



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Comparación biofarmacéutica de productos multifuente de tabletas de liberación inmediata de sultamicilina, presentes en el mercado colombiano.**

**Álvaro Javier Sierra Valverde**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia,  
Bogotá, Colombia.

2019



# **Comparación biofarmacéutica de productos multifuente de tabletas de liberación inmediata de sultamicilina, presentes en el mercado colombiano.**

**Álvaro Javier Sierra Valverde**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias Farmacéuticas.**

Director:

PhD German Eduardo Matiz Melo.

Grupo de Investigación:

Sistema para Liberación Controlada de Moléculas Biológicamente Activas  
(SILICOMOBA)

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia,  
Bogotá, Colombia.

2019



*A mi Familia.*



## **Agradecimientos**

En primera instancia quisiera agradecer a Dios sus grandes bendiciones, a mi familia por su apoyo incondicional para lograr mi formación tanto en el ámbito personal como profesional.

A la Doctora Mary Trujillo, Profesora del departamento de Farmacia por su guía y respaldo durante la consecución de mis estudios en la Maestría en Ciencias Farmacéuticas.

Al Profesor del departamento de farmacia, Doctor German Matiz por su inmenso apoyo como director del presente trabajo.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Análisis Farmacéutico de la Universidad Nacional (LAFUN).

A la Universidad Nacional de Colombia, al Departamento de Farmacia y a los profesores quienes aportaron el conocimiento necesario para la realización del presente trabajo.

## Resumen.

La sultamicilina es un antibiótico derivado de la asociación química entre ampicilina y sulbactam, de amplio uso en la práctica clínica. En la actualidad en Colombia no existe una monografía oficial para el control de calidad de los productos formulados con sultamicilina, por esta razón en el presente trabajo se desarrolló y validó una metodología analítica HPLC-UV para la cuantificación de sultamicilina en tabletas de liberación inmediata. Esta metodología se utilizó para evaluar el desempeño de la liberación *in vitro* del principio activo mencionado. Se evaluaron las características biofarmacéuticas de tres productos multifuente frente al producto innovador, encontrándose que algunos de los productos evaluados exhibían diferencias significativas en cuanto a los resultados obtenidos. Adicionalmente, se encontró que solamente uno de los productos evaluados resultó poseer similitud estadística con el producto innovador en cuanto a su perfil de liberación *in vitro*.

**Palabras clave:** Sultamicilina, Metodología analítica Características biofarmacéuticas, Comparación estadística, HPLC.

## Abstract

Sultamicillin is an antibiotic derived from the chemical association between ampicillin and sulbactam, widely used in clinical practice. At present in Colombia there is no official monograph for the quality control of products formulated with sultamicillin, for this reason, an HPLC-UV analytical methodology for the quantification of sultamicillin in immediate-release tablets was developed and validated. This methodology was used to evaluate the performance of the *in vitro* release of the active ingredient mentioned. The biopharmaceutical characteristics of three multi-source products were evaluated against the innovative product, finding that some of the products evaluated exhibited significant differences in terms of the results obtained. Additionally, it was found that only one of the products evaluated proved to have statistical similarity with the innovative product in terms of its *in vitro* release profile.

**Keywords:** Sultamicilin, Analytical methodology Biopharmaceutical characteristics, Statistical comparison, HPLC.



# Contenido

	Pág.
Resumen.....	II
Lista de figuras .....	3
Lista de tablas.....	4
Introducción.....	6
<b>1. Capítulo 1. Generalidades. ....</b>	<b>1-9</b>
1.1 . Productos innovadores y multifuente. ....	1-9
1.2 Características Biofarmacéuticas .....	1-12
1.2.1. Sistema de clasificación Biofarmacéutico. ....	1-16
1.2.2. Estudios de liberación <i>in vitro</i> .....	1-19
1.2.3. Evaluación estadística de los perfiles. ....	1-20
1.3 Validación de métodos analíticos. ....	1-21
I. Diseño.....	1-22
II. Desarrollo.....	1-22
III. Validación .....	1-22
1.4 Sultamicilina.....	1-30
1.4.1 La Sultamicilina en el mercado colombiano. ....	1-40
<b>2. Objetivos. ....</b>	<b>2-43</b>
<b>3. Metodología .....</b>	<b>3-44</b>
3.1 Instrumentos y equipos.....	3-45
3.2 Sustancias de referencia y reactivos. ....	3-46
3.3 Métodos.....	3-47
3.3.1. Muestras. Criterios de selección de productos evaluados. ....	3-47
3.3.2. Desarrollo de la metodología analítica para la valoración de sultamicilina presente en tabletas de liberación inmediata. ....	3-48
3.3.3. Validación de la metodología analítica.....	3-49
3.3.3.1. Selectividad .....	3-49
3.3.3.2. Linealidad .....	3-50
3.3.3.3. Rango.....	3-53
3.3.3.4. Precisión.....	3-53
3.3.3.5. Exactitud.....	3-55
3.3.3.6. Estabilidad.....	3-56
3.3.3.7. Sistema de idoneidad.....	3-57
3.3.4 Evaluación de características Biofarmacéuticas.....	3-57

3.3.5	Perfiles de disolución .....	3-60
3.3.6	Evaluación estadística.....	3-62
<b>4.</b>	<b>Capítulo 4. Resultados y discusión. ....</b>	<b>4-64</b>
4.1	Desarrollo y validación de la metodología analítica para la valoración de tabletas de sultamicilina.....	4-64
4.1.1	Obtención de espectro de absorción molecular. ....	4-64
4.2.	Validación de la metodología analítica para la valoración de sultamicilina. ....	4-71
4.2.1.	Selectividad.....	4-71
4.2.2.	Linealidad.....	4-76
4.2.3.	Precisión. ....	4-80
4.2.4.	Exactitud. ....	4-83
4.2.5.	Rango. ....	4-85
4.2.6.	Estabilidad .....	4-85
4.2.7.	Sistema de idoneidad. ....	4-86
4.3	Evaluación de características Biofarmacéuticas.....	4-87
4.4	Perfiles de disolución. ....	4-95
4.5	Evaluación estadística. ....	4-104
<b>V.</b>	<b>Capítulo 5. Conclusiones y Recomendaciones .....</b>	<b>111</b>
5.1.1.	Conclusiones. ....	111
<b>A.</b>	<b>Anexo: Preparación de muestras.....</b>	<b>115</b>
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>121</b>

