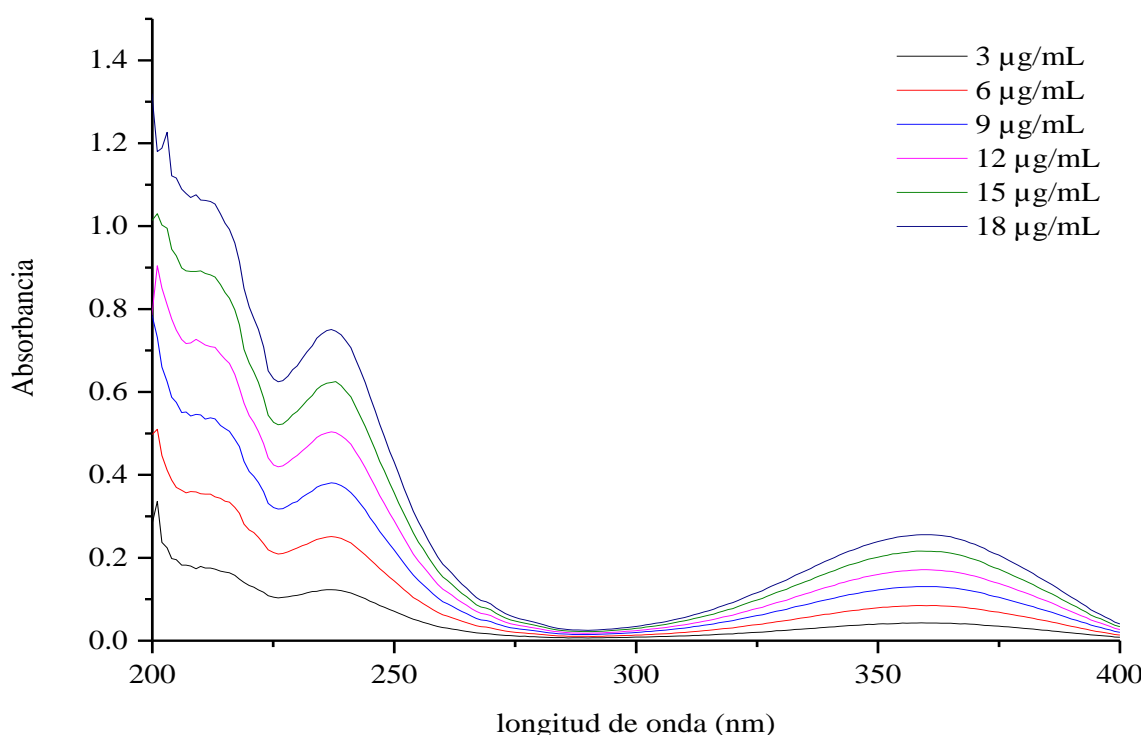


Figura 17. Espectros de absorción UV-vis de a) activo 1, b) activo 2, c) activo 3 partiendo de un stock disuelto en metanol y diluías con metanol para obtener diferentes niveles de concentración.

Dados los picos máximos de absorción de los activos y retomando los valores de referencia obtenidos de fuentes bibliográficas del activo 1 (BRAG-II), se optó por considerar de manera inicial 3 longitudes de onda para el método cromatográfico para cuantificar BRAG-II: 205, 270 y 296 nm. Los resultados de la integración de los picos de las muestras por CLAR se analizaron únicamente para la señal a 270 nm.

9.2.1 Validación del método analítico de cuantificación

Los parámetros de adecuabilidad del sistema, especificidad, límite de cuantificación (LC), límite de detección (LD), linealidad, precisión, exactitud y repetibilidad del método fueron evaluados bajo los criterios establecidos en la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos y se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros de validación del método analítico de cuantificación de BRAG-II

Parámetro de validación	Medio FaSSGF pH 1.6	Medio FaSSIF pH 6.5	Límite de aceptación	Cumple / No cumple
LC	3.4 µg/mL	1.5 µg/mL	LC < 4.4 µg/mL	Cumple
LD	1.1 µg/mL	0.5 µg/mL	LD < 4.4 µg/mL	Cumple
Adecuabilidad del sistema, RSD	%CV < 2%	%CV < 2%	< 2%	Cumple
Linealidad y precisión del método	$r^2 = 0.9998$ %CV < 2%	$r^2 = 0.9999$ %CV < 2%	$r^2 > 0.99$ %CV < 2%	Cumple
Exactitud y repetibilidad del método	IC(μ) _{inferior} = 99.27% IC(μ) _{superior} = 100.34% %CV < 2%	IC(μ) _{inferior} = 99.65% IC(μ) _{superior} = 100.60% %CV < 2%	IC(μ) debe incluir el 100% %CV < 2%	Cumple

A continuación, se refiere el detalle de los resultados obtenidos para la validación del método.

c) Adecuabilidad del sistema

La cuantificación de BRAG-II (activo 1) se realizó por el método de CLAR acoplado a UV-visible a una longitud de onda de 270 nm (Figura 18). Es importante mencionar que previo a la inyección de las muestras correspondientes a las diferentes concentraciones de las curvas preparadas se ejecutó el System Suitability del método para asegurar la confiabilidad de los resultados obtenidos de la cuantificación. El criterio de aceptación se obtuvo al registrar una desviación estándar relativa (RSD) < 2%. La muestra empleada para dicha determinación fue de una concentración de 44 µg/mL la cual fue seleccionada debido a que se encuentra justo a la mitad del intervalo de concentraciones consideradas para la realización de la curva de calibración. Los resultados se pueden consultar en el Anexo 1.

b) Especificidad

La especificidad del método de cuantificación fue evaluada en medio FaSSGF pH 1.6 y medio FaSSIF pH 6.5 con una cápsula de placebo de gelatina dura (FOP), la cual contenía los activos 2 y 3 en una dosis de 12.5 mg y 5 mg respectivamente, así como

excipientes de la formulación de prueba c.b.p. 590 mg aproximadamente, que fue el peso total de la cápsula (Figura 16b).

Preparación de la muestra: Se disolvió una cápsula placebo (F0P) durante 30 minutos en 100 mL de medio FaSSGF pH 1.6 a 40°C aproximadamente con una velocidad de agitación moderada.

Nota: no hubo control estricto en cuanto a la velocidad de agitación y temperatura del medio de disolución ya que lo único que se pretendía con esta prueba era conseguir que la cápsula se desintegrara totalmente para elucidar la respuesta analítica de la muestra de manera cualitativa.

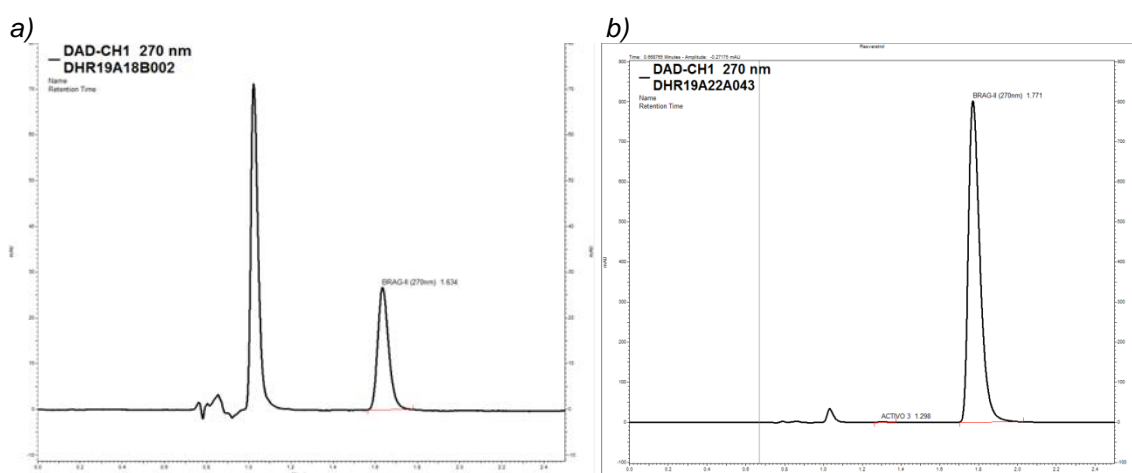


Figura 18. Cromatogramas BRAG-II en a) medio FaSSGF Ph 1.6 y b) medio FaSSIF pH 6.5

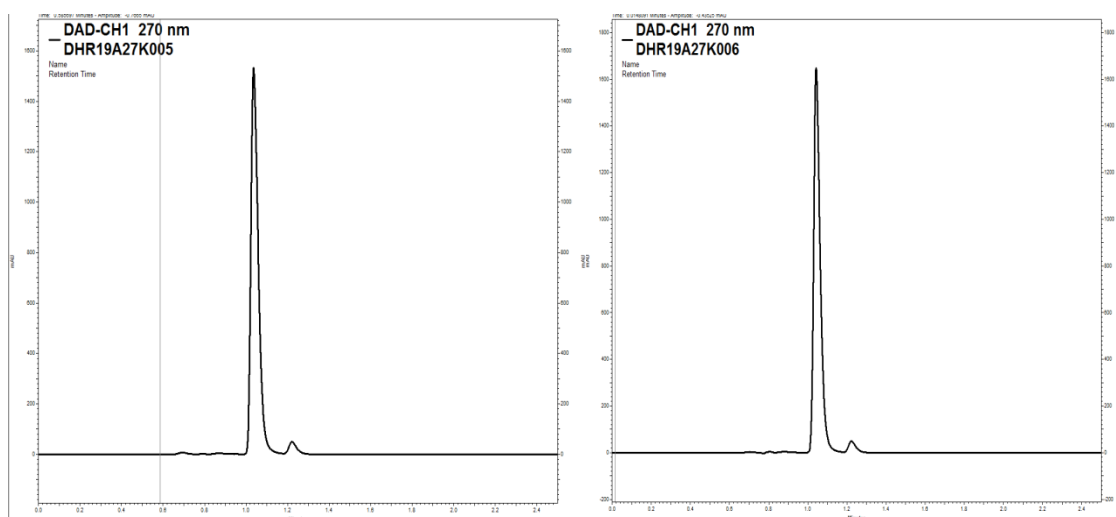


Figura 19. Cromatograma obtenido de las cápsulas de placebo, F0P, en a) medio FaSSGF pH 1.6 y b) medio FaSSIF pH 6.5.

En la Figura 18 se muestra un cromatograma característico de la formulación de prueba en medios biorrelevantes, mientras que la Figura 19 ilustra el perfil cromatográfico típico del placebo de la formulación de prueba lo que demuestra que ninguno de los componentes de la formulación, así como del medio de disolución, interfiere con la señal

correspondiente al analito BRAG-II. Por lo anterior el método cromatográfico es considerado específico para la cuantificación de BRAG-II.

Para la determinación del resto de los parámetros de validación se prepararon curvas por triplicado 7 niveles de concentración, en un intervalo de 4.4-100 µg/mL de la solución de referencia en los dos medios de disolución a emplear para la cuantificación de BRAG-II (FaSSGF pH 1.6 y FaSSIF pH 6.5).

c) Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

A partir de las curvas de calibración, se determinaron los límites de detección y cuantificación. Para ello fueron aplicadas las siguientes fórmulas:

$$LD = \frac{3.3 * S_{y/x}}{b_1} \quad \text{y} \quad LC = \frac{10 * S_{y/x}}{b_1}$$

Dónde:

$S_{y/x}$ = desviación estándar de la regresión

b_1 = valor de la pendiente de la ecuación de la recta

En donde de acuerdo con los resultados obtenidos, mostrados en la Tabla A3 y Tabla A6 (sección de anexos) se obtuvieron valores de LD de 1.1 µg/mL y 0.5 µg/mL y de LQ de 3.4 µg/mL y 1.5 µg/mL de BRAG-II en el medio biorrelevante FaSSGF y FaSSIF, respectivamente.

d) Linealidad y precisión del método

A partir de los datos obtenidos de las curvas de calibración (Figura 20 y 21) preparadas se graficaron los resultados para obtener el coeficiente de determinación de la curva de calibración, los resultados se encontraron dentro del criterio de aceptación establecido por la Guía de Validación de Métodos Analíticos de Químicos Farmacéuticos Biólogos, y de la NOM-177-SSA1-2013, para la linealidad: un coeficiente de determinación (r^2) > 0.99 con un error relativo (%CV) debido a la regresión lineal < 2% y en donde el Intervalo de Confianza para la pendiente (IC_{β_1}) no debe incluir el cero.

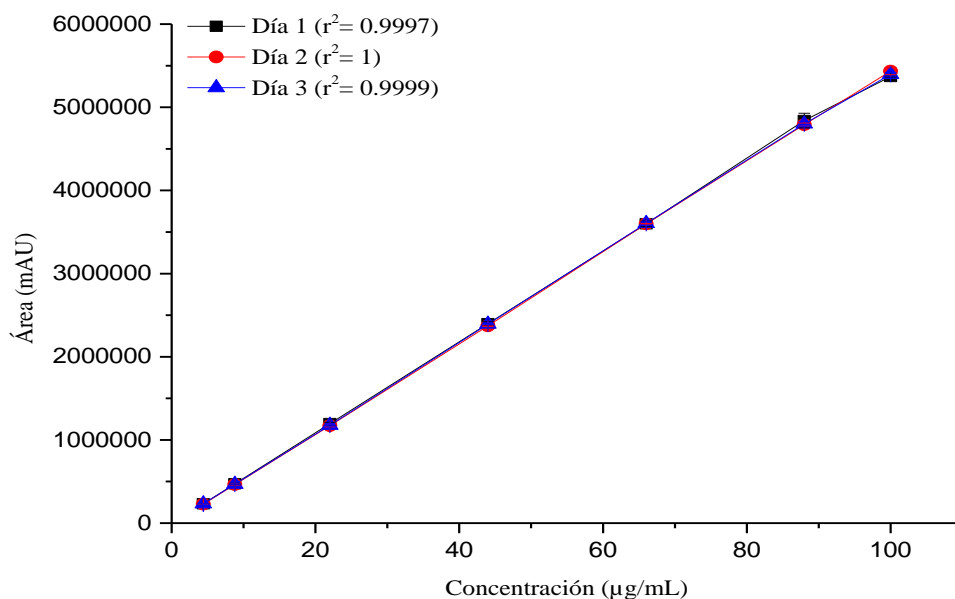


Figura 20. Linealidad de las curvas de calibración de BRAG-II en medio FaSSGF pH 1.6 ($n=3 \pm DE$)

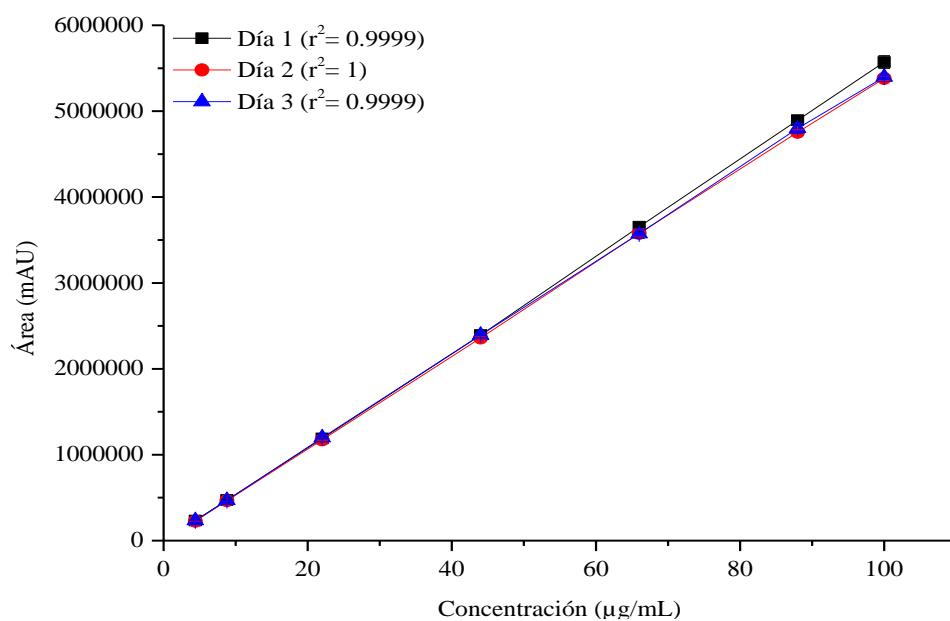


Figura 21. Linealidad de las curvas de calibración de BRAG-II en medio FaSSIF pH 6.5 ($n=3 \pm DE$)

Para la precisión del sistema, el criterio de aceptación es obtener un $\%CV \leq 2\%$. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla A1 y Tabla A2 (sección de anexos), donde ningún coeficiente de variación se encontró por encima del 2%. Además, de acuerdo con los datos presentados en

Tabla A3 y Tabla A6 (sección de anexos), el coeficiente de determinación (r^2) en medio FaSSGF pH 1.6 fue de 0.9998, mientras que en medio FaSSIF pH 6.5 fue de 0.9999. Adicional a ello, el $IC_{\beta 1}$ no incluye el cero en ninguno de los dos medios por lo que, de acuerdo con los criterios de aceptación, el método cumple con la especificación de linealidad del método requerida.

e) Exactitud y repetibilidad

Para evaluar la exactitud y precisión del método expresada como la concordancia obtenida de determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método se determinó la cantidad recuperada de BRAG-II. Se comparó el valor obtenido empleando el método y el valor de referencia, en donde el criterio de aceptación establecido consiste en que el Intervalo de Confianza para la media (IC_{μ}) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo de 98 - 102%; adicionalmente el %CV del porcentaje de recobro no debe ser mayor de 2%. Para la determinación del % recuperado se obtuvo la concentración experimental de las muestras de la curva de calibración a partir de la ecuación de la recta y se hizo la comparación con la concentración teórica obteniendo un % de recobro del promedio aritmético entre el 98% - 102% con un %CV < 2% tal como lo muestran los resultados asentados en

Tabla A3 y Tabla A6 para los medios FaSSGF pH 1.6 y FaSSIF pH 6.5 respectivamente.

9.3 Método de disolución

Se evaluó el impacto de diferentes factores para la implementación del método de disolución.

La evaluación del efecto de enzimas presentes en el medio de disolución se sabe puede tener un impacto en la disolución de cápsulas, y por lo tanto, en la liberación de su contenido. Estudios preliminares han mostrado que la pepsina tiene una actividad máxima a pH 2, y que el 70% de la actividad péptica máxima todavía está presente a pH 4.5 y casi ninguna actividad péptica a pH 5.5 (Graya, Colea, Tomaa, & al, 2014). Se llevó a cabo la evaluación del efecto de la presencia de pepsina en el medio FaSSGF pH 1.6 encontrando experimentalmente que no existe un efecto significativo de esta enzima pues se mantuvieron los mismos niveles de % disuelto en ambos ensayos, ver Figura 20.

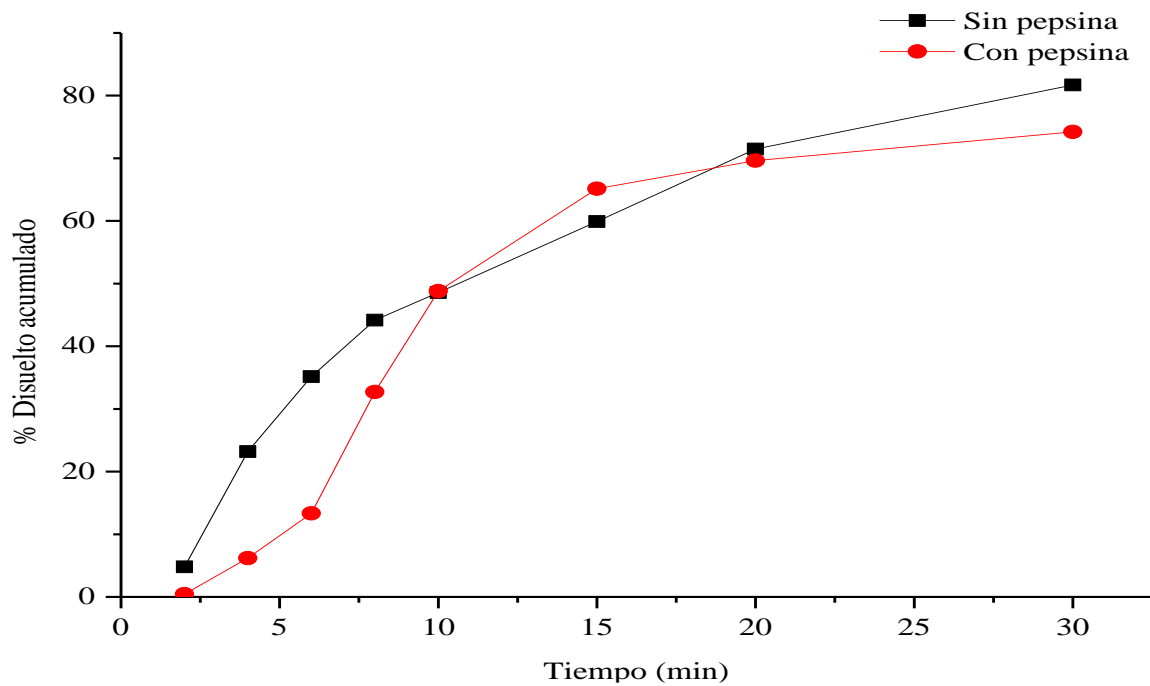
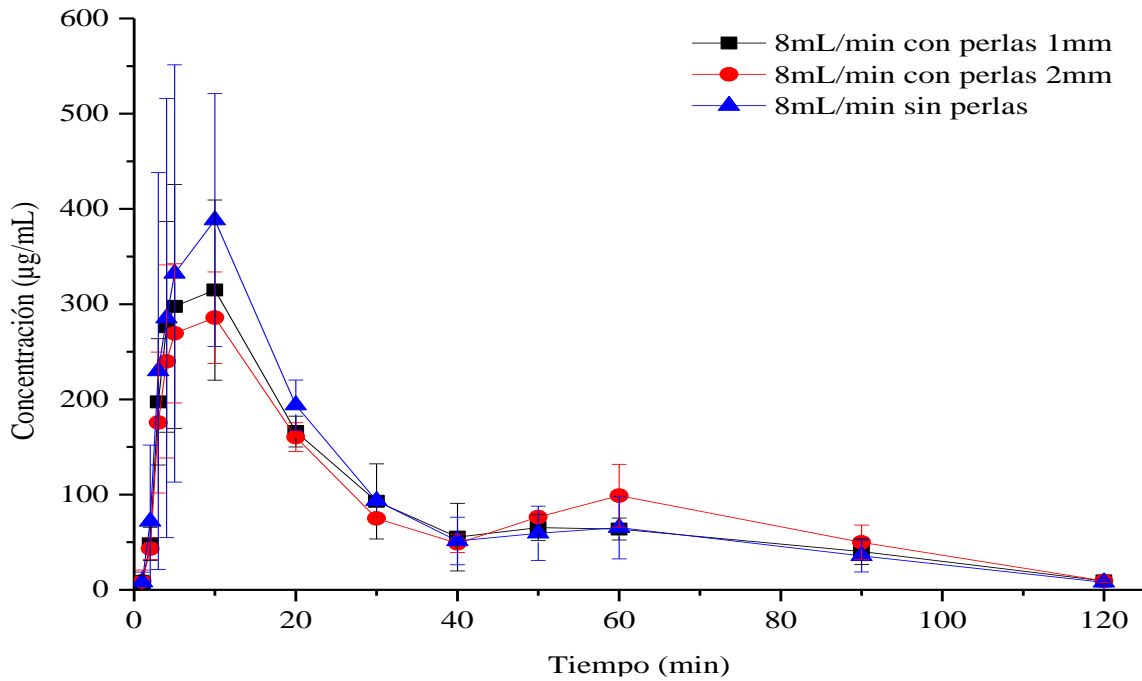


Figura 20. Efecto de la presencia de pepsina en el medio de disolución FaSSGF pH 1.6. Cápsulas F1P.

Para establecer el armado y configuración interna a emplear en las celdas de disolución, se evaluó el efecto de la presencia de las perlas de vidrio en estas. Se sabe que la presencia y tipo de perlas que se emplee puede modificar la hidrodinámica generada en las celdas de disolución, modificando el tipo de flujo generado. Dado que en presencia de perlas de 2 mm de diámetro en la celda se aprecia un menor coeficiente de variación de las concentraciones obtenidas y considerando que el uso de este tamaño no genera estática en el interior de la celda durante el acondicionamiento de ésta, se optó por mantener el uso de estas perlas. Este ensayo se realizó empleando la formulación F2P. Las gráficas de los resultados se muestran en la Figura 21.

a)



b)

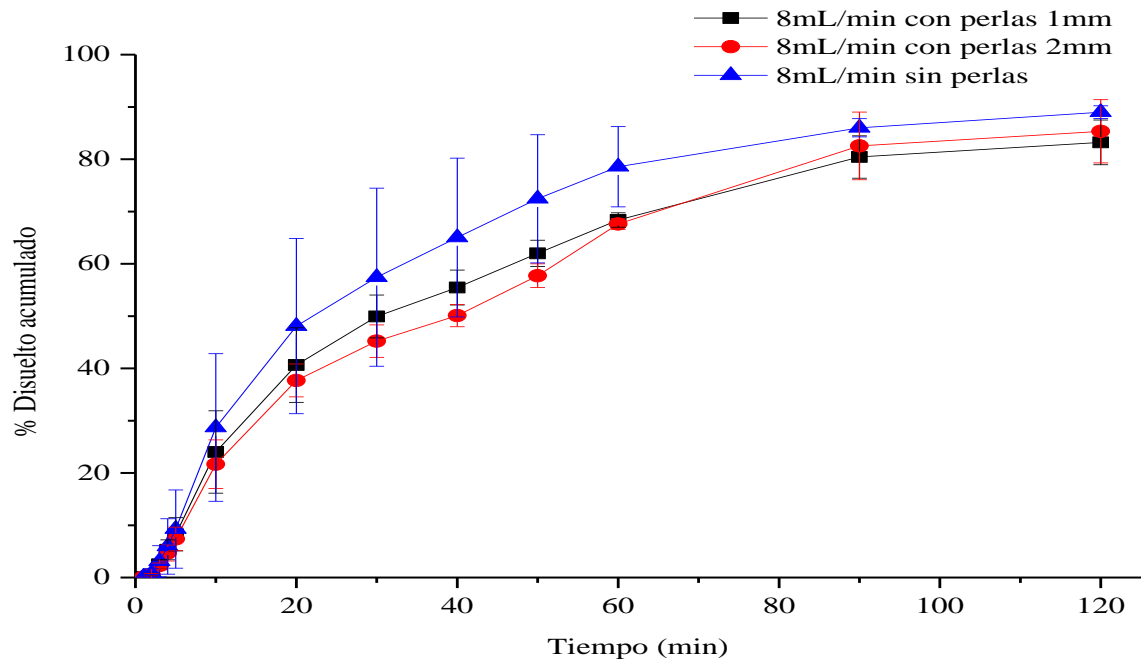


Figura 21. Perfiles de disolución para seleccionar la mejor condición de armado de celda a) en términos de concentración de BRAG-II disuelto y b) en % disuelto acumulado. Se utilizó una velocidad de 8 mL/min contemplando 3 condiciones de armado de la celda. (promedio \pm DE). Cápsulas F2P.

En investigaciones previas usando el aparato 4 USP a una velocidad de flujo de 8 mL/min fue posible tener una liberación comparable a 50 rpm de disolución usando el aparato 2 USP, lo que sugiere que es posible obtener fuerzas hidrodinámicas

comparables a esta velocidad de flujo (Paprskářová, Možná, Oga, Elhissi, & Alhnan, 2015). Es por ello por lo que las condiciones evaluadas incluyeron una prueba a velocidad de flujo de 4 y 8 mL/min correspondientes a 25 y 50 rpm respectivamente. La posibilidad de realizar la prueba a 4 mL/min implicaba disminuir el volumen total requerido de medio para cada prueba.

La velocidad de flujo de 4 mL/min generó porcentajes disueltos del activo 1 menores a los obtenidos empleando 8 mL/min (Figura 22), y considerando los reportes que refieren que la velocidad de 8 mL/min genera datos de correlación mejores que otras velocidades de flujo, se optó por mantener esta última velocidad de flujo para el método de disolución. La Figura 22 muestra los resultados.

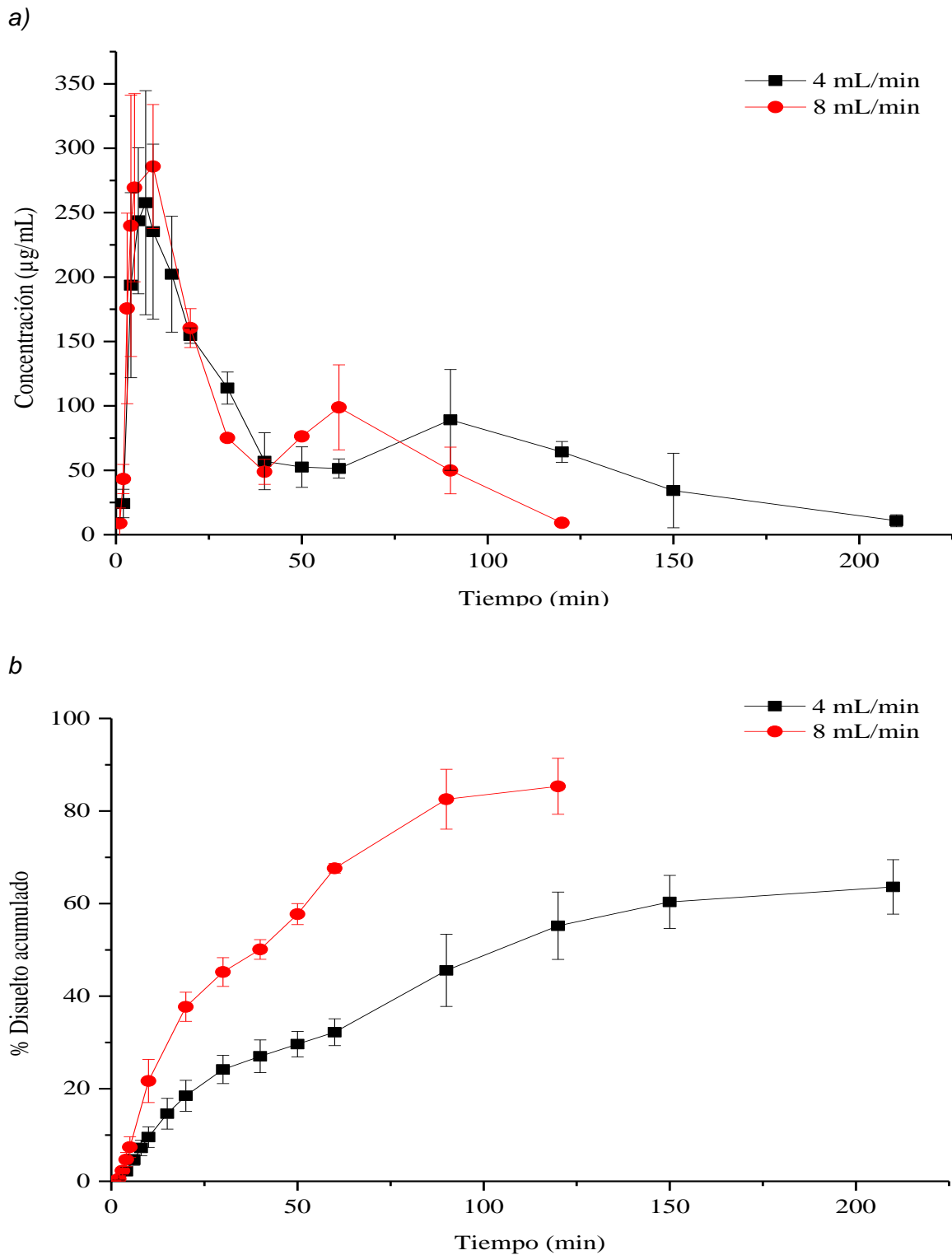


Figura 22. Perfiles de disolución para seleccionar la velocidad de flujo óptima a) en términos de concentración de BRAG-II y b) como % disuelto acumulado. Perfiles a 4 mL/min y 8 mL/min (promedio \pm DE). Formulación F1M.