## Introducción

---

### Lista de figuras

Figura 1 Estructura química de la ampicilina.....	1-31
Figura 2 Estructura química del sulbactam. ....	1-32
Figura 3. Estructura química de la sultamicilina .....	1-34
Figura 4. Reacción de hidrolisis de la sultamicilina. ....	1-34
Figura 5 Solubilidad de diferentes sales de sultamicilina. ....	1-39
Figura 6.Espectro de absorción molecular EAM de Sultamicilina Tosilato 0,1 mg/mL.....	4-64
Figura 7.Cromatograma de Sultamicilina Tosilato 0.1 mg/mL 80: 20 ACN: Buffer Fosfato pH 3.0 1 mL / min .....	4-67
Figura 8.Cromatograma de Sultamicilina Tosilato 0.1 mg/mL 70:30 Buffer Fosfato pH 3.0: ACN Flujo 1 ml/ min. ....	4-68
Figura 9.Cromatograma de Sultamicilina Tosilato 0.1 mg/mL 60:40 Buffer Fosfato pH 3.0: ACN flujo 1.2 mL / min. ....	4-69
Figura 10.Cromatograma de Sultamicilina Tosilato 0.1 mg/mL 65:35 Buffer Fosfato pH 3.0: ACN flujo 1.4 mL / min. ....	4-69
Figura 11.Cromatograma de Sultamicilina Tosilato 0.1 mg/mL 65:35 Buffer Fosfato pH 3.0: ACN TEA flujo 1.4 mL / min. ....	4-70
Figura 12.Pureza de pico Sultamicilina tosilato material de referencia en fase móvil. ....	4-74
Figura 13. Pureza de pico Sultamicilina tosilato tabletas en fase móvil. ....	4-74
Figura 14.Pureza de pico Sultamicilina tosilato tabletas en pH 1,2.....	4-74
Figura 15.Pureza de pico Sultamicilina tosilato tabletas en pH 4,5.....	4-75
Figura 16.Pureza de pico Sultamicilina tosilato tabletas en pH 6,8.....	4-75
Figura 17.Isograma (longitud de onda vs tiempo) sultamicilina tosilato 0.1 mg / mL.....	4-76
Figura 18.Curva de regresión para el sistema. ....	4-77
Figura 19.Curva de regresión para el método.....	4-78
Figura 20. Perfil lote 1 pH 1,2.....	4-97
Figura 21.Perfil lote 2 pH 1,2.....	4-97
Figura 22.Perfil lote 1 pH 4,5.....	4-98
Figura 23.Perfil lote 2 pH 4,5.....	4-98
Figura 24.Perfil lote 1 pH 6,8.....	4-99
Figura 25.Perfil lote 2 pH 6,8.....	4-99
Figura 26. Área bajo la curva (ABC) para los dos lotes de cada uno de los productos evaluados en tres pH diferentes. ....	4-100
Figura 27.Variación encontrada para los cuatro productos en cada uno de los pH evaluados. Las diferencias entre las áreas bajo la curva (ABC) entre marcas se determinaron mediante análisis de varianza (Anova) y prueba de Tukey <i>post hoc</i> . $p < 0,05$ se consideraron significativas.....	4-102
Figura 28.Comportamiento del ABC exhibido por cada producto en tres valores de pH diferentes. ....	4-103

Figura 29. Comparación de los resultados encontrados.....	4-106
-----------------------------------------------------------	-------

## Lista de tablas

Tabla 1. Parámetros funcionales importantes para validar diferentes tipos de procedimientos analíticos.....	1-26
Tabla 2 Elementos requeridos para la validación según USP. (USP, 2018) .....	1-27
Tabla 3 Características fisicoquímicas de la sultamicilina tosilato.....	1-35
Tabla 4 Estabilidad de sultamicilina tosilato di hidrato en solución.....	1-38
Tabla 5. Precios de venta (en pesos colombianos) comerciales e institucionales por tableta de 325 mg de sultamicilina presentes en el mercado colombiano.....	1-41
Tabla 6. Identificación, precio y fecha de vencimiento de los productos bajo estudio.....	3-48
Tabla 7. Puntos establecidos para la evaluación de la linealidad y rango de la metodología analítica .....	3-50
Tabla 8. Criterios de aceptación para la evaluación estadística de linealidad.....	3-52
Tabla 9. Condiciones de disolución según farmacopea japonesa. (Sciences, 2018-2019).....	3-59
Tabla 10. Condiciones de disolución propuestas.....	3-60
Tabla 11. Condiciones de disolución experimentales para la obtención de los perfiles de disolución.(WHO, 2015) .....	3-61
Tabla 12. Condiciones cromatografías para la cuantificación de sultamicilina presente en tabletas, según farmacopea japonesa XVII. ....	4-67
Tabla 13. Cromatogramas de correspondientes a muestras de sultamicilina tosilato 0,1 mg/ mL, sometidas a condiciones de estrés.....	4-72
Tabla 14. Resultados de linealidad para el sistema y el método.....	4-76
Tabla 15. Resultados de las pruebas estadísticas para evaluar la linealidad.....	4-78
Tabla 16. Resultados de la precisión instrumental. Inyecciones sucesivas de sultamicilina material de referencia certificado 0,1 mg / mL .....	4-80
Tabla 17. Resultados de la repetibilidad del método.....	4-81
Tabla 18. Resultados de la precisión intermedia.....	4-82
Tabla 19. Evaluación estadística de la precisión intermedia. Suma de cuadrados de cada factor evaluado.....	4-82
Tabla 20. Evaluación estadística de la precisión intermedia. ANOVA de la precisión.....	4-82
Tabla 21. Excipientes y proporciones utilizados para realizar la exactitud por el método del placebo cargado.....	4-83

## Introducción

---

Tabla 22.Resultados de porcentaje de recuperación en tres niveles de concentración. ....	4-84
Tabla 23.Resultados de las pruebas estadísticas para evaluar la exactitud. ....	4-84
Tabla 24.Resultados de porcentaje de degradación de sultamicilina tosilato en solución 0,1 mg/ mL después de 5 horas. ....	4-85
Tabla 25.Resultados del sistema de idoneidad. ....	4-86
Tabla 26.Resultados de la prueba de descripción y características organolépticas. ....	4-87
Tabla 27. Resultados del análisis dimensional. ....	4-88
Tabla 28.Resultados encontrados referentes al contenido de sultamicilina por producto y lote evaluado. ....	4-88
Tabla 29.Resultados de fuerza de ruptura encontrados. ....	4-90
Tabla 30.Resultados de la prueba de uniformidad de unidades de dosificación. ...	4-91
Tabla 31. Resultados de las pruebas de disolución en cada una de las condiciones evaluadas. ....	4-93
Tabla 32.Resultados de liberación (%) en pH 1,2. ....	4-95
Tabla 33.Resultados de liberación (%) en pH 4,5. ....	4-95
Tabla 34.Resultados de liberación (%) en pH 6,8. ....	4-96
Tabla 35.Resultados de área bajo la curva y eficiencia de disolución para cada producto evaluado. ....	4-100
Tabla 36.Resultados de la prueba t: evaluación de variabilidad interlote. ....	4-101
Tabla 37. Valores de f2 calculados para cada producto evaluado. ....	4-104
Tabla 38.Valores de volumen y concentración requeridos para la preparación de la curva de calibración, a partir de la solución madre de sultamicilina tosilato. ....	116
Tabla 39.Cantidades de sultamicilina tosilato y excipientes. ....	118