Las condiciones del método de disolución finales que se establecieron fueron: sistema abierto, manteniendo una velocidad de flujo de 8 mL/min a $37^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, con el uso de perlas de vidrio de 2 mm de diámetro y acorde al montaje descrito. Idealmente, estas

condiciones de trabajo debieron establecerse con la formulación de referencia (F1R), sin embargo, se contaban con muy pocas unidades de estas para realizar estos ensayos preliminares y por ello se realizaron con la formulación de prueba.

Picazo y otros (2018) mostraron que para la implementación de un método de disolución predictivo *in vivo* - *in vitro* para formulaciones de liberación inmediata conteniendo BRAG-II, solo el aparato 4 USP con cambio de medios de disolución y en presencia de tensoactivos se podía ordenar las formulaciones de disolución *in vitro* en la misma secuencia de disponibilidad obtenida *in vivo*.

Se evaluaron tanto la formulación de prueba (F1P) como la de referencia (F1R) con el método de disolución establecido, empleando el medio FaSSGF pH 1.6 durante los primeros 30 min, y cambiando el medio a FaSSIF pH 6.5 por el resto de la prueba (de 31 min y hasta los 180 min). Los perfiles de disolución de cada formulación (Figura 23) muestran que BRAG-II contenido en la formulación de referencia, se disuelve en 100% al cabo de 40 min, mientras está en el medio FaSSGF pH 1.6; en contraste, BRAG-II en la formulación de prueba (F1P) se disuelve en menos del 40% en FaSSGF pH 1.6, y el cambio de medio solo aumentó su % disuelto de forma marginal, alcanzando al cabo de los 180 min del ensayo un % disuelto de 46.9%.

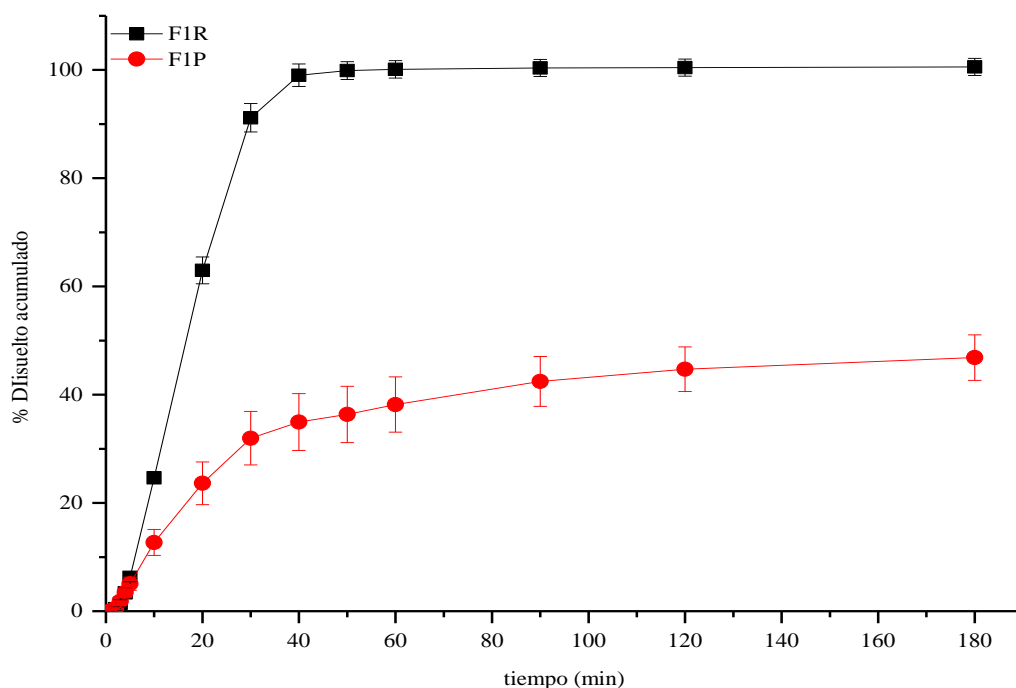


Figura 23. Perfil de disolución *in vitro* en aparato 4 USP de las formulaciones F1R y F1P (promedio \pm DE). Primeros 30 min en medio FaSSGF pH 1.6, cambio de medio a partir de este tiempo y hasta acabar prueba con FaSSIF pH 6.5.

La evaluación de la formulación optimizada de BRAG-II, F2P, se realizó bajo las mismas condiciones de estudio referidas para F1R y F1P anteriormente mencionadas; los resultados se muestran a continuación en la Figura 24.

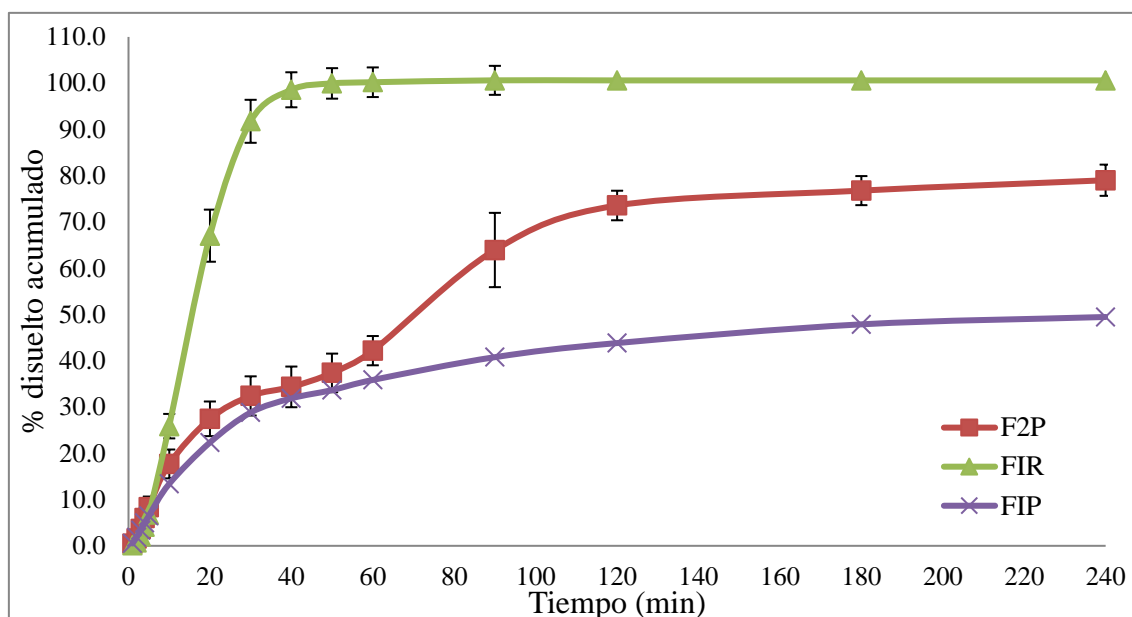
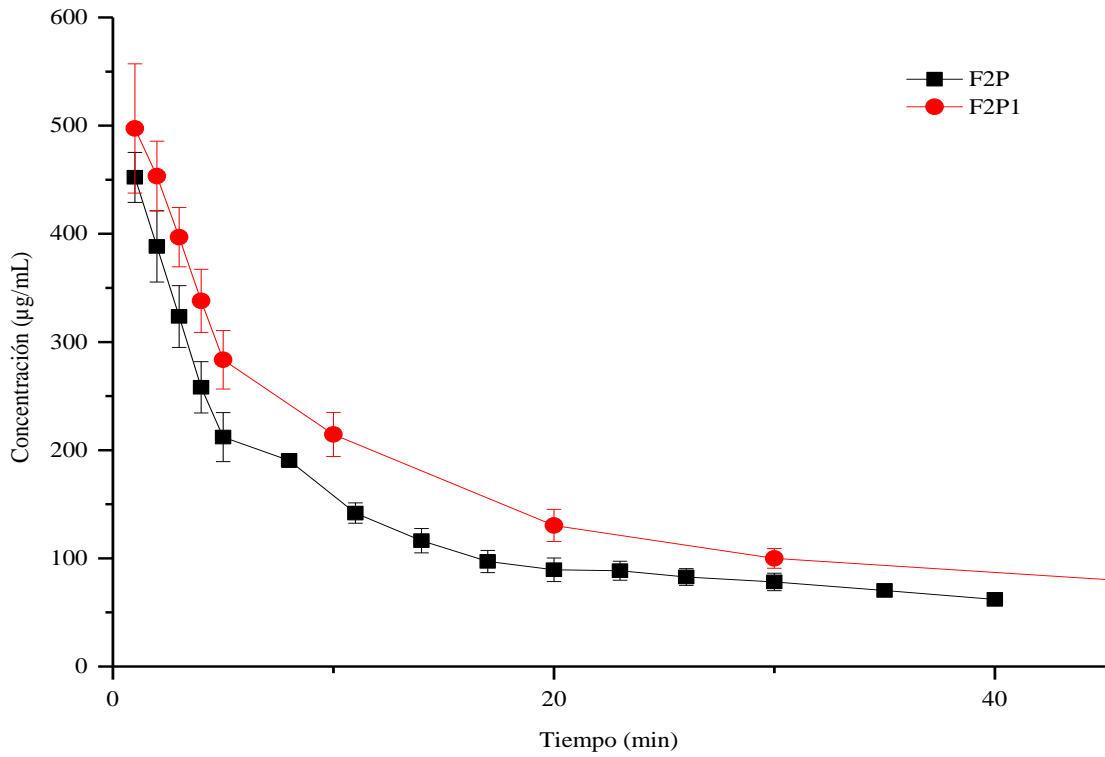


Figura 24. Perfil de disolución in vitro en aparato 4 USP de la formulación F2P optimizada para la liberación de BRAG-II, en comparación con los perfiles de F1R y F1P (promedio \pm DE). Primeros 30 min en medio FaSSGF pH 1.6, cambio de medio a partir de este tiempo y hasta acabar prueba con FaSSIF pH 6.5.

Si bien F2P mostró inducir hacia el final de la prueba una mejor disolución de BRAG-II comparado con F1P, la cinética de disolución de BRAG-II mostró ser pH dependiente a diferencia de la observada para la formulación de referencia F1R; además de no alcanzar a disolver al 100 % el activo BRAG-II.

Para evaluar si existía una posible interacción entre los activos de la formulación, que estuviera afectando la cinética de disolución de BRAG-II, se analizó la cinética de disolución de BRAG-II en la formulación modificada, F2P, pero sin la presencia de los otros ingredientes activos, activos 2 y 3; a esta formulación se le denominó F2P1. El perfil de disolución de F2P1 en términos de concentración de BRAG-II y de % disuelto acumulado se muestra en la Figura 25.

a)



b)

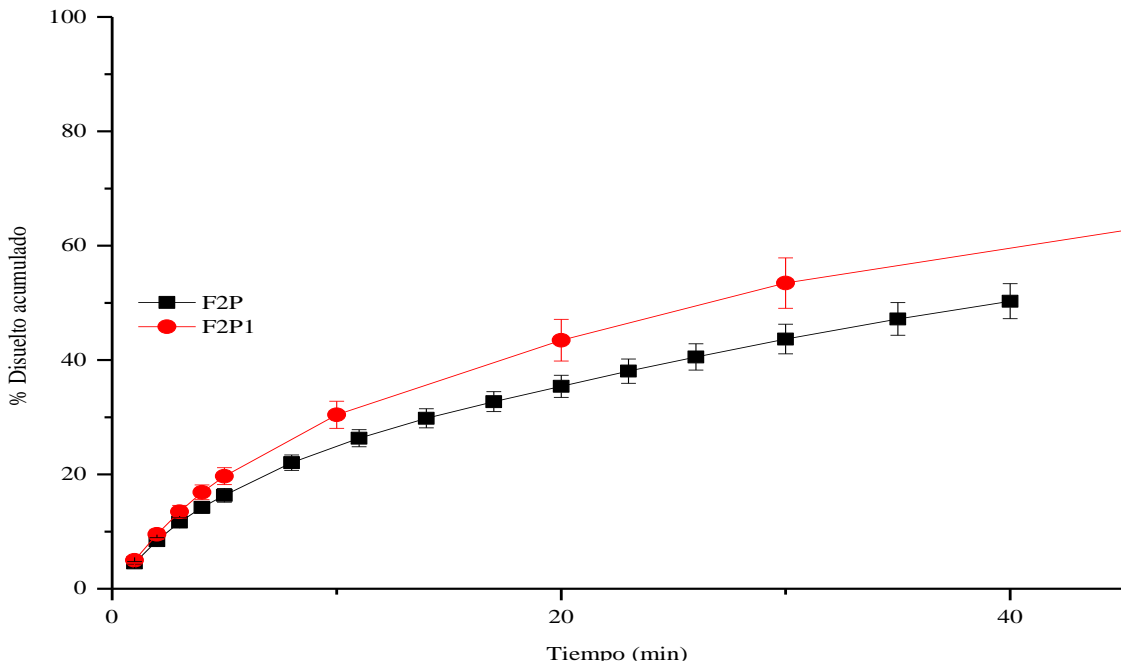


Figura 25. Perfil de disolución *in vitro* de las formulaciones F2P y F2P1, a) concentración de BARG-II disuelta y b) % disuelto acumulado (promedio \pm DE) en medio FaSSGF pH 1.6.

Si bien en apariencia el perfil de disolución de F2P1 muestra concentraciones de BRAG-II disueltas ligeramente mayores a las generadas por F2P, estas diferencias no son

significativas, por lo que se establece que la presencia de los otros activos (2 y 3) no interfieren en la capacidad de solubilización de BRAG-II.

Una vez concluidos los ensayos de disolución se identificaron los residuos sólidos de las celdas por CLAR y por DRXP, encontrando presencia del Activo 1 en todos los polvos remanentes. Al evaluar F1R por CLAR se obtuvieron concentraciones muy bajas, las cuales oscilaban en cantidades menores a 3 mg lo que corroboró la disolución de aproximadamente del 100% de la dosis del medicamento. Por otro lado, el escenario para F1P fue diferente pues las cantidades remanentes de BRAG-II en las celdas eran de aproximadamente 15 mg, esto debido a que la recuperación del polvo residual fue compleja y no se obtuvo de manera íntegra para su cuantificación. Por otro lado, los difractogramas de rayos X de los polvos residuales de todas las pruebas de disolución evaluadas mostraron la presencia de los tres principios activos. Los difractogramas obtenidos de los residuos al término de los ensayos de disolución se encuentran en el Anexo 2.

La optimización de una nueva formulación de F2P requerirá liberar y disolver el activo de una forma similar a la generada por F1R, esto es, liberando a BRAG-II de manera inmediata y disolviendo el total de la dosis dentro de los primeros 40 min de su administración.

9.4 Perfiles de disolución en equipo 2 USP vs 4 USP

Como se ha descrito en los antecedentes, existen ejemplos diversos que muestran que el uso del equipo de disolución 2 USP no logra discriminar formulaciones que generan perfiles de disolución diferentes y que, como consecuencia, generaran perfiles de concentración plasmática del fármaco distintos y no estadísticamente similares.

Para evaluar esto, se evaluó el perfil de disolución de la formulación F1P, que se sabe presenta un perfil farmacocinético no equivalente al obtenido después de la administración de la formulación de referencia F1R, así como la formulación de referencia F1R; empleando el medio de disolución FaSSGF pH 1.6. El resultado de este ensayo se muestra en la Figura 26.

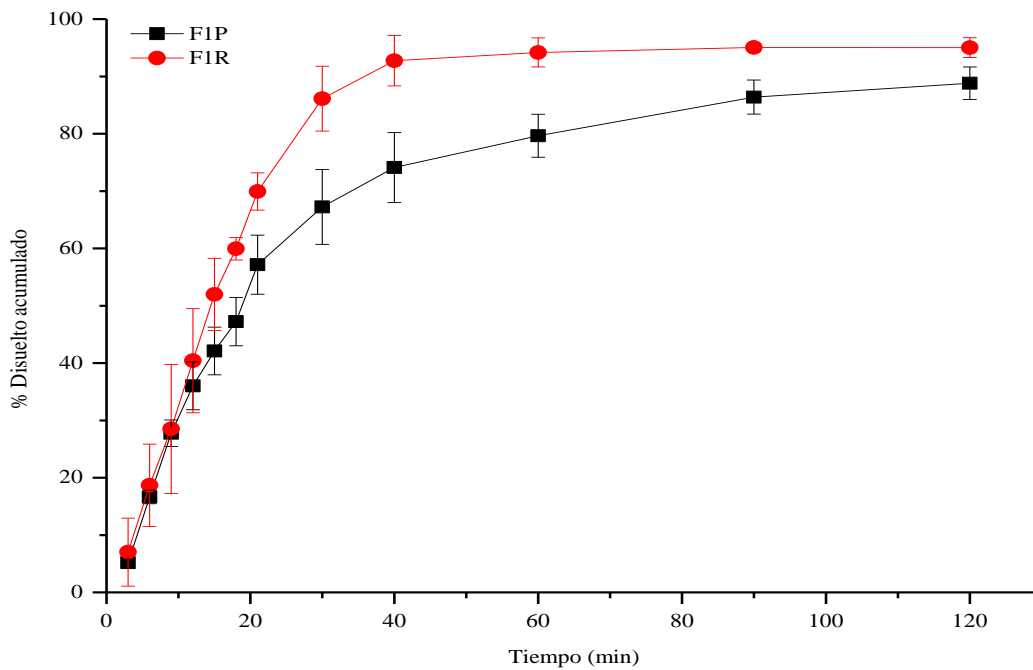


Figura 26. Perfil de disolución *in vitro* en aparato 2 USP de las formulaciones F1R y F1P (promedio \pm DE). Medio FaSSGF pH 1.6, 50 rpm, 37°C.

Para los resultados obtenidos del ensayo que se ilustra en la Figura 26, se llevó a cabo la determinación del factor de similitud. Para ello se empleó la Ecuación 21 donde se tomaron en cuenta los datos derivados de la disolución del aparato 2 USP (paletas, a 50 rpm y 37°C). Se obtuvieron los datos de la Tabla 7. El factor de similitud (f_2) es una transformación de raíz cuadrada recíproca logarítmica de la suma del error cuadrado y es una medición de la similitud en la disolución porcentual (%) entre los dos perfiles de disolución.

Tabla 7. Determinación del factor de similitud (f2) empleando el aparato 2 USP en medio FaSSGF pH 1.6.

tiempo (min)	F1P (% disuelto)	F1R (% disuelto)	(R-T1) ²	Suma (R-T1) ²	1/n*suma	1+(1/n*suma)	(1+(1/n*suma)) ^{-0.5}	((1+(1/n*suma)) ^{-0.5})*100	log(((1+(1/n*suma)) ^{-0.5})*100)	50*(log(((1+(1/n*suma)) ^{-0.5})*100))	f2
3	5.2	7.0	3.3371877	805.20256	134.20043	135.20043	0.0860025	8.6002479	0.934511	46.725548	46.7
6	16.6	18.7	4.0907821								
9	27.8	28.5	0.5495512								
12	36.0	40.4	19.129453								
15	42.1	52.0	97.363054								
18	47.2	59.9	161.41956								
21	57.2	69.9	162.70957								
30	67.2	86.1	356.6034								
40	74.1	92.7									
60	79.7	94.2									
90	86.4	95.1									
120	88.8	95.0									

Adicionalmente, se realizó el mismo ejercicio comparativo de perfiles de disolución de las formulaciones F1P y F1R bajo condiciones de estudio similares que en el aparato 2 USP (temperatura, medio de disolución, pH) pero empleando el equipo 4 USP. Los resultados del ensayo se ilustran en la Figura 29. La Tabla 8 muestra el cálculo de f2 para la comparación de estos perfiles.

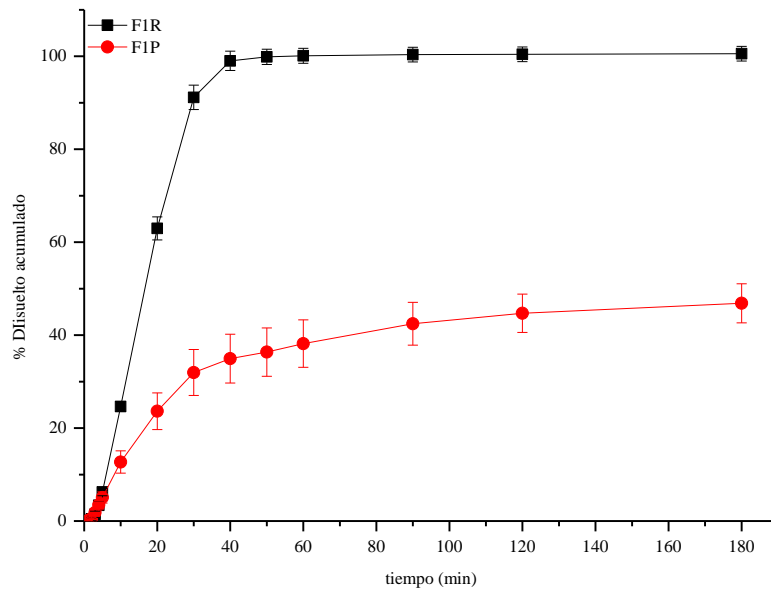


Figura 27. Perfil de disolución in vitro en aparato 4 USP de las formulaciones F1R y F1P (promedio \pm DE). Medio FaSSGF pH 1.6, 8 mL/min, 37°C.

Tabla 8. Determinación del factor de similitud (f2) empleando el aparato USP 4 en medio FaSSIF pH 6.5.

tiempo (min)	F1P (% disuelto)	F1R (% disuelto)	(R-T1)^2	Suma (R-T1)^2	1/n*suma	1+ (1/n*suma)	(1+ (1/n*suma))^0.5	((1+ (1/n*suma))^0.5)*100	log(((1+ (1/n*suma))^0.5)*100)	50*(log(((1+ (1/n*suma))^0.5)*100))	f2
1	0.1	0.1	0.0015955	9300.152	1550.02533	1551.02533	0.02539163	2.53916284	0.40469055	20.2345277	20.2
2	0.5	0.4	0.004883								
3	1.8	1.4	0.1532077								
4	3.5	3.4	0.0079775								
5	5.1	6.2	1.3570876								
10	12.7	24.6	142.48665								
20	23.6	63.0	1547.2833								
30	32.0	91.2	3505.1653								
40	35.0	99.0	4103.692								
50	36.4	99.9									
60	38.2	100.1									
90	42.5	100.4									
120	44.7	100.4									
180	46.9	100.6									

Si el valor de f_2 es mayor o igual a 50, entonces los perfiles de disolución son similares lo que representa equivalencia farmacéutica. Bajo nuestras condiciones de estudio, el ensayo realizado empleando el aparato 2 USP logra apenas discriminar ($f_2=46.7$) a las formulaciones. Cabe mencionar que el ensayo no se realizó bajo las condiciones descritas en la farmacopea para una formulación sólida conteniendo BRAG-II, sino bajo las condiciones equivalentes a las que se desarrolló el ensayo en el aparato 4 USP (ver sección experimental).

Si bien F1P no muestra equivalencia farmacéutica con F1R empleando las condiciones de disolución empleadas tanto con el aparato 2 USP ($f_2=46.7$) como con el aparato 4 USP ($f_2=20.2$), es evidente que el comportamiento de los perfiles de disolución es más discriminatorio empleando el aparato 4 USP que con el aparato 2 USP. El emplear el aparato 2 USP para evaluar alternativas farmacéuticas mediante ensayos de perfil de disolución podría generar falsos positivos.

9.5 Correlación *in vitro* - *in vivo*

Con respecto a las diversas condiciones de disolución evaluadas, el aparato 4 USP con cambio de medio y en presencia de medios biorrelevantes pudo generar un perfil de disolución que permite simular el perfil de absorción *in vivo*, mismo que no es posible reproducir con el aparato USP 1 o 2. La disolución *in vitro* de la formulación F1P en las condiciones seleccionadas no es completa en comparación con la formulación F1R (Figura 28), lo que probablemente refleja el comportamiento *in vivo* mostrado en la Figura 29 y conduce a una biodisponibilidad oral incompleta.

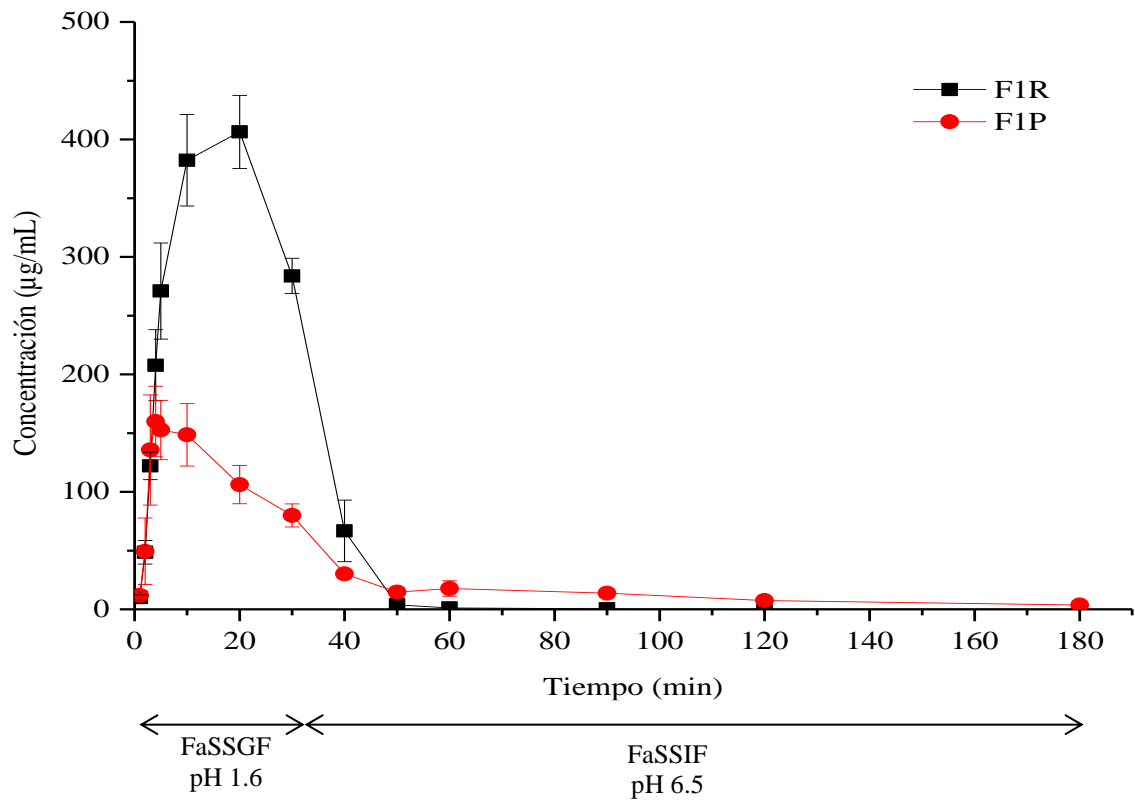


Figura 28. Perfil de disolución in vitro de las formulaciones F1R y F1P (promedio \pm DE), concentración de BRAG-II vs tiempo.

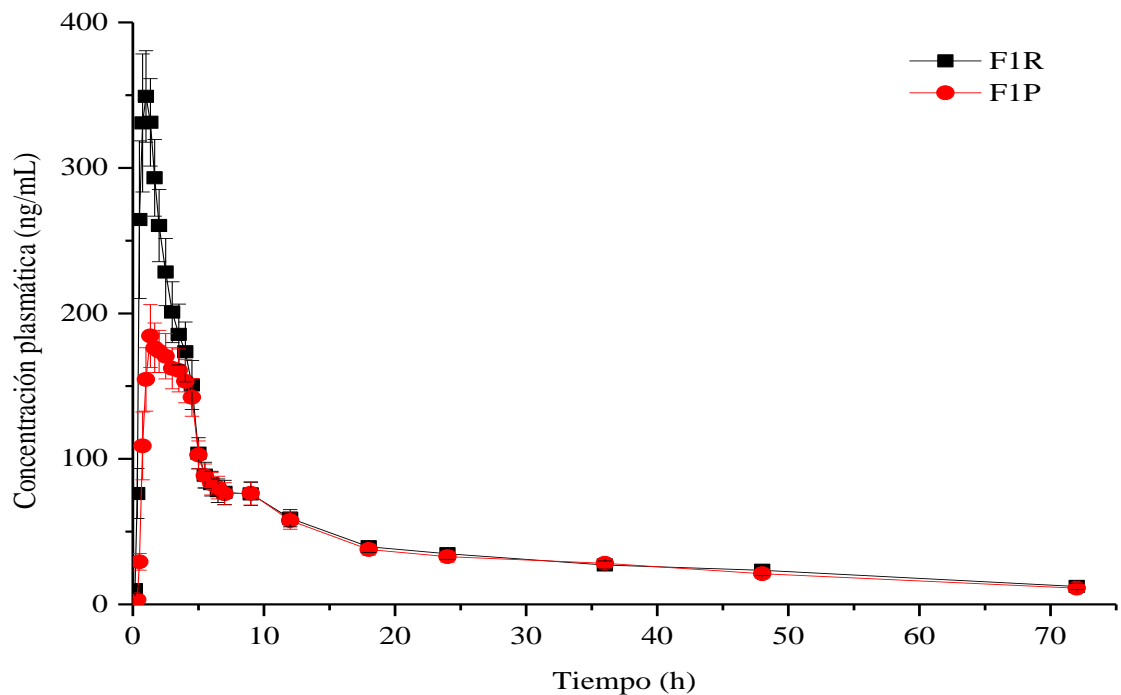


Figura 29. Perfil farmacocinético de las formulaciones F1P, cápsulas lote 01101801 y F1R, tabletas de referencia ($n=53 \pm EE$).

Analizando los resultados globales se puede apreciar que la mayor parte de la disolución del fármaco (> 90%) presente en la formulación F1R se logró disolver en medio gástrico (después de 30 min). Lo anterior debido posiblemente a que al ser un anfolito con capacidad de ionización a pH bajos - el valor de pKa para BRAG-II es 3.65 – lo cual favorece su solubilización y por tanto la disolución de este. El comportamiento de esta formulación tanto en el sistema *in vivo* como en el sistema *in vitro* demuestran que se trata de un medicamento de liberación inmediata y que la formulación de prueba, F1P, no permite la liberación y disolución del activo 1 de manera tal que se pueda establecer una equivalencia farmacéutica.

Los parámetros farmacocinéticos, a partir de los perfiles de concentración plasmática vs tiempo después de la administración de las dos formulaciones F1R y F1P en voluntarios sanos, se calcularon mediante el uso del programa *Pksolver* para *Excel*. El programa proporciona una herramienta rápida y fácil de usar para el análisis de datos de farmacocinética y farmacodinamia de rutina y básicos, con una interfaz sencilla de usar (Yong, Meirong, Jianping, & Shaofei, 2010).

Los parámetros farmacocinéticos se obtuvieron considerando un modelo bicompartimental, modelo que mejor se ajustó a los perfiles plasmáticos de acuerdo con el coeficiente de correlación obtenido. Los parámetros farmacocinéticos se resumen en la Tabla 9. Los parámetros obtenidos *in vitro*, se refieren al análisis del perfil de disolución que muestra el cambio en la concentración en el medio en función del tiempo (Figura 28). Los resultados muestran diferencias en los parámetros tanto en los perfiles *in vivo*, como en el perfil *in vitro* de la formulación F1P versus F1R empleando el aparato 4 USP.

Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos de las formulaciones F1R y F1P

Parámetro farmacocinético	<i>In Vivo</i>			<i>In Vitro</i>		
	F1R	F1P	F1R/F1P	F1R	F1P	F1R/F1P
t_{max} (min)	79	102	0.8	14	9	1.6
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	0.32	0.16	2	374.66	165.71	2.3
ABC_{0-t} ($\mu\text{g/mL} \cdot \text{min}$)	189	162	1.2	10963	5449	2.0
TMR y TMD	1995	3242	0.6	27	85	0.3
r^2	0.9648	0.9673	1.0	0.9736	0.9593	1.0

La C_{max} *in vivo* se alcanza primero para F1R, mientras que *in vitro*, aparentemente F1P comienza a disolver más rápido que F1R; sin embargo, ambas formulaciones comienzan su disolución rápidamente, la diferencia fundamental estriba en el C_{max} que cada una

genera tanto *in vivo* como *in vitro*. F1R genera *in vivo* 2 veces el C_{max} de F1P, situación que se asemeja a lo observado *in vitro* (2.3 veces el C_{max} de F1R vs F1P).

La cantidad de fármaco total (ABC) que se cuantificó en sangre vs la cuantificada *in vitro* difiere en proporción para ambas formulaciones: *in vivo* la relación de ABC_{F1R}/ABC_{F1P} es de 1.17, mientras *in vitro* es de 2.01. Esta diferencia en la proporción de fármaco disuelto evidencia que el hecho de comparar *in vitro* el proceso de disolución de una tableta que se desintegra rápidamente y se mantiene dispersa (F1R) versus el proceso de disolución del contenido de una cápsula (F1P) que no termina de disolverse en la celda de disolución, puede generar una subestimación de lo que realmente ocurre *in vivo*. Dada esta observación, se realizaron ensayos de disolución solo con el granulado contenido en F2P (formulación optimizada), y si bien si se observó un efecto de la cápsula en el porcentaje de disolución de BRAG-II, el granulado por sí solo, no liberaba e inducía la disolución de BRAG-II en la proporción en la que lo hace F1R a los 30 min (Anexo 4), por lo que todavía requiere mejoras en la formulación.

Se llevó a cabo la determinación de las fracciones absorbidas *in vivo* a través del método de Wagner-Nelson así como el cálculo de las fracciones disueltas (F_{dis}), Tabla 10 y Tabla 11, para la formulación F1R y F1P, respectivamente. Los datos crudos del análisis se encuentran en el Anexo 3.

Los diferentes colores denotan aquellos porcentajes en los que coinciden los valores obtenidos en el sistema *in vivo* y el sistema *in vitro*.

Tabla 10. Determinación de fracciones absorbidas y disueltas de la formulación F1R

F1R			
IN VIVO		IN VITRO	
tiempo (h)	Fabs (%)	tiempo (h)	Fdis (%)
0	0	0.05	2
0.167	2	0.10	9
0.333	15	0.15	20
0.5	51	0.20	32
0.75	69	0.25	44
1	79	0.30	56
1.333	84	0.35	67
1.667	85	0.40	77
2	85	0.45	86
2.5	89	0.50	93
3	91	0.58	100
3.5	96	0.67	104
4	100		

Tabla 11. Determinación de fracciones absorbidas y disueltas de la formulación F1P

F1P			
IN VIVO		IN VITRO	
tiempo (h)	Fabs (%)	tiempo (h)	Fdis (%)
0	0	0.02	0
0.167	0	0.03	1
0.333	1	0.05	2
0.5	9	0.07	4
0.75	33	0.08	5
1	50	0.17	13
1.333	64	0.33	23
1.667	68	0.50	31
2	73	0.67	34
2.5	80	0.83	36
3	86	1.00	37
3.5	94	1.50	42
4	99	2.00	44
		3.00	46

Si bien no se puede establecer una correlación punto a punto por las diferencias en los tiempos de análisis para las muestras *in vivo* vs *in vitro*, es de hacer notar que existe una mejor correlación entre los datos obtenidos de fracción absorbida y los de fracción del por ciento disuelto para los perfiles obtenidos de la formulación de referencia (F1R) que para aquellos obtenidos de los perfiles de la formulación de prueba. Esto resalta la necesidad de generar una formulación optimizada para la formulación de prueba (F1P), que permita disolver al fármaco de manera más extensa, que se aproxime al 100% dentro de los primeros 30 min de haberse ingerido el medicamento.

10.0 CONCLUSIONES

Se desarrolló un método de disolución adecuado para comparar el proceso de disolución *in vitro* con el perfil de absorción *in vivo* de BRAG-II. El aparato 4 USP y el uso de medios biorrelevantes permitió emular de mejor manera el proceso de liberación y disolución de las formas farmacéuticas evaluadas.

Mediante el uso de este método se demostró que F1P no presenta equivalencia farmacéutica con F1R por lo que fue necesario realizar cambios en la formulación original. La formulación optimizada F2P, aún requiere mejoras para permitir disolver a BRAG-II de manera cuantitativa dentro de los primeros 40 min de haber sido administrado el medicamento.

El establecer una correlación *in vitro-in vivo* servirá de apoyo en la selección de una formulación mejorada que se asemeje al perfil de F1R, previo a realizar los ensayos clínicos requeridos para solicitar el registro de la alternativa farmacéutica.

11.0 ANEXOS

Anexo 1

Adecuabilidad del sistema durante la validación del método de cuantificación.

Medio FaSSGF pH 1.6 Día 1

System Suitability Report							Page 1 of 2	
Sequence : C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Sequence 19_Guadalupe Badillo\Mayo 2021\17\DHR19A27E.seq User : System Printed : 19/05/2021 06:07:40 p.m.								
Sample ID	Data Filename							
DHR19A27E 02	C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27E002.dat							
DHR19A27E 03	C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27E003.dat							
DHR19A27E 04	C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27E004.dat							
DHR19A27E 05	C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27E005.dat							
DHR19A27E 06	C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27E006.dat							
System is Suitable								
DAD-CH1	Compound	Parameter	Min	Max	%RSD			
270 nm	BRAG-II (270nm)	rt			2			
		area			2			
Sample ID	Compound	Parameter	Average	Low	High	%RSD	Status	
DHR19A27E 02	BRAG-II (270nm)	rt	1.759	1.749	1.772	0.489	Passed	
DHR19A27E 03							Passed	
DHR19A27E 04							Passed	
DHR19A27E 05							Passed	
DHR19A27E 06							Passed	
	area		2364216	2334040	2395154	1.030		

System Suitability Report							Page 2 of 2	
Sequence : C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Sequence 19_Guadalupe Badillo\Mayo 2021\17\DHR19A27E.seq User : System Printed : 19/05/2021 06:07:40 p.m.								
DHR19A27E 02							Passed	
DHR19A27E 03							Passed	
DHR19A27E 04							Passed	
DHR19A27E 05							Passed	
DHR19A27E 06							Passed	
	area		2334040	2395154	2355773		Passed	

Medio FaSSGF pH 1.6 Día 2

System is Suitable							
DAD-CH1	Compound	Parameter	Min	Max	%RSD		
270 nm	BRAG-II (270nm)	rt			2		
		area			2		
Sample ID	Compound	Parameter	Average	Low	High	%RSD	Status
DHR19A27G0 02	BRAG-II (270nm)	rt	1.758	1.753	1.771	0.414	Passed
DHR19A27G0 03							Passed
DHR19A27G0 04							Passed
DHR19A27G0 05							Passed
DHR19A27G0 06							Passed
	area		2362694	2357635	2368746	0.224	
DHR19A27G0 02							Passed
DHR19A27G0 03							Passed
DHR19A27G0 04							Passed
DHR19A27G0 05							Passed
DHR19A27G0 06							Passed

System Suitability Report							Page 1 of 1	
Sequence : C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Sequence 19_Guadalupe Badillo\Mayo 2021\20\DHR19A27G.seq User : System Printed : 20/05/2021 02:48:36 p.m.								
Sample ID	Data Filename							
DHR19A27G0 02	C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27G002.dat							
DHR19A27G0 03	C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27G003.dat							
DHR19A27G0 04	C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27G004.dat							
DHR19A27G0 05	C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27G005.dat							
DHR19A27G0 06	C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27G006.dat							

Medio FaSSGF pH 1.6 Día 3

System is Suitable							
DAD-CH1	Compound	Parameter	Min	Max	%RSD		
270 nm	BRAG-II (270nm)	rt			2		
		area			2		
Sample ID	Compound	Parameter	Average	Low	High	%RSD	Status
DHR19A27I0 02	BRAG-II (270nm)	rt	1.793	1.782	1.804	0.539	Passed
DHR19A27I0 03							Passed
DHR19A27I0 04							Passed
DHR19A27I0 05							Passed
DHR19A27I0 06							Passed
	area		2391305	2388983	2394354	0.083	
DHR19A27I0 02							Passed
DHR19A27I0 03							Passed
DHR19A27I0 04							Passed
DHR19A27I0 05							Passed
DHR19A27I0 06							Passed

System Suitability Report							Page 1 of 1	
Sequence : C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Sequence 19_Guadalupe Badillo\Mayo 2021\21\DHR19A27I.seq User : System Printed : 21/05/2021 01:19:33 p.m.								
Sample ID	Data Filename							
DHR19A27I00 2	C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27I002.dat							
DHR19A27I00 3	C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27I003.dat							
DHR19A27I00 4	C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27I004.dat							
DHR19A27I00 5	C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27I005.dat							
DHR19A27I00 6	C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27I006.dat							

Medio FaSSIF pH 6.5 Día 1

System is Suitable							
DAD-CH1	Compound	Parameter	Min	Max	%RSD		
270 nm	BRAG-II (270nm)	rt			2		
		area			2		
Sample ID	Compound	Parameter	Average	Low	High	%RSD	Status
	BRAG-II (270nm)	rt	1.770	1.768	1.772	0.113	
DHR19A27F002		1.771					Passed
DHR19A27F003		1.768					Passed
DHR19A27F004		1.771					Passed
DHR19A27F005		1.768					Passed
DHR19A27F006		1.772					Passed
		area	2389496	2373085	2398005	0.399	
DHR19A27F002	2393057						Passed
DHR19A27F003	2398005						Passed
DHR19A27F004	2392138						Passed
DHR19A27F005	2391194						Passed
DHR19A27F006	2373085						Passed

System Suitability Report Page 1 of 1

Sequence : C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Sequence 19_Guadalupe Badillo Mayo 2021\17 DHR19A27F.seq
 User : System
 Printed : 19/05/2021 06:05:33 p.m.

Sample ID Data Filename
 DHR19A27F002 C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27F002.dat
 DHR19A27F003 C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27F003.dat
 DHR19A27F004 C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27F004.dat
 DHR19A27F005 C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27F005.dat
 DHR19A27F006 C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27F006.dat

Medio FaSSIF pH 6.5 Día 2

System is Suitable							
DAD-CH1	Compound	Parameter	Min	Max	%RSD		
270 nm	BRAG-II (270nm)	rt			2		
		area			2		
Sample ID	Compound	Parameter	Average	Low	High	%RSD	Status
	BRAG-II (270nm)	rt	1.769	1.759	1.777	0.338	
DHR19A27H002		1.759					Passed
DHR19A27H003		1.777					Passed
DHR19A27H004		1.769					Passed
DHR19A27H005		1.771					Passed
DHR19A27H006		1.768					Passed
		area	2336497	2319177	2351349	0.547	
DHR19A27H002	2332529						Passed
DHR19A27H003	2319177						Passed
DHR19A27H004	2346615						Passed
DHR19A27H005	2332816						Passed
DHR19A27H006	2351349						Passed

System Suitability Report Page 1 of 1

Sequence : C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Sequence 19_Guadalupe Badillo Mayo 2021\20 DHR19A27H.seq
 User : System
 Printed : 20/05/2021 05:30:01 p.m.

Sample ID Data Filename
 DHR19A27H002 C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27H002.dat
 DHR19A27H003 C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27H003.dat
 DHR19A27H004 C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27H004.dat
 DHR19A27H005 C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27H005.dat
 DHR19A27H006 C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27H006.dat

Medio FaSSIF pH 6.5 Día 3

System is Suitable							
DAD-CH1	Compound	Parameter	Min	Max	%RSD		
270 nm	BRAG-II (270nm)	rt			2		
		area			2		
Sample ID	Compound	Parameter	Average	Low	High	%RSD	Status
	BRAG-II (270nm)	rt	1.766	1.758	1.783	0.602	
DHR19A27J002		1.767					Passed
DHR19A27J003		1.758					Passed
DHR19A27J004		1.783					Passed
DHR19A27J005		1.763					Passed
DHR19A27J006		1.758					Passed
		area	2372190	2347457	2390561	0.693	
DHR19A27J002	2347457						Passed
DHR19A27J003	2379331						Passed
DHR19A27J004	2365423						Passed
DHR19A27J005	2378180						Passed
DHR19A27J006	2390561						Passed

System Suitability Report Page 1 of 1

Sequence : C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Sequence 19_Guadalupe Badillo Mayo 2021\21 DHR19A27J.seq
 User : System
 Printed : 21/05/2021 03:56:18 p.m.

Sample ID Data Filename
 DHR19A27J002 C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27J002.dat
 DHR19A27J003 C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27J003.dat
 DHR19A27J004 C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27J004.dat
 DHR19A27J005 C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27J005.dat
 DHR19A27J006 C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\DHR19A27J006.dat

Tabla A1. Datos obtenidos de las curvas de calibración correspondientes a la validación del método analítico de cuantificación de BRAG-II en medio FaSSGF pH 1.6.

DÍA 1 (mAU)						DÍA 2 (mAU)						DÍA 3 (mAU)					
Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Desv. Std.	%C.V.	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Desv. Std.	%C.V.	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Desv. Std.	%C.V.
231404	234701	228439	231515	3132	1.35	225919	225417	231604	227647	3436	1.51	232020	229703	232334	231352	1437	0.62
467006	472174	480410	473197	6760	1.43	457794	460856	474223	464291	8737	1.88	462011	463947	474193	466717	6546	1.40
1187076	1190347	1213800	1197074	14577	1.22	1175602	1182493	1157174	1171756	13090	1.12	1170128	1189155	1174226	1177836	10014	0.85
2385671	2385578	2424157	2398469	22247	0.93	2368629	2368602	2380935	2372722	7113	0.30	2386101	2392833	2401625	2393520	7785	0.33
3565854	3632563	3598293	3598903	33359	0.93	3597969	3594007	3602011	3597996	4002	0.11	3613270	3579764	3615714	3602916	20087	0.56
4801454	4778540	4940769	4840254	87799	1.81	4780152	4781378	4813316	4791615	18803	0.39	4775453	4828111	4794958	4799507	26622	0.55
5375683	5363909	5367413	5369002	6046	0.11	5392339	5474484	5435142	5433988	41085	0.76	5413525	5400700	5372229	5395485	21136	0.39

Tabla A2. Determinación del factor de respuesta en la validación de BRAG-II del método analítico en medio FaSSGF pH 1.6.

Concentración (µg/mL)	Factor de respuesta					
	Día 1	Día 2	Día 3	Media	Desv. Std.	%CV
4.4	52617	51738	52580	53817	861	1.60
8.8	53772	52760	53036			
22	54412	53262	53538			
44	54511	53926	54398			
66	54529	54515	54590			
88	55003	54450	54540			
100	53690	54340	53955			

Tabla A3. Determinación de parámetros de validación del método analítico de cuantificación de BRAG-II en medio FaSSGF pH 1.6.