## **Introducción.**

Según la OPS los medicamentos genéricos surgen como una alternativa costo efectiva con el fin de dar una mayor accesibilidad y disponibilidad de medicamentos, a un menor costo. En Colombia se comercializan una gran cantidad de medicamentos genéricos, los cuales son producidos bajo las pautas de buenas prácticas de manufactura (BPM), garantizando de este modo el cumplimiento de parámetros de calidad establecidos para los productos farmacéuticos por el ente regulador nacional.

Dentro de los productos genéricos encontrados en el mercado colombiano y de mayor demanda en la práctica clínica, se encuentran los productos formulados con sultamicilina ; la sultamicilina es un profármaco producto de la asociación química mediante un doble éster entre la ampicilina, un antibiótico betalactámico de amplio espectro y el sulbactam, un inhibidor de la actividad de las betalactamasas bacterianas.(Rogers et al., 1983) Una vez absorbida la sultamicilina mediante la acción de esterasas se escinde en ampicilina y sulbactam en cantidades equimolares. La sultamicilina provee mejoras en cuanto a biodisponibilidad oral y actividad antibacteriana de los fármacos

## Introducción

---

constituyentes (Betrosian & Douzinas, 2009). Dentro de los productos encontrados en el mercado colombiano es posible encontrar tabletas con o sin recubrimiento, suspensiones y polvos para reconstituir. El precio de la sultamicilina oscila entre los 600 pesos hasta casi 8000 pesos por tableta, dependiendo el laboratorio productor. (MINSALUD, 2018)

Actualmente en Colombia no existe una monografía oficial para el control de calidad de las tabletas de sultamicilina, por lo cual se hizo necesario desarrollar y validar una metodología analítica para la cuantificación y determinación de los perfiles de liberación *in vitro* de sultamicilina presente en tabletas de liberación inmediata. Además, se evaluaron las características biofarmacéuticas y cinética de liberación *in vitro* de tres productos frente al producto innovador, de tabletas de liberación inmediata de sultamicilina 375 mg, comercializadas en Colombia, con el fin de establecer su cumplimiento respecto a criterios de calidad y desempeño biofarmacéutico *in vitro*.



# 1. Capítulo 1. Generalidades.

## 1.1. Productos innovadores y multifuente.

Un producto innovador es aquel preparado farmacéutico al que primero se le ha concedido la autorización para ser comercializado y que se le ha protegido comercialmente otorgándole patente por el producto desarrollado. Además, es el producto que ha demostrado con certeza eficacia y seguridad. Los gastos a los que incurre el laboratorio que fabrica el producto innovador, tanto de investigación, desarrollo y publicidad, hacen que en el costo del producto sea cargado el valor de la inversión realizada, razón por la cual el precio de estos productos es mayor al ser comparado con los productos competidores.(Claudia Patricia Vacca González, **2006**; IMS, 2015; WHO, 2015)

Los productos genéricos o como los denomina la Organización Mundial de la Salud (OMS) en las guías, *Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability* (OMS). Los productos multifuente, son aquellos preparados farmacéuticos que se configuran como un equivalente o una alternativa farmacéutica, dichos productos pueden o no ser

equivalentes terapéuticos. Si se demuestra la equivalencia terapéutica, entonces se dice que los productos son intercambiables.(WHO, 2015)

OMS define como equivalentes farmacéuticos a dos productos que contienen la misma cantidad molar del principio activo, en la misma forma farmacéutica, si cumple con estándares comparables y si están destinados a ser administrados por una misma vía. Una alternativa farmacéutica posee casi los mismos requerimientos que un equivalente farmacéutico, sin embargo, dos productos son alternativas farmacéuticas si poseen la misma cantidad de principio activo y ruta de administración, pero difieren en la forma farmacéutica (cápsulas o tabletas) y además en la forma química del principio activo; diferentes sales o ésteres del mismo principio activo. (WHO, 2015)

Es importante aclarar que demostrar que dos productos son alternativas o equivalentes farmacéuticos no implica necesariamente que se ha demostrado equivalencia terapéutica, lo anterior debido a diferencias en los excipientes utilizados en la formulación, procesos tecnológicos involucrados en la fabricación y algunas otras variables que pueden llevar a diferencias en el desempeño del producto.(OPS, 2011; WHO, 2015)

La equivalencia terapéutica se da cuando dos productos son alternativas o equivalentes farmacéuticos y posterior a la administración de una misma dosis de estos, se presentan esencialmente los mismos efectos en términos de eficacia y seguridad. La equivalencia terapéutica puede ser demostrada mediante ensayos *in vivo* o *in vitro*.(WHO, 2015)

---

Los productos multifuente son productos que entran al mercado después de que ha vencido la patente del producto innovador. Estos productos son más económicos debido a que no se grava el producto con los costos derivados de la investigación, desarrollo o pago de derechos de uso, además se conoce que dichos productos no invierten significativas sumas de dinero en publicidad, tal como lo hace el producto innovador. Lo anterior hace que el producto multifuente se configure como una alternativa económica más favorable al ser comparados con el producto innovador.(IMS, 2015; OPS, 2011)

Los productos multifuente deben cumplir con los mismos estándares de calidad, seguridad y eficacia que posee el producto innovador. En Colombia el ente regulador es el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), dicha entidad es la encargada de vigilar el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), en las cuales se incluye tanto el cumplimiento de los requerimientos de calidad como la posible intercambiabilidad del producto farmacéuticos (OPS, 2011). El INVIMA refiere que aproximadamente el 80 % de los medicamentos comercializados en el país son productos multifuente a los cuales dicha entidad vigila en cuanto al cumplimiento de BPM por parte de los laboratorios fabricantes, con el fin de garantizar de que los productos multifuente comercializados sean seguros, eficaces y de la calidad requerida.(INVIMA)

## 1.2 Características Biofarmacéuticas

Los productos multifuente o genéricos se constituyen como una alternativa económicamente más favorable al ser comparadas con las formulaciones innovadoras(OPS, 2011). Sin embargo, para establecer su posible equivalencia farmacéutica es necesario realizar estudios comparativos, evaluando características biofarmacéuticas que permitan establecer este hecho (WHO, 2015). La denominación ensayos biofarmacéuticos involucran aquellos realizados con el fin de comprobar que los productos evaluados cumplan, en términos de: identidad, contenido, uniformidad de dosis, ensayo de disolución y perfiles de disolución los requerimientos de calidad establecidos. (Franco-Ospina, Matiz-Melo, & Pájaro-Bolívar, 2012)

Las características biofarmacéuticas descritas se definen a continuación, de acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) indicando para cada una de ellas el motivo por el cual se determinan. (USP, 2018)

Descripción.