Parámetros de validación en medio FaSSGF pH 1.6			
Concentración CTD ($\mu\text{g/mL}$) (X)	Promedio curvas 3 días (Y)	Concentración, misma curva empleando ecuación de la recta	% Recuperado
4.4	230171	4.374	99.40
8.8	468068	8.745	99.38
22	1182222	21.867	99.40
44	2388237	44.028	100.06
66	3599938	66.292	100.44
88	4810459	88.535	100.61
100	5399492	99.359	99.36
Sumatoria	18078587	Promedio	99.81
Pendiente (b_1)	54422		
Intercepto	-7846		
r^2	0.9999		
$S_{y/x}$	8322		
S_{b_1}	89		
LC	3.4 $\mu\text{g/mL}$		
LD	1.1 $\mu\text{g/mL}$		
$IC(B_1)_{inferior}$	53875		
$IC(B_1)_{superior}$	54970		
$IC(\mu)_{inferior}$	99.27		
$IC(\mu)_{superior}$	100.34		

Tabla A4. Datos obtenidos de las curvas de calibración correspondientes a la validación del método analítico de cuantificación de BRAG-II en medio FaSSIF pH 6.5

DÍA 1 (mAU)						DÍA 2 (mAU)						DÍA 3 (mAU)					
Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Desv. Std.	%C.V.	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Desv. Std.	%C.V.	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Desv. Std.	%C.V.
233148	234495	234777	234140	871	0.37	225515	225816	228845	226725	1842	0.81	229706	233022	238532	233753	4458	1.91
476930	470419	471025	472791	3597	0.76	466772	464701	466320	465931	1089	0.23	468039	470863	469582	469495	1414	0.30
1174661	1212875	1180332	1189289	20622	1.73	1176626	1163508	1181972	1174035	9501	0.81	1185613	1205465	1204641	1198573	11231	0.94
2390478	2389666	2396893	2392346	3959	0.17	2345618	2361507	2372661	2359929	13590	0.58	2392169	2398495	2387884	2392849	5338	0.22
3648157	3651001	3665114	3654757	9081	0.25	3530141	3608182	3593183	3577169	41412	1.16	3518641	3622778	3578264	3573228	52251	1.46
4879714	4899713	4903808	4894412	12892	0.26	4774008	4766965	4721202	4754058	28672	0.60	4743878	4857859	4797960	4799899	57015	1.19

Tabla A5. Determinación del factor de respuesta en la validación de BRAG-II del método analítico en medio FaSSIF pH 6.5.

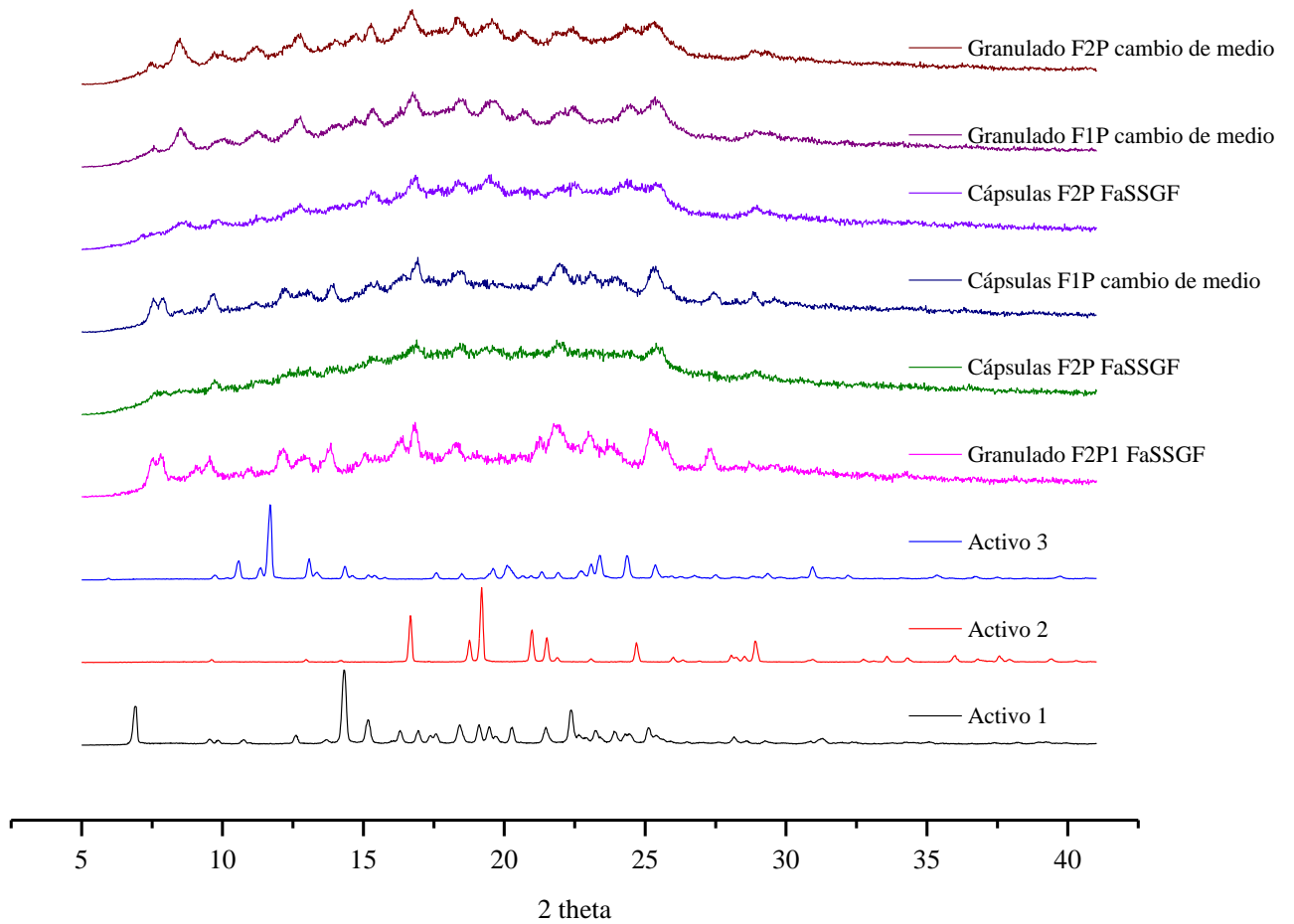
Concentración (µg/mL)	Factor de respuesta					
	Día 1	Día 2	Día 3	Media	Desv. Std.	%CV
4.4	53214	51528	53126	54036	945	1.75
8.8	53726	52947	53352			
22	54059	54545	54481			
44	54371	53635	54383			
66	55375	54200	54140			
88	55618	54023	54544			
100	55716	53815	53969			

Tabla A6. Determinación de parámetros de validación del método analítico de cuantificación de BRAG-II en medio FaSSIF pH 6.5.

Parámetros de validación en medio FaSSIF pH 6.5			
Concentración CTD ($\mu\text{g/mL}$) (X)	Promedio curvas 3 días (Y)	Concentración, misma curva empleando ecuación de la recta	% Recuperado
4.4	231540	4.4	101.00
8.8	469406	8.8	99.91
22	1195954	22.1	100.34
44	2381708	43.7	99.43
66	3601718	66.1	100.08
88	4816123	88.3	100.29
100	5449987	99.8	99.84
Sumatoria	18146436	Promedio	100.126
Pendiente (b_1)	54704		
Intercepto	-11572		
r^2	0.9999		
$S_{y/x}$	8322		
S_{b1}	89		
LC	1.5 $\mu\text{g/mL}$		
LD	0.5 $\mu\text{g/mL}$		
$IC(B_1)_{inferior}$	54457		
$IC(B_1)_{superior}$	54951		
$IC(\mu)_{inferior}$	99.65		
$IC(\mu)_{superior}$	100.60		

Anexo 2

Análisis de DRXP de residuos de las celdas al término de los ensayos de disolución.



Anexo 3

Resultados obtenidos del ensayo *in vivo* con F1R (Aplicación del Método de Wagner Nelson).

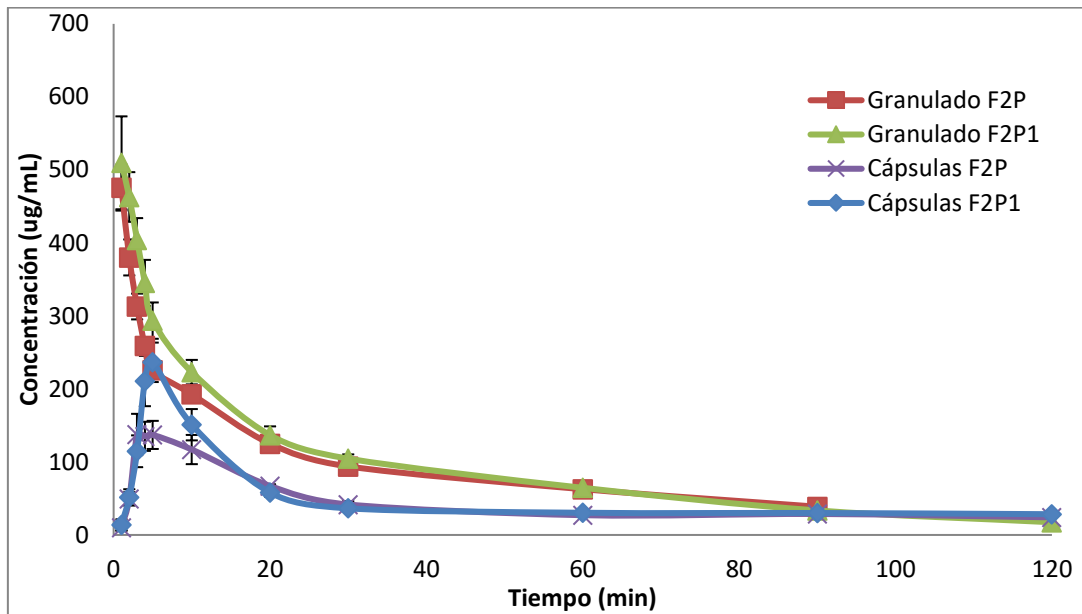
Tiempo (h)	N	Media (ng/mL)	Desv. Est. (ng/mL)	Error Est. (ng/mL)	Min (ng/mL)	Mediana (ng/mL)	Max (ng/mL)	CV%	In CpA	AUC 0-t	AUC 0-t sum	Ec. de Wagner-Nelson	verificación de orden uno	% absorbido
0	53	0.156	0.945	0.13	0	0	6.74	605	-1.858					
0.167	53	10.121	18.532	2.546	0	1.56	82.03	183.1	2.315	0.858	0.858	10.465	531.655	2
0.333	53	76.178	124.674	17.125	0	26.22	545.71	163.7	4.333	7.163	8.021	79.395	462.725	15
0.5	53	264.44	394.238	54.153	1.27	84.32	1722.29	149.1	5.578	28.442	36.463	279.065	263.056	51
0.75	53	330.87	345.256	47.424	1.83	245.51	1906.56	104.3	5.802	74.414	110.876	375.341	166.779	69
1	53	349.114	229.015	31.458	9.98	317.73	1056.75	65.6	5.855	84.998	195.874	427.677	114.443	79
1.333	53	331.337	218.595	30.026	24.81	273.36	1046.03	66	5.803	113.295	309.169	455.342	86.778	84
1.667	53	293.176	192.032	26.378	27	253.21	1070.42	65.5	5.681	104.294	413.463	459.012	83.108	85
2	53	260.4	180.517	24.796	36.67	242.13	1072.94	69.3	5.562	92.170	505.633	463.205	78.915	85
2.5	53	228.396	168.183	23.102	23.53	203.74	948.79	73.6	5.431	122.199	627.832	480.214	61.907	89
3	53	200.855	152.31	20.921	14.24	168.1	766.85	75.8	5.303	107.313	735.145	495.715	46.405	91
3.5	53	185.481	152.444	20.94	11.51	144.05	774.7	82.2	5.223	96.584	831.729	519.080	23.040	96
4	53	173.566	149.711	20.564	8.37	149.21	784.17	86.3	5.157	89.762	921.491	543.168	-1.047	100
4.5	53	150.789	122.407	16.814	5.99	125.08	565.46	81.2	5.016	81.089	1002.580	552.915	-10.794	
5	53	103.882	77.708	10.674	5.6	83.41	343.96	74.8	4.643	63.668	1066.247	531.544	10.576	
5.5	53	88.809	64.723	8.89	4.75	69.43	263.52	72.9	4.486	48.173	1114.420	535.793	6.328	
6	53	82.974	61.641	8.467	4.1	62.5	245.85	74.3	4.419	42.946	1157.366	547.183	-5.063	
6.5	53	78.103	58.79	8.075	2.99	56.39	231.32	75.3	4.358	40.269	1197.635	558.464	-16.343	
7	53	77.003	60.565	8.319	2.56	58.62	267.51	78.7	4.344	38.777	1236.412	572.917	-30.796	
9	53	75.876	57.998	7.967	2.12	61.49	215.25	76.4	4.329	152.879	1389.291	633.108	-90.987	
12	53	59.207	43.47	5.971	9.76	52.14	172.31	73.4	4.081	202.625	1591.915	697.710	-155.589	
18	53	39.584	27.718	3.807	5.32	30.78	100.39	70	3.678	296.373	1888.288	796.959	-254.839	
24	53	34.733	27.973	3.842	1.95	27.11	120.64	80.5	3.548	222.951	2111.239	881.532	-339.411	
36	50	27.108	19.762	2.795	2.66	26.35	74.1	72.9	3.300	371.046	2482.285	1022.730	-480.610	
48	50	23.422	25.567	3.616	1.28	16.46	130.19	109.2	3.154	303.180	2785.465	1140.647	-598.526	
72	50	12.343	15.306	2.165	0	7.98	78.84	124	2.513	429.180	3214.645	1301.708	-759.588	
													542.120	

Resultados obtenidos del ensayo *in vivo* con F1P (Aplicación del Método de Wagner Nelson).