En una monografía identifica la presencia de un fármaco en un producto terminado y el intervalo en el que en el se encuentra, además de información que se considere relevante; estabilidad, posible impurezas etc. No obstante, existe información tal como: forma, tamaño, color etc., que ayuda a la identificación del producto en cuestión y que es requerida con fines de registro. La descripción es una determinación visual de las características que presenta el producto a evaluar.

## Identidad

Este tipo de ensayos se lleva a cabo para establecer con certeza la identidad del analito o sustancia evaluada, según la naturaleza del analito es posible establecer su identidad mediante la aplicación de métodos tanto instrumentales o no instrumentales. Los ensayos de identidad deben estar en la capacidad para discriminar al analito de interés de sustancias estructuralmente relacionadas y que posiblemente se encuentren en la muestra.

Es posible determinar la identidad de un analito, si este es analizado mediante cromatografía, comparando los tiempos de retención del analito frente a los tiempos de retención obtenidos para un material de referencia certificado del analito en cuestión, analizado bajo las mismas condiciones cromatográficas.

## Contenido

Este análisis se aplica para determinar la cantidad presente de principio activo en una forma de dosificación; comúnmente se conoce como potencia y se expresa en porcentaje de la sustancia encontrado.

## Fuerza de ruptura

Determina la integridad mecánica de la tableta, se evalúa determinando cual es la fuerza requerida para causar que la tableta presente una ruptura en un plano específico. Usualmente en el lenguaje farmacéutico a esta característica se le conoce como dureza, sin embargo, esta denominación puede llevar a confusión ya

que, en ámbito de la ciencia de materiales, la dureza implica determinar la fuerza requerida para la indentación de una sonda sobre un material específico.

Uniformidad de dosis.

Este análisis pretende establecer que la cantidad presente de principio activo dentro de cada unidad de dosificación sea uniforme y que se encuentre cercano al valor declarado por el fabricante para cada lote de producción. Dependiendo de la cantidad del fármaco presente y el peso final de la unidad de dosificación el ensayo de uniformidad es posible determinarlo mediante el uso de dos metodologías, a saber: variación de peso o uniformidad de contenido.

El ensayo de uniformidad de contenido se realiza si la cantidad del activo presente es menor de 25 mg o representa menos del 25 % del peso total de la tableta; en caso contrario se aplica el método de variación de peso para determinar la uniformidad de dosis.

Ensayo de disolución

Este ensayo permite evaluar la liberación del fármaco a partir de la unidad de dosificación, bajo condiciones que simulen el ambiente al que será sometido el producto cuando se dé su uso propuesto. Si la forma farmacéutica es de liberación inmediata; se requiere solo un tiempo de muestreo, mientras que para formulaciones de liberación modificada pueden requerirse hasta tres o más tiempos de muestreo.

## Perfiles de disolución

Los perfiles de disolución permiten evidenciar la liberación del fármaco en un medio y bajo condiciones hidrodinámicas específicas, a través de un intervalo de tiempo. Este tipo de estudio determina la cinética de liberación *in vitro* y además permite la comparación en términos de desempeño de diferentes formulaciones; como por ejemplo comparar productos innovadores frente a productos multifuente.

El conocimiento deficiente acerca de los medicamentos multifuente ha suscitado el ambiente de incertidumbre actual respecto la adquisición y el uso de los mismos; dicha incertidumbre se basa en aspectos como la falta de armonización en cuanto a la definición de medicamento genérico, la ausencia de reglamentación clara aplicable a este tipo de productos, los escasos incentivos para la oferta de los productos multifuente por parte de los productores, la baja aceptación de los medicamentos genéricos por parte de los usuarios, prescriptores y comunidad en general, anudado a la carencia de conocimiento respecto a las características y beneficios de los productos multifuente (Claudia Patricia Vacca González, 2006; OPS, 2011). Con el fin de subsanar esta situación cobra importancia el desarrollo de estudios biofarmacéuticos *in vitro*, los cuales proveen evidencia respecto a la calidad y el desempeño de los medicamentos.

Debido a lo anteriormente expuesto se hacen necesarios los estudios comparativos entre medicamentos multifuente, competidores o genéricos frente a un medicamento de referencia (comparador). Este último se considera como el

producto que ha cumplido con todas las etapas que implican el desarrollo de un nuevo fármaco y de la forma farmacéutica específica que lo contiene, lo cual asegura la consecución y demostración de seguridad y eficacia en este producto. (OMS, 2001).

Mediante el Anexo 7 del informe 49 del año 2015 de la OMS y la Resolución 1124 de 2016 del Ministerio de Salud y Protección Social en Colombia, se genera el marco teórico en el cual se basa la evaluación de características biofarmacéuticas con el fin de asegurar que los productos multifuente poseen la calidad, seguridad y eficacia requeridas. (Colombia, 2016; WHO, 2015) La evaluación de las características biofarmacéuticas, específicamente los perfiles de disolución, se da con base en pilares científicos bien establecidos, uno de ellos es el sistema de clasificación biofarmacéutica, propuesto por Amidon en 1995 (Amidon, Lennernas, Shah, & Crison, 1995; WHO, 2015)

### **1.2.1. Sistema de clasificación Biofarmacéutico.**

El sistema de clasificación biofarmacéutica (BSC)(Amidon et al., 1995) se configura como un método de clasificación de los principios activos, basados en la solubilidad en agua y la permeabilidad intestinal que estos presentan. Cuando además de los parámetros previamente expuestos, se añaden estudios de disolución de los productos y una examinación exhaustiva y crítica de los excipientes que constituyen al medicamento, se tienen en cuenta los cuatro factores principales que gobiernan el proceso de absorción en términos de velocidad y cantidad. El

desarrollo y aplicabilidad del BSC se enmarca en formas de dosificación sólidas de liberación inmediata.

El BCS clasifica a los fármacos en 4 categorías así:

- Clase 1

Fármacos que poseen alta solubilidad y alta permeabilidad. Para los cuales la bioexcención es posible.

- Clase 2

Fármacos que poseen baja solubilidad y alta permeabilidad. Para los cuales la bioexcención de la biodisponibilidad no es posible actualmente.

- Clase 3

Fármacos que poseen alta solubilidad y baja permeabilidad. Para los cuales la bioexcención de la biodisponibilidad se considera posible.

- Clase 4

Fármacos que poseen baja solubilidad y baja permeabilidad. Para los cuales la evaluación *in vitro* de la biodisponibilidad no se considera posible y se requieren necesariamente de estudios *in vivo* para la evaluación de biodisponibilidad.

Dependiendo de la solubilidad y la permeabilidad del fármaco, de la naturaleza de los excipientes constituyentes de la forma farmacéutica y de las características de

disolución, el BSC permite reemplazar los estudios de bioequivalencia *in vivo* por estudios *in vitro*, a este proceso se le conoce como bioexención (Colombia, 2016)

La aplicación de bioexención se da para ciertas formas farmacéuticas que cumplan con los criterios establecidos por el BSC. La ventaja que exhiben los estudios *in vitro* es la de disminuir los elevados costos y dificultades éticas derivadas de un estudio *in vivo*. Las formas farmacéuticas que contengan un principio activo de estrecho margen terapéutico no son elegibles para ser bioexentas según BSC.

Bajo el BSC se tienen entonces que definir conceptos tales como solubilidad o velocidad de disolución que se adapten y apliquen al contexto en cuestión, es por ello que BSC define que existen principios activos que presentan:

**Alta solubilidad:** Se considera un principio activo altamente soluble cuando la mayor dosis terapéutica se disuelve en 250 mL o menos de agua. Dicho valor se debe determinar a 37°C.

**Alta permeabilidad:** Una alta permeabilidad del principio activo se da cuando la extensión de absorción en humanos es del 85% o más basado en determinaciones tales como balances de masa o en comparación con una dosis intravenosa. Existen numerosos métodos aceptados por la OMS para determinar la permeabilidad.

Las características de la sultamicilina hacen que esta molécula se encuentre en la categoría clase 2 según la clasificación biofarmacéutica, debido a que presenta baja solubilidad y una alta permeabilidad a las membranas biológicas, (Ono,

---

Tomono, Ogihara, Terada, & Sugano, 2016) por lo cual no es una molécula para la cual se pueda aplicar actualmente bioexención con fines regulatorios.

### **1.2.2. Estudios de liberación *in vitro*.**

Dentro de los factores a evaluar según BCS se encuentran los perfiles de liberación *in vitro*, usados únicamente en el ámbito del desarrollo de productos, sin embargo, en años recientes este tipo de ensayos ha surgido como un sustituto para demostrar equivalencia para ciertas formas farmacéuticas. (WHO, 2015)

Las similitudes entre los perfiles de disolución de formas farmacéuticas sólidas de administración oral y que contienen un principio activo con propiedades adecuadas, junto con estudios de la composición de los excipientes y análisis de riesgo beneficio, pueden ser usados como criterios para proveer la posible intercambiabilidad de productos multifuente con un producto comparador. El informe 49 en el anexo 7 provee las condiciones específicas en las cuales el ensayo de disolución debe ser llevado a cabo sometiendo bajo las mismas condiciones a los productos a evaluar:

- ✓ Se deben evaluar mínimo 12 unidades de producto.
- ✓ Un mínimo de tres puntos (excluyendo el cero) deben ser incluidos, dichos puntos deben ser los mismos para el producto multifuente como para el comparador.
- ✓ Los intervalos de muestreo deben ser cortos

- ✓ El minuto 15 es el tiempo crítico en el cual se determina si el producto es de disolución muy rápida y determina si f2 debe ser calculado.
- ✓ El estudio se realiza en al menos tres medios, los cuales asemejan el pH fisiológico encontrado en el tracto gastrointestinal; pH 1,2 HCl 1,0 M, buffer pH 4,5 y buffer pH 6,8.
- ✓ Si tanto los perfiles del producto multifuente y el comparador muestran una disolución de más del 85% en 15 minutos, los perfiles se consideran similares y no se requiere realizar ningún cálculo matemático para determinar similitud.

### **1.2.3. Evaluación estadística de los perfiles.**

La similitud de los perfiles de disolución es posible determinarla mediante el uso del factor de similitud f2 definido como:

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

En donde:

Rt: Cantidad disuelta del fármaco del producto comparador.

Tt: Cantidad disuelta del fármaco del producto multifuente.

Si el valor de f2 resulta estar entre 50 y 100, la diferencia entre los perfiles es inferior al 10 %, y se considera que los perfiles de disolución son similares.

---

## 1.3 Validación de métodos analíticos.

La USP define la validación de un método analítico como el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que se cumplen las características de desempeño requeridas para la aplicación del método. Las características o parámetros típicos usados en la validación de metodologías se listan a continuación:(Rojas, 2017; USP, 2018)

- ✓ Exactitud.
- ✓ Precisión.
- ✓ Especificidad.
- ✓ Límite de detección.
- ✓ Límite de cuantificación.
- ✓ Linealidad.
- ✓ Rango.
- ✓ Robustez.

La finalidad de validar una metodología analítica es la de proporcionar un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico y por ende en la calidad de los resultados analíticos, derivados de la aplicación del método propuesto y validado. (Rojas, 2017)

Generalmente las etapas que demandan el desarrollo y validación de una metodología analítica son las siguientes:

## I. Diseño

Se realiza una revisión bibliográfica con el fin de conocer las propiedades fisicoquímicas del fármaco (analito); como, por ejemplo, la estabilidad, solubilidad, y posibles interferentes.

## II. Desarrollo

El objetivo de esta etapa es la de generar un procedimiento analítico optimizado y con la mayor eficiencia posible con el fin de aplicarlo para una actividad específica; como por ejemplo para la cuantificación del fármaco presente en el medicamento.

## III. Validación

Se considera como la etapa donde se evalúan mediante ensayos de laboratorio los parámetros propuestos para demostrar la idoneidad del método analítico.