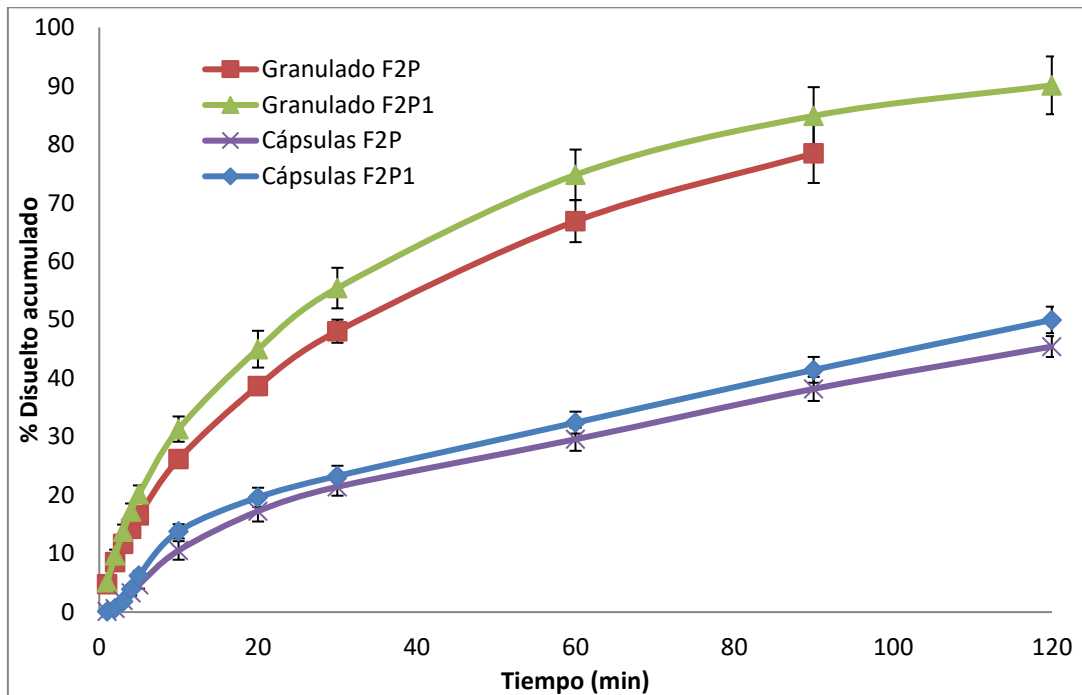
Tiempo (h)	N	Media (ng/mL)	Desv. Est. (ng/mL)	Error Est. (ng/mL)	Min (ng/mL)	Mediana (ng/mL)	Max (ng/mL)	CV%	In CpB	AUC 0-t	AUC 0-t sum	Ec. de Wagner-Nelson	verificación de orden uno	% absorbido
0	53	0.155	0.646	0.089	0	0	3.22	415.8	-1.864					0
0.167	53	0.058	0.425	0.058	0	0	3.1	728	-2.847	0.018	0.018	0.064	345.975	0
0.333	53	3.202	8.005	1.1	0	0	44.85	250	1.164	0.271	0.288	3.300	342.738	1
0.5	53	29.317	41.856	5.749	0	10.8	199.28	142.8	3.378	2.715	3.004	30.342	315.697	9
0.75	53	108.933	169.655	23.304	0	44.74	812.6	155.7	4.691	17.281	20.285	115.853	230.186	33
1	53	154.599	158.871	21.823	0	109.16	712.43	102.8	5.041	32.942	53.226	172.756	173.283	50
1.333	53	184.45	157.185	21.591	3.07	139.53	699.13	85.2	5.217	56.452	109.678	221.863	124.176	64
1.667	53	176.318	124.215	17.062	3.79	166.12	515.89	70.4	5.172	60.248	169.926	234.283	111.756	68
2	53	173.919	105.32	14.467	4.07	175.51	442.83	60.6	5.159	58.314	228.241	251.776	94.263	73
2.5	53	170.503	113.332	15.567	4.33	134.68	634.12	66.5	5.139	86.106	314.346	277.732	68.306	80
3	53	162.283	102.729	14.111	7.53	142.42	472.18	63.3	5.089	83.197	397.543	297.892	48.147	86
3.5	53	160.851	107.473	14.763	10.82	150.06	505.57	66.8	5.080	80.784	478.326	324.017	22.022	94
4	53	153.349	107.876	14.818	12.04	129.63	500.9	70.3	5.033	78.550	556.876	343.310	2.729	99
4.5	53	142.259	94.675	13.005	10.64	124.2	429.71	66.6	4.958	73.902	630.778	357.429	-11.390	
5	53	102.729	70.121	9.632	7.12	84.66	304.55	68.3	4.632	61.247	692.025	338.792	7.247	
5.5	53	88.42	59.163	8.127	5.67	74.27	262.02	66.9	4.482	47.787	739.813	340.784	5.255	
6	53	82.905	55.815	7.667	4.66	72.07	243.29	67.3	4.418	42.831	782.644	349.879	-3.841	
6.5	53	80.325	56.575	7.771	4.01	64.77	234.6	70.4	4.386	40.808	823.451	361.220	-15.181	
7	53	76.014	55.202	7.583	3.24	65.43	221.15	72.6	4.331	39.085	862.536	370.241	-24.202	
9	53	76.326	58.336	8.013	2.37	58.65	230.12	76.4	4.335	152.340	1014.876	422.519	-76.480	
12	53	57.631	43.855	6.024	8.84	43.6	158.06	76.1	4.054	200.936	1215.812	472.367	-126.328	
18	53	37.658	26.893	3.694	4.3	29.34	109.89	71.4	3.629	285.867	1501.679	549.909	-203.870	
24	53	32.799	27.379	3.761	2	24.73	107.33	83.5	3.490	211.371	1713.050	617.152	-271.113	
36	52	28.244	21.986	3.049	2.16	26.28	89.01	77.8	3.341	366.258	2079.308	737.535	-391.496	
48	51	21.056	19.947	2.793	1.52	15.88	101.55	94.7	3.047	295.800	2375.108	831.249	-485.211	
72	53	11.109	12.969	1.781	0	7.01	67.01	116.7	2.408	385.980	2761.088	952.967	-606.929	
													346.039	

Anexo 4.

a)



b)



Perfiles de disolución de formulaciones F2P y F2P1 como granulado y con el granulado en cápsulas como a) concentración disuelta y b) en % disuelto acumulado (promedio \pm D.E.)

Bibliografía

- (MFMER), M. F. (11 de noviembre de 2021). *Bloqueadores de los canales de calcio*. Recuperado el 10 de octubre de 2022, de <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/high-blood-pressure/in-depth/calcium-channel-blockers/art-20047605>
- (MFMER), M. F. (11 de noviembre de 2021). *Diuréticos*. Recuperado el 10 de octubre de 2022, de <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/high-blood-pressure/in-depth/diuretics/art-20048129>
- (MFMER), M. F. (11 de noviembre de 2021). *Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina*. Recuperado el 10 de octubre de 2022, de <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/high-blood-pressure/in-depth/ace-inhibitors/art-20047480>
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). (Septiembre de 2017). Recuperado el Junio de 2020, de <https://cima.aemps.es>
- Badillo Lugo, G. M. (2017). *Estudio de la cinética de disolución de un sistema cocrystalino de praziquantel bajo condiciones de disolución con flujo continuo*. Cuernavaca: Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Bajaj, A., Rao, M. R., Pardeshi, A., & Sali, D. (2012). *AAPS PharmSciTech*, 13(4), 1331–1340.
- Boehringer Ingelheim. (julio de 2009). Recuperado el junio de 2020, de accessdata.fda.gov
- Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Oviedo-Solís, C., Ramírez-Villalobos, D., Hernández, B., & Barquera, S. (2021). Epidemiología de la hipertensión arterial en adultos mexicanos: diagnóstico, control y tendencias. *Ensanut 2020. Salud pública de México*, 63(6), 692-704. Obtenido de <https://doi.org/10.21149/12851>
- Cao, Y., Shi, L.-L., Cao, Q.-R., Yang, M., & Cuia, J.-H. (2016). *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 15(2), 385-394.
- Cárdenas Cuadros, P. A. (2015). *Estudio de la correlación in vitro/ in vivo de la liberación de 6-metilcumarina a partir de un sistema microparticulado*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Cardot, J. M., Lukas, J. C., & Muniz, P. (29 de agosto de 2018). Time Scaling for In Vitro-In Vivo Correlation: the Inverse Release Function (IRF) Approach. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, 20(6), 1-10. doi:10.1208/s12248-018-0250-5
- Connors, K. A. (2010). *Thermodynamics of pharmaceutical systems*. New Jersey.

-
- Consejo de Salubridad General. (2017). *Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos*. Comisión Interinstitucional del Cuadro Básico y Catálogo de Insumos del Sector Salud, Ciudad de México.
- Dmitry, A., & Peter E., C. (2012). The role of angiotensin receptor blockers in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 13(3), 317–327. doi:10.1177/1470320312443910
- Doménech-Berrozpe, Lauroba-Viladrosa, Calpena-Campmany, Codina, C., Ecribano-Ferrer, & Peraire-Guitart. (2005). *Prácticas de biofarmacia y farmacocinética*. Barcelona.
- Drug bank. (Junio de 2020). Recuperado el Junio de 2020, de <https://www.drugbank.ca>
- Duan, J. Z., Riviere, K., & Marroum, P. (2011). In Vivo Bioequivalence and in Vitro Similarity Factor (f2) for Dissolution Profile Comparisons of Extended Release Formulations: How and When Do They Match? *Springer Science*, 28(5), 1144-1156.
- European Medicines Agency . (Agosto de 2003). Recuperado el Septiembre de 2020, de ICH Topic Q 1 A (R2). Stability Testing of new Drug Substances and Products : https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-r2-stability-testing-new-drug-substances-products-step-5_en.pdf
- European Medicines Agency. (1995). *ICH Topic Q 2 (R1). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* . Recuperado el Junio de 2020, de https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf
- FDA. (Septiembre de 2019). *U.S. Food and drug administration*. Recuperado el Junio de 2020, de CFR - Code of Federal Regulations Title 21. PART 320 -- Bioavailability and bioequivalence requirements: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=320.24>
- García, M. A., Soberón, E., Cortés, M., Rodríguez, R., Herrera, J. L., & Alcántara, A. (2002). *Métodos Analíticos Guía de Validación*. México: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C.
- Genaro, A. R. (2003). *Remington Farmacia* (Vol. 1). Buenos Aires: Medica Panamericana.
- Giri, B. R., Kwon, J., Vo, A. Q., Bhagurkar, A. M., Bandari, S., & Kim, D. W. (2021). *Pharmaceuticals*, 14(01).
- González, I., Fernández, C., Ruíz, A., & Bermejo, M. (2002). *Farmacia Sudamericana. Ensayos de disolución y sus correlaciones, In vitro-In vivo*. Santiago, Chile: Órgano Oficial de Difusión de la Federación Farmacéutica Sudamericana.

-
- Gray, V. A., Cole, E., Tomaa, J. M., Ghidorsi, L., Guo, J.-H., Han, J.-H., . . . Richa. (noviembre de 2014). Use of Enzymes in the Dissolution Testing of Gelatin Capsules and Gelatin-Coated Tablets—Revisions to Dissolution <711> and Disintegration and Dissolution of Dietary Supplements <2040>. *Dissolution Technologies*, 21(4), 6-19.
- Graya, V. A., Colea, E., Tomaa, J. M., & al, e. (2014). Use of Enzymes in the Dissolution Testing of Gelatin Capsules and Gelatin-Coated Tablets Revisions to Dissolution <711> and Disintegration and Dissolution of Dietary Supplements <2040>. *Dissolution Technologies*.
- IMSS. (julio de 2017). Recuperado el diciembre de 2021, de <http://www.imss.gob.mx/prensa/archivo/201707/203>
- Instituto Nacional de Salud Pública. (2000). *Encuesta Nacional de Salud • 2000. La salud de los adultos*. México: Secretaria de salud pública. Obtenido de www.insp.mx/ensa2000
- Jaiswal, P., Aggarwal, G., Leelakumari Harikumar, S., & Singh, K. (2014). *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 4, 195-206.
- Jitsuo, H., Issei, K., & Toshio, O. (enero de 2017). *Hypertension Research*, 40(1), 51-60.
- Kang, W. Y., Seong, S. J., Ohk, B., Gwon, R., Kim, B. K., La, S., . . . Lee, H. W. (2018). *Drug Design, Development and Therapy. Dovepress. Open access to scientific and medical research*(12), 545–553.
- Karalis, V., Symillides, M., & Macheras, P. (2012). Bioequivalence of Highly Variable Drugs: A Comparison of the Newly Proposed Regulatory Approaches by FDA and EMA. *Pharmaceutical Research*, 29(4), 1066-1077. doi:10.1007/s11095-011-0651-y
- Kayali, A. (1994). Bioequivalence evaluation by comparison of in vitro dissolution and in vivo absorption using reference equations. *Eur J Drug Metab Pharmacinet*, 271-1.
- Kostewicz, E. S., Abrahamsson, B., Brewster, M., & et.al. (2014). In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57, 342–366.
- Kundu, S., Nimmy, K., Saundray, R. S., Subham, R., Rajan, K., Sharon, A., & Animesh, G. (2018). *ACS OMEGA*, 15380–15388.
- Lu, J. X., Tupper, C., & Murray, J. (septiembre de 2020). Biochemistry, Dissolution and Solubility. *StatPearls*.
- Marianne E., G., Norm, C., & Xin-Hua, Z. (noviembre de 2014). Standards for the Uniform Reporting of Hypertension in Adults Using Population Survey Data:

-
- Recommendations From the World Hypertension League Expert Committee. *The Journal of Clinical Hypertension*, 16(11), 773-781.
- Meersch, A. v., Dechartres, A., & Ravaud, P. (2011). Quality of Reporting of Bioequivalence Trials Comparing Generic to Brand Name Drugs: A Methodological Systematic Review. *PLoS ONE*, 6(8), e23611. doi:10.1371/journal.pone.0023611
- Mills, K. T., Stefanescu, A., & He, J. (abril de 2020). The global epidemiology of hypertension. *Nature Reviews Nephrology*, 16(4), 223–237. doi:10.1038/s41581-019-0244-2
- Minkyung, o., Park, S.-E., Gh, J.-L., Young-Kyung, C., Eon-Jeong, S., kIM, E.-Y., & Kim, E.-Y. (2017). *Drug Design, Development and Therapy*(11), 3543-3550.
- Molina, J., Salazar, D., Hurtado, M., Cortés , A., & Domínguez-Ramírez, A. (2014). Comparative in vitro dissolution study of carbamazepine immediate-release products using the USP paddles method and the flow-through cell system. *Saudi Pharm J.*, 22(2), 141-7.
- Moon, S. J., Jeon, J.-Y., Jang, K., Yu, K.-S., Lim, Y., & Kim, M.-G. (2019). *Drug Design, Development and Therapy*(13), 2533–2542.
- Nalwade, S., Reddy, V. R., Rao, D. D., & Rao, I. K. (2011). *Scientia Pharmaceutica*(79), 69–84.
- Nalwade, S., Reddy, V. R., Rao, D. D., & Rao, I. K. (04 de enero de 2011). *Scientia pharmaceutica*, 69-84.
- Namita B. Prabhu, 1. A., Jain, S., Singh, P. P., Sawant, K., Rao, L., & Amin, P. D. (2008). Comparison of Dissolution Profiles for Sustained Release Resinates of BCS Class I Drugs Using USP Apparatus 2 and 4: A Technical Note. *AAPS PharmSciTech*, 9(3), 769-773.
- Nitin, B., Adhikrao, Y., Sachin, M., Rohan, K., Ashok, H., Sachin, S., & Sameer, N. (2014). A review on development of biorelevant dissolution medium. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 4(2), 140-148. Obtenido de <http://jddtonline.info/index.php/jddt/article/view/800>
- Oparil, S., Acelajado, M. C., Bakris, G. L., Berlowitz, D. R., Cífková, R., Dominiczak, A. F., . . . Whelton, P. K. (2019). Hypertension. *Nat Rev Dis Primers*(4), 18014. doi:10.1038/nrdp.2018.14
- P., M., Maillard, & Michel, B. (junio de 2007). *Vascular Health and Risk Management*, 3(3), 265-278.
- Paprskářová, A., Možná, P., Oga, E. F., Elhissi, A., & Alhnan, M. A. (2015). Instrumentation of Flow-Through USP IV Dissolution Apparatus to Assess Poorly

-
- Soluble Basic Drug Products: a Technical Note. *AAPS PharmSciTech*, 17(5), 1261-6.
- Picazo, A. R., Martínez-Martínez, M. T., Colón-Useche, S., Iriarte, R., Sánchez-Dengra, J., González, M., . . . Bermejo, M. (2018). *Molecular pharmaceuticals*(15), 2307–2315.
- PLM. (2020). Recuperado el diciembre de 2020, de <https://www.medicamentosplm.com/Home/productos/>
- Pubchem. (2020). *National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information*. Recuperado el diciembre de 2020, de Pubchem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- Pubchem. (mayo de 2020). *National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information*. Recuperado el junio de 2020, de Pubchem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- Radenkovic, M., Stojanović, M., Nešić, I. M., & Prostran, M. (2016). *Indian Journal of Medical Research*, 144(2), 154-168.
- Recio, D. C., Delgado, C. A., Ruano, L. O., & Fernández, A. C. (1999). Bioequivalencia. introducción a la correlación in vivo-in vitro. parte i. *Rev. Cubana Farm.*, 33(2), 137-42.
- Recio, D. C., Delgado, C. A., Ruano, L. O., & Fernández, A. C. (1999). Introducción a la correlación in vivo-in vitro. parte ii. *Rev. Cubana Farm.*, 33(3), 201-7.
- Rey, M. (2001). Bioequivalencia, biodisponibilidad y EFG. Algunas consideraciones. *Farmacia profesional*, 88-92.
- Roth, G. A., Johnson, C., Abajobir, A., Abd-Allah, F., Abera, S. F., Ahmed, G. A., . . . Tesf. (2017). Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *Journal of the american college of cardiology*, 70(1), 1-25. doi:10.1016/j.jacc.2017.04.052
- Rubio, K., Portilla, M., Fuentes, I., Aguilar, A., & Hernández, L. (2006). Estudios de perfiles de disolución, calorimetría diferencial de barrido y tamaño de partícula como elementos para determinar la claidad de materias primas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(4), 43-57.
- SEGOB. (2013). *Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013*. Diario Oficial de la Federación.
- Segura, J., & Ruilope, L. M. (12 de septiembre de 2013). A review of the benefits of early treatment. *Vascular Health and Risk Management*, 521-528.
- Son, H. Y., Chae, B. R., Choi, J. Y., Shin, D. J., Goo, Y. T., Lee, E. S., . . . Choi, Y. W. (2018). *PLOS ONE A Peer-Reviewed, Open Acces Journal*, 13(12), e0208339.