### Tipos de validación

Dependiendo de los datos disponibles y/o los cambios realizados a las metodologías analíticas tenemos tres tipos de validación, a saber:

- ✓ Validación prospectiva: Se denomina así al proceso de validar una metodología analítica nueva.
- ✓ Validación retrospectiva: Cuando se poseen datos históricos y estos se utilizan para probar la idoneidad del método analítico.
- ✓ Revalidación: Debido a cambios introducidos en las condiciones del método, se hace necesario validar parcialmente el método analítico.

Como se ha visto, la validación de las metodologías analíticas requiere la evaluación de ciertos parámetros de validación, los cuales se definen a continuación según USP(USP, 2018):

**Exactitud:**

La exactitud de un procedimiento analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante esa metodología analítica específica y un valor que se considera valor verdadero.

**Precisión.**

La precisión de un procedimiento analítico se define como el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento analítico repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. Dependiendo el número de actores involucrados es posible tener tres niveles de precisión:

Repetibilidad: Indica la variación obtenida al ejecutar el análisis de manera sucesiva, bajo las mismas condiciones; es decir, utilizando, tanto el mismo instrumento, analista, reactivos, durante el mismo día. Este nivel de precisión nos permite evaluar el error puro de la metodología analítica propuesta.(Rojas, 2017). La repetibilidad de un procedimiento analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa; coeficiente de variación %CV, de una serie de mediciones.

Precisión intermedia: Evalúa la variación obtenida al ejecutar el análisis dentro de un mismo laboratorio, durante el día a día, donde se dan cambios en factores importantes como: analistas, instrumentos y los días en los que se lleva a cabo el análisis. Mediante la aplicación del análisis de varianza ANOVA es posible determinar cuál de los factores evaluados aporta mayor variabilidad al procedimiento analítico.(Rojas, 2017)

Reproducibilidad: La reproducibilidad evalúa la capacidad del método para arrojar resultados similares cuanto se evalúa una misma muestra, pero en diferentes laboratorios. Se considera como el nivel máximo de precisión de una metodología analítica.(Rojas, 2017)

### **Selectividad / especificidad.**

Se define como la capacidad del método analítico para determinar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz. Se reserva el término especificidad cuando se trata de una metodología totalmente selectiva. Existen varios métodos para determinar la selectividad, uno de los métodos utilizado con mayor frecuencia es la de HPLC, junto con detector de arreglo de diodos (DAD).(Rojas, 2017; USP, 2018)

**Linealidad.**

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida a la concentración de analito en muestras dentro de un intervalo dado. (Rojas, 2017; USP, 2018)

**Rango.**

Se define como el intervalo en el que el procedimiento analítico es capaz de generar un adecuado nivel de precisión, exactitud y linealidad. (Rojas, 2017; USP, 2018)

**Robustez.**

USP define robustez como la capacidad del método para permanecer inalterado tras ser sometido a pequeños cambios o variaciones, como por ejemplo variaciones en pH, flujo, temperatura, volumen de inyección, etc. La USP no considera a la robustez como un parámetro de validación, únicamente define el termino, algunos autores indican que es una parte importante en el diseño de la metodología analítica y otros autores lo consideran como un parámetro que solo deriva en gastos de tiempo y recursos por lo cual no lo tienen en cuenta. (Rojas, 2017; USP, 2018)

Según la OMS se deben evaluar ciertas características o parámetros de validación de acuerdo con la naturaleza del análisis, tal como se resumen en la tabla 1. (WHO, 2018)

**Tabla 1. Parámetros funcionales importantes para validar diferentes tipos de procedimientos analíticos.**

Parámetro	Identidad	Impurezas		Potencia
		Cuantificación	Limites	
Exactitud		+		+
Precisión		+		+
Robustez	+	+	+	+
Linealidad e Intervalo		+		+
Selectividad (especificidad)	+	+	+	+
Límite de detección	+		+	
Límite de cuantificación		+		

Sin embargo, la farmacopea americana (USP) indica los parámetros a evaluar durante la validación de un método analítico, los cuales dependen de la categoría de la prueba a realizar; existen cuatro categorías a saber:(USP, 2018)

- I. Ensayos para la cuantificación de ingredientes activos presentes en materias primas o producto terminado.
- II. Ensayos destinados a determinar impurezas o productos de degradación.
- III. Análisis para la determinación de características de desempeño, como, por ejemplo, la liberación del fármaco desde una formulación o en los ensayos de disolución.
- IV. Ensayos destinados a identificación

Las características de validación para cada una de las categorías de ensayos según USP se encuentran consignadas en la tabla 2.

Tabla 2 Elementos requeridos para la validación según USP. (USP, 2018)

<b>Elementos requeridos para la validación</b>					
<b>características analíticas de desempeño</b>	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Cuantitativo	Pruebas límite		
<b>Exactitud</b>	Si	Si	a	a	No
<b>Precisión</b>	Si	Si	No	Si	No
<b>Especificidad</b>	Si	Si	Si	a	Si
<b>Límite de detección</b>	No	No	Si	a	No
<b>Límite de Cuantificación</b>	No	Si	No	a	No
<b>Linealidad</b>	Si	Si	No	a	No
<b>Rango</b>	Si	Si	a	a	No

a: Puede ser requerido, dependiendo de la naturaleza de la prueba en específico.

Las diferencias entre la OMS y USP en cuanto a los parámetros que son requeridos durante la validación de un método analítico dejan a discreción del experimentador las características de desempeño a evaluar para la validación de la metodología propuesta, el experimentador deberá establecer de acuerdo con las necesidades metodológicas, las características de validación que considere más relevantes de ser evaluadas

### **Otros parámetros o características de importancia.**

#### **Idoneidad del sistema analítico.**

La idoneidad del sistema analítico no se considera como un parámetro de validación, no obstante evaluar la idoneidad del sistema permite verificar, a través de ensayos que el sistema analítico se encuentra funcionando de una manera adecuada y que este es apto para utilizarse en la aplicación de la metodología analítica que se ha validado. Es importante aclarar que el sistema analítico

comprende todos los factores involucrados en la consecución del análisis, es decir, analistas, los reactivos utilizados, el equipo instrumental y las condiciones ambientales.(Rojas, 2017)

La idoneidad del sistema debe evaluarse previo a la ejecución de los análisis, ya que en caso de que no se satisfagan los requerimientos de dicha prueba no será posible continuar con el análisis. Los parámetros evaluados en el sistema de idoneidad dependerán de la naturaleza de la metodología analítica; para el caso que nos atañe los parámetros evaluados corresponden a los que generalmente se realizan para un método cromatográfico, dichos parámetros o características se describen a continuación (Rojas, 2017; USP, 2018):

#### Parámetros de precisión.

Se expresan como porcentaje de coeficiente de variación (CV %) y se puede determinar como la precisión en los tiempos de retención obtenidos de sucesivas inyecciones de la misma muestra, como valor de aceptación se tiene un %CV menor al 2 %.

#### Parámetros cromatográficos.

Dan cuenta del correcto desempeño del sistema cromatográfico, en cuanto a separación y las señales obtenidas.

- ✓ Resolución: indica el grado de separación entre señales generadas por dos sustancias presentes, valores mayores de 2,0 indican una separación óptima de los analitos presentes en las muestras analizadas.

- 
- ✓ Factor de capacidad: indica cuanto tiempo un analito se mantiene retenido en la columna y da cuenta de la afinidad o interacciones que el analito posee por la fase estacionaria, valores entre 1 y 15 se aceptan como válidos para esta característica.
  - ✓ Factor de asimetría o tailing factor: simbolizado con la letra T, es un indicativo de como las señales obtenidas difieren de un comportamiento tipo gaussiano, valores entre 0,8 y 2,0 se consideran adecuados para el sistema de idoneidad.
  - ✓ *Número* de platos teóricos: permite determinar la eficiencia de la columna cromatográfica, ya que en cada plato en teoría se supone que se da un equilibrio entre la fase estacionaria y el analito, dando como resultado el proceso de separación, se considera que entre mayor sea el número de platos teóricos, mayor será la eficiencia de la columna para separar un analito en específico. Se considera que un valor mayor de 1000 es adecuado para el sistema.

### **Estabilidad de las soluciones:**

Con el fin de garantizar la integridad de las muestras y soluciones bajo análisis es necesario establecer la estabilidad de estas, usualmente la determinación de la estabilidad se realiza en las condiciones de análisis (temperatura ambiente), en el automuestreador y en el medio donde se han preparado. Si el análisis demanda poco tiempo; menos de un día, la estabilidad se determina durante un día, si el

análisis demanda más tiempo entonces la estabilidad se evalúa durante el tiempo que requiera el análisis. Para establecer la estabilidad se determina la concentración del analito al principio, durante y al final del análisis de estabilidad, con el fin de determinar cuál es el porcentaje de degradación durante el tiempo de análisis (Rojas, 2017).

## 1.4 Sultamicilina

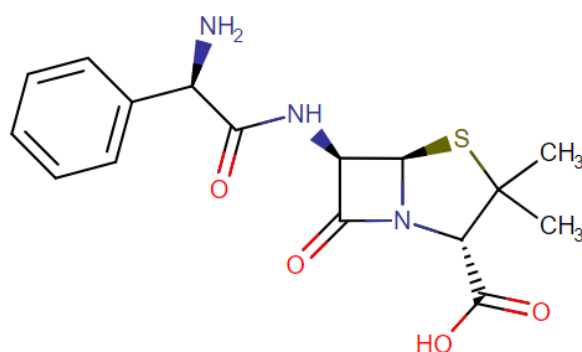
Debido al problema generado por la resistencia a los antibióticos, (OMS, 2016) se han producido nuevos fármacos y/o asociaciones moleculares con el fin de presentar una mejor respuesta frente a los microorganismos. Para el caso específico en primera instancia, la ampicilina, cuya estructura se presenta en la figura 1, es un antibiótico betalactámico el cual pertenece al grupo de las amino penicilinas y posee un amplio espectro de acción (Levin, 2002). El mecanismo de acción involucra la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana debido a la unión del fármaco a proteínas presentes en la pared celular del microorganismo. A estas proteínas se les conoce como proteínas de unión a penicilinas. (Akova, 2008; Betrosian & Douzinas, 2009)

El uso extendido de este antibiótico, anudado a la utilización irracional, inevitablemente ha generado resistencia elevada a este tipo de moléculas, debido a la producción por parte de los microorganismos de betalactamasas, estas últimas son enzimas generadas por las bacterias con el fin de inactivar el anillo betalactámico presente en los fármacos antibióticos como la ampicilina. Las enzimas

---

generadas inducen la ruptura del anillo beta-lactámico, el cual es esencial para que la ampicilina genere su acción farmacológica (Betrosian & Douzinas, 2009; English, Girard, & Haskell, 1984; Levin, 2002; Lode, Hampel, Bruckner, & Koeppe, 1989; Rogers et al., 1983)

---



**Figura 1 Estructura química de la ampicilina.**

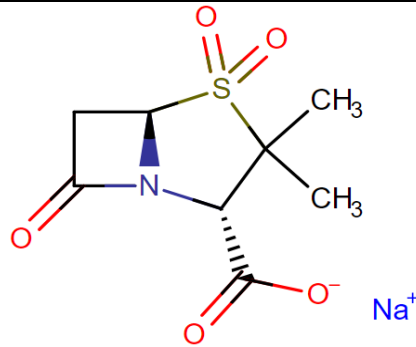
(DRUG BANK, 2018)

Se evidencia el anillo beta-lactámico necesario para ejercer su acción farmacológica

Con el fin de poner un alto al mecanismo de resistencia, se han creado combinaciones de fármacos acompañados de moléculas específicas que permitan una desactivación parcial o total de los mecanismos de defensa generados por las bacterias. (A, Jum'a, & Karaman, 2014). Es entonces que la ampicilina se ha comercializado en combinación o mezcla física con sulbactam figura 2, este último se configura como un inhibidor de la actividad de las betalactamasas, el cual se

suministra junto con antibióticos betalactámicos con el fin de proteger la actividad terapéutica, mediante la inactivación de la acción de las betalactamasas bacterianas.

---



**Figura 2 Estructura química del sulbactam.**

Se evidencia la presencia del anillo beta-lactámico necesario para ejercer la protección de la ampicilina, debido a que posee una alta similitud estructural con el sustrato de las betalactamasas bacterianas. (DRUG BANK, 2018)

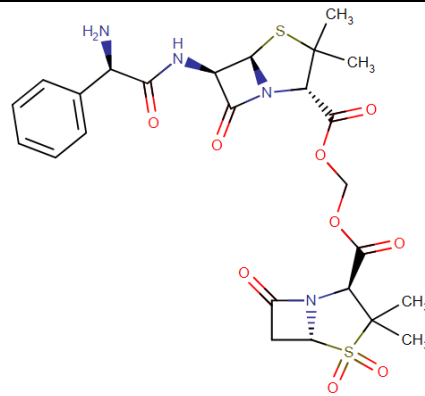
Las formulaciones de combinaciones entre ampicilina y sulbactam no se administran por vía oral debido a que la molécula de sulbactam posee una muy baja biodisponibilidad oral, lo cual hace que la administración de esta combinación se haga exclusivamente por vial parenteral (Akova, 2008; Betrosian & Douzinas, 2009; English et al., 1984; Lode et al., 1989; Rogers et al., 1983). El uso parenteral de este medicamento requiere de conocimiento adecuado por parte del paciente para su correcta administración o que la misma se lleve a cabo en un ámbito intrahospitalario, ambos escenarios previamente expuestos implican costos económicos mayores, derivados de fallas terapéuticas, ya sea debido al uso inapropiado del medicamento o por la falta de adherencia al tratamiento, causado

---

por las incomodidades generadas en el paciente para la administración del medicamento.