-
- Suzanne, O., Maria Czarina, A., Bakris, G. L., Berlowitz, D. R., Renata, C., Anna F., D., . . . Paul K., W. (abril de 2019). Hypertension. *Nature reviews. Disease primers*, 4(18014), doi:10.1038/nrdp.2018.14.
- Thomas, K., Karin, B., & Mirjam, K. (2020). *Journal of Medical Medicine*, 9(2), 561.
- Tsimihodimos, V., Gonzalez-Villalpando, C., Meigs, J. B., & Ferrannini, E. (marzo de 2018). Hypertension and diabetes: co-prediction and time trajectories. *Hypertension*, 71(3), 422-428. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10546
- United States Pharmacopeia, USP 37–NF 32. (2014).
- VADEMECUM . (enero de 2018). Recuperado el diciembre de 2020, de <https://www.vademecum.es>
- Vertzoni, M., Dressman, J., Butler, J., Hempenstall, J., & Reppas, C. (mayo de 2005). Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the in vivo dissolution of lipophilic compounds. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60, 413–417.
- Volonté, M. G., Escales, M. C., & Gorriti, C. (2005). Equivalencia Farmacéutica de comprimidos conteniendo Clorhidrato de Propanolol. *Acta Farm. Bonaerense*, 24(4), 538-42.
- WebMDRx. (Noviembre de 2020). *RxList*. Recuperado el Diciembre de 2020, de https://www.rxlist.com/-drug.htm#side_effects
- Wienen, W., Entzeroth, M., Meel, J. C., Stangier, J., Busch, U., Ebner, T., . . . Hauer, N. H. (2000). *Cardiovascular Drug Reviews*, 18(2), 127–154.
- Yong, Z., Meirong, H., Jianping, Z., & Shaofei, X. (2010). PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *computer methods and programs in biomedicine*(99), 306-314.
- Zhong, L., Zhu, X., Luo, X., & Weike. (2013). *AAPS PharmSciTech*, 14(2), 541–550.

PRODUCTOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Facultad
de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

A través de la Facultad de Farmacia

Hace constar que el/la:

L.F. Guadalupe Micaela Badillo Lugo

Participó en el ciclo de seminarios de la Facultad de
Farmacia con la ponencia:

**“Evaluación del comportamiento *in vitro* de los perfiles de
disolución de medicamentos conteniendo BRAG-II con fines de
correlación *in vitro* – *in vivo*”**

Cuernavaca, Morelos a 19 de abril de 2021

Dr. Efrén Hernández Baltazar
Director
Facultad de Farmacia

Dr. Sergio Alcalá Alcalá
Jefe de Posgrado
Facultad de Farmacia



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2021-04-20 10:40:43 | Firmante

GEsaArSBOfk9DBs6rGOT+uMwS3XdS2EC5sAQ73S/XL6HOjZcdoQITKNObc3udLCxSX9KzCdlGi/1ceoo/eF3HxEjzQfY8QEgfvWiyq12nBk+YCC/HZ2zwFF/OXEpm+Jwlv1qmwZeEXzEEAfK3BdzXJuyYnyak39E4WjYfDFuAJOtN126HtAiSjqVJ0u+M+D/RkSY29HJkWLefSOHjJTOmmidD2L0Sodt/MEndOilga3XhTrQg7M0u8NDI4tjMGpkL1ZQHuwOC6M1J5qq+1NP96B2qos7b7GjEavtubx/IsDykiLL+EB3eeUPBaG1dacwLkTt hTc2ie/om7U1jCQ==

EFREN HERNANDEZ BALTAZAR | Fecha:2021-04-20 11:18:56 | Firmante

ifK9rlPHTQxtMfuoPLnmXMmK9Ozy8zPpjqanbnBKdKn16n9NZvyyBrENZ+pM6ZMmDiMCKgpm9cS/uyWjtiKOUreZcPsD6DnD6gkFPiUOIF+Ho3GMTkVj+N6MSoKnoHlwJEen7Ey8TB5rNISnaiA+DzDNV/HBzNX YwTTToJg+DaZH3Yo06LvgCVAAYyFELI60jGdjaiTltcWuA65MrCH4/junCVMjYquPFdCqThG7619oBMcgJM8U/6e+TKdjW1TRv/e3K8FQivICYC8SBZNmdwFCjIKOmfbnQWCGVvNkBZnxi3J37ifZstPZ0ULay5QG2d4r pfBxvqZxd0sr7sobcuQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



SbGKg2

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Jgb1PWEgNNsJaCE4Lwcq0agyB0o1Dbsv>



XV

**Encuentro de Estudiantes
de Posgrado en Farmacia**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



La Facultad de Farmacia de la UAEM a través de su Secretaría de Investigación, Jefatura de Posgrado y Consejo Estudiantil de Posgrado en Farmacia

Otorga la presente

CONSTANCIA

A: Guadalupe Micaela Badillo Lugo, Dea Herrera Ruíz.

Por la **PRESENTACIÓN DEL TRABAJO LIBRE** titulado:

“ESTUDIO DE DISOLUCIÓN CON FLUJO COTINUO COMO HERRAMIENTA PARA ESTABLECER LA EQUIVALENCIA FARMACÉUTICA DE UN MEDICAMENTO ANTIHIPERTENSIVO”

en el **15^{vo} Encuentro de Estudiantes de Posgrado en Farmacia**

Celebrado de forma virtual el 29 de noviembre del 2021, Cuernavaca, Morelos

Dr. Efrén Hernández Baltazar
Director
Facultad de Farmacia

Dra. Dea Herrera Ruiz
Secretaría de Investigación
Facultad de Farmacia

Dr. Sergio Alcalá Alcalá
Jefe de Posgrado
Facultad de Farmacia

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DEA HERRERA RUIZ | Fecha:2021-12-09 08:50:12 | Firmante

ZviRiMLNQGSDrD2Bo3q/4prh7LEgDrPC09lrlh0sCxx0As+OEcWP6gAOT9YguhIN0KHAEsdaoJpSVchIDleHNTWsiTI972wt+JsWkqwwhdSNKxhwjYZOZH6swvvoA08ZBic9mXyAAS+aRnA+4/lyQL10LQXTqJLkh
mcc4W1sxgekD7UKjicUo8QTSnTnC9h4pcRGGgp61OXB4Ay2SZhpxXnZDD1HvN1DED7BvdiAZAUPOsEo4iRyuK1ULM7BKfgLnoEmfoNaRO3pDhgvUxu/mwT355sRnmsNDFG3dcy3RA1/EuYFyha+hSP27JsMF
Wc+bzltFh+eQ8lcVOCFppPZAQ==

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2021-12-09 09:23:54 | Firmante

Rcaxur7ZMZGPAzAQPuff+u5vr4OXUjn2Rj/DLQZuOM+vB1qnm5pdcyAr9SOcpqdi5SUITVOLTgeuKTjCW3wW41WEE0JbSN+UAgJKd1KPCkxVIZdS0hsHbe8VibZgbLiHRd3xAN+BaUc0aPR2uwB5MwBMNIQG6
KqTOD4/zllYr1vbDIY/YauWFqNYLpz6kdkIEfqAegTgulPpIPNvcJ24EXYXFJwBZWZs5G3M5V7Fo3ocLsg1pL6yxmcfB1RMG5SvTlewVwW/20qJ0/p4OxxRgZmzg1tz8x14oEg0mlHKhY8DTRwS8R/kLa2iLnl31u1
zPbhdDbFNR0P2GTu5A==

EFREN HERNANDEZ BALTAZAR | Fecha:2021-12-09 14:06:45 | Firmante

SGdEPQ3jposX3b9sCh1S7Z0rP/lzg7uDWEg9N5pAvdFt63rvoGA+/0L044DGmt0ZjNYSZ/jHYCqzRXFaywD+6wE47fbcFPQq+dIv68fRKD7fM4jbmw7vtSkvulkI5lcfEwhcskftCya7eYscYDIN5sJTwfKwPMlioyTCejvNI
YYy/6qZ5jvXgnXYxSNSw8b6cyHUoZ591iWRSGUau1m2UqQPp0qZf7Y9m1sXxVv5sVDFofovwKavVqWObGfEDN/kTmVGoJleqn96zqMMznwE9HeOPr8fhpT8svC4uBUf7MfQ9wEMLnCMRXNypV0vHEjD8djk2v
tNGTPq9/dsnJFQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[oQygp9VEF](https://efirma.uaem.mx/noRepudio/xYZzAPgSFtefFhW78fjKQuq60Edy6I8X)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/xYZzAPgSFtefFhW78fjKQuq60Edy6I8X>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Guadalupe Micaela Badillo Lugo

Título de la tesis: "Evaluación del comportamiento in vitro de los perfiles de disolución de un medicamento conteniendo BRAG-II con fines de correlación in vitro-in vivo"

Grado a obtener:

[X] Maestría en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Dea Herrera Ruíz

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

[X] Si se aprueba tal como se presenta

[] Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Firma del miembro del jurado

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DEA HERRERA RUIZ | Fecha:2022-11-13 21:57:49 | Firmante

ky3jxdN/csVSXJmLS32jjh2jexLPpFsCKz3jqzYsjO7fh9jDS8zyYSL8q5ox4uAVKlg03NPrM6eehZs6PYb47SPyS3HZ90Az9uXQQ9PigbyuNhnbeSVZUEQ9c/vBrdeK4u8v9zQem63krLTCRi6mf/j9paGJKx7z5X8UiFAclXqEui7yqJIT4oPHhNO1AvH628eRpRUw0mxfLt0aFRnGZbW+oi74kVxSDTXwcpWXgTqzTCM6WzgnFO5Y7rfxJ62hf9tldN8bWomOnp1BaGPMeOHtA30x1/9WHPe48gl5fcGpZKpBMUwGgcrs52QdL3Pf//hp3tV5SKKZoiEfwkP+A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



YIXABN7u9

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/h4ddpV8IfDpOtgG7Jcl5NJPI6RDTQyuE>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Guadalupe Micaela Badillo Lugo

Título de la tesis: "Evaluación del comportamiento in vitro de los perfiles de disolución de un medicamento conteniendo BRAG-II con fines de correlación in vitro-in vivo"

Grado a obtener:

[X] Maestría en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Jesús Rivera Islas

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

[X] Si se aprueba tal como se presenta

[] Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Jesús Rivera Islas

Firma del miembro del jurado

9 de noviembre 2002

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JESUS RIVERA ISLAS | Fecha:2022-11-09 13:12:38 | Firmante

skV4s8DennRjkTHBE3rL0eOZBdGLlutf4lmwrfhkpnzLaZuOScUunS1VLdgWQAhrm8gh7Fnjwf7cVUn4gXB4eUJToFC3hofdf1R/tSFMLzauAlFh7oWErMPs5XUgjSqqrsjhlPJo63V7Zyk58q0DGhetlE3DVAV7wFsY8XZTesQXjOSSlraxeoY5PEjGAJZ+8k37Qh8uU7mAc4zWjYpYQn20fvm0FOjdhQw46WO48RiYqbgDMqasRLEczSqr/ryXrOSC9n3VAb9PrxUk8yvE0Qs0FsNPisllkDFSCQqZeh1jppwG7Pw9+zJKsAl0COMGUSutX/Jci9hMWP6lVplBQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[5baLziyxA](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/DifgXs9KjQ7DrpsDpHJbCuRvVayyERFE>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Guadalupe Micaela Badillo Lugo

Título de la tesis: "Evaluación del comportamiento in vitro de los perfiles de disolución de un medicamento conteniendo BRAG-II con fines de correlación in vitro-in vivo"

Grado a obtener:

[X] Maestría en Farmacia

Miembro del jurado: M.F. Flor Magali Rodríguez Soto

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

[X] Si se aprueba tal como se presenta

[] Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

08/Nov/22

Firma del miembro del jurado

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

FLOR MAGALI RODRÍGUEZ SOTO | Fecha:2022-11-09 10:37:55 | Firmante

VHK22ZowwM9hVHe9nfPL183UOUagSF3Wmhq2NpgaRqOUJM6mb4pRVnUy/gQD2FDCIsdxvkcFWqI2Qi3F2JSaxN5Kdfe3IWE686Rz7UIFDd7LBySvPMRn/TYu/0nvHBMLD
GiKr9Vm3seFjCtvkbYhOfUSen4TSoyObZDkMy9xRC7HB6fthx939ZF7J6rl+0u0BuLuC2FKftRaEQ0wb92NIP4RkyMowgvGBbgK2fUY7iNohrqEpuaw8d6aaS+VN0qZqOmK4aRm2
neJxjU/76KPGBASDy85sQmiF1QFT9y/AvC/VZwgjZbvTSXtyhoUrCCSVvelySvrEnjJV8589iTgFw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



3H0YPtQFp

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/i7dV2czmwZqD2dez3MD6jIC8L0MOxJkl>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Guadalupe Micaela Badillo Lugo

Título de la tesis: "Evaluación del comportamiento in vitro de los perfiles de disolución de un medicamento conteniendo BRAG-II con fines de correlación in vitro-in vivo"

Grado a obtener:

[X] Maestría en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Juan Pablo Senosiain Peláez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

[X] Si se aprueba tal como se presenta

[] Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

08/Nov/22

Firma del miembro del jurado

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JUAN PABLO SENOSIAN PELÁEZ | Fecha:2022-11-10 14:56:30 | Firmante

rIVXrBTmL41v2TweesGv/Rz/lapqLWVC67rOw5r8/AiaNHwceQaQ19C/6rHFD+fWrLteAjiDISihl4RYPu2dtyb2HKBOh5qGMq/CloZkf2FINZVa8f0G39tR0PYTMhZkUKEHbRlXUT6K67aYDFX1ao5A4NLeChXca5BqodOdHj81JNJjch4Ky71W4Yqca3UZvk2YSd5X7h4aO9dWlIWfaJjYu5r+K0GawVzwAy0DECGNhwAKsbsxv2gLJ3MYJnr3kk00dTeXfiuH4xjAsrxjpBp+zefeLe4wZTKwuL+sXJZMhhdQnu7rqg74pE0B+xZe/z2gD4FCepHi0qjJz/mqw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[CpMTqDVrw](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/l8eg2QubUUKKiquNFqN2QP1OTzgLIQvg>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Guadalupe Micaela Badillo Lugo

Título de la tesis: "Evaluación del comportamiento in vitro de los perfiles de disolución de un medicamento conteniendo BRAG-II con fines de correlación in vitro-in vivo"

Grado a obtener:

[X] Maestría en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Julio César Rivera Leyva

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

[X] Si se aprueba tal como se presenta

[] Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

08/Nov/22

Firma del miembro del jurado

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JULIO CESAR RIVERA LEYVA | Fecha:2022-11-10 07:25:45 | Firmante

bwbJs4TJ+ZwKY+2PIJcw5EVWrdKhPoH9FZ6fJ3byuKBvSpHgaNSjwT/cqKfWwYQXYHVCPai8ph/x06FwsoeHc2V4tbk6rfrik+UZkVwmHyWqhmXNOJ56fiQUh9ISK/zTy5Kt66XNs95tY2oddTbrZ770kdY11LpCq1ixNwoCtyAlKVoy2Qk97P+ypu4JpZiX32fJr2m9KuL9KFYNuTW2K863dcYIkGQ0hQzZJYbYOPwTHvPWVBTBcaROw54A9QA7S6wu06EWBCVzRIP7cg/7FaVAMkqdz1Y2vOddUdYE1x2wx1amqrtnrvlBJKz8qJvDA5MORKNEuGq/PxSXXM+w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[Gy9cuoMdh](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ADOvSguZ6JXj1vLGa84tPGrW06LkxuPU>