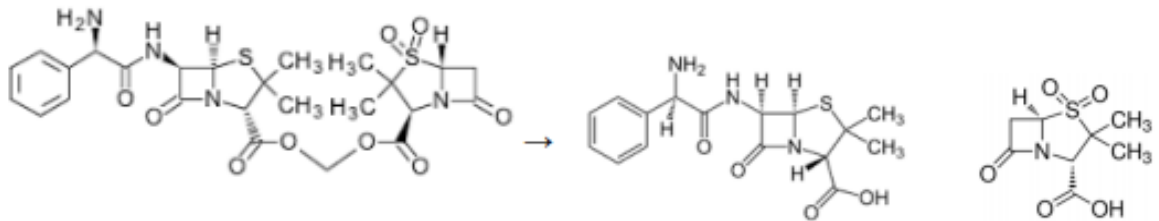
Es entonces que con el fin de mejorar la biodisponibilidad oral de la combinación entre ampicilina y sulbactam la industria farmacéutica ha generado la combinación entre ampicilina y sulbactam; pero no en mezcla física, sino mediante la unión de las dos moléculas a través de enlaces químicos, específicamente un doble éster (Betrosian & Douzinas, 2009 ). Se ha definido a este tipo de moléculas como profármacos mutuos, los cuales se constituyen como dos entidades químicas, que presentan actividad farmacológica, unidas entre sí mediante interacciones químicas. Este mecanismo hace que una de las partes moleculares constituyentes del profármaco mutuo actúe como un promotor de la otra parte del profármaco y viceversa. Los profármacos mutuos pueden ser profármacos bi o tri partita, en los cuales la molécula transportadora presenta un sinergismo con el fármaco al cual está ligado. Cuando se administra oralmente sultamicilina, esta es absorbida y durante este proceso hidrolizada mediante la acción de esterasas, lo cual genera cantidades equimolares de sus dos componentes constituyentes; ampicilina y sulbactam, que van a la circulación sanguínea periférica generándose así la actividad antibiótica por la acción de la ampicilina y la de inhibición de la acción enzimática bacteriana por parte del sulbactam.(A et al., 2014; Betrosian & Douzinas, 2009; English et al., 1984; Rogers et al., 1983).

La figura 3 y 4, muestran la estructura química de la sultamicilina y la reacción de hidrolisis respectivamente.



**Figura 3. Estructura química de la sultamicilina**

La sultamicilina se genera por la combinación química entre la ampicilina y el sulbactam mediante un doble éster.(DrugBank, 2018-2019)



**Figura 4. Reacción de hidrólisis de la sultamicilina.**

En la cual se generan cantidades equimolares de ampicilina y sulbactam.

(Argekar & Kunjir, 1996)

Las concentraciones séricas alcanzadas de ampicilina al ser administrada como sultamicilina son de aproximadamente tres a uno y medias veces las concentraciones obtenidas al administrar una cantidad equivalente de ampicilina. Los parámetros farmacocinéticos son similares de los dos componentes de la

sultamicilina, ambos se eliminan principalmente por vía renal. La sultamicilina posee una biodisponibilidad del 80% y su absorción no se ve afectada por la presencia de alimentos.(Lode et al., 1989; Rogers et al., 1983)

Pese a que los valores de vida media de eliminación tanto para la ampicilina y sulbactam están alrededor de una hora, las altas concentraciones séricas alcanzadas, junto con su actividad antibacteriana sinérgica permiten que la dosificación de la sultamicilina pueda establecerse en un régimen de dos administraciones en veinticuatro horas.(Lode et al., 1989)

### **Características Físicoquímicas de la sultamicilina.**

Las características físicoquímicas de la sultamicilina tosilato di hidrato se presentan en la tabla 3 (PMDA, 2018).

Tabla 3 Características físicoquímicas de la sultamicilina tosilato.

<b>Propiedad</b>	<b>Resultado.</b>
<b>Aspecto</b>	Polvo cristalino blanco a blanco amarillento
<b>Formula molecular</b>	$C_{25}H_{30}N_4O_9S_2 \cdot C_7H_8O_3S \cdot 2H_2O$
<b>Peso molecular (g/mol)</b>	802,889
<b>Solubilidad</b>	Es soluble en Acetonitrilo, metanol o etanol (99.5) y muy poco soluble en agua.
<b>Higroscopicidad</b>	De acuerdo con el método de medición del equilibrio de absorción de humedad a 25 ° C durante 7 días, el aumento en la absorción de humedad fue de solo 2,19 %, incluso cuando se almacenó durante 7 días en condiciones de alta humedad del 92 % HR, la higroscopicidad de este producto fue baja.
<b>Punto de fusión (punto de descomposición), punto de ebullición, punto de congelación</b>	Se torna amarillento gradualmente a partir de 140 ° C y se torna marrón rojizo entre 150 y 160 ° C, fundiéndose y descomponiéndose. El punto final no está claro porque la descomposición avanza gradualmente.

<b>Constante de disociación ácido-base. pKa</b>	7,3 (por el método de titulación por neutralización)
<b>Coefficiente de partición</b>	Sistema cloroformo / agua (pH 7): 197,9 Sistema hexano / agua (pH 7): <0,01
<b>Rotación específica [α] 20:</b>	+173 a + 187 ° D

### **Estabilidad sultamicilina.**(PMDA, 2018)

Estabilidad de la sultamicilina tosilato en diversas condiciones.

#### *Prueba de almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente*

La sultamicilina tosilato fue almacenada en una bolsa de polietileno y se encontró que era estable y sin casi ningún cambio en su apariencia. Cuando se almaceno durante 39 meses en un crisol de aluminio se evidenció un ligero aumento en los productos de degradación, los contenidos de ampicilina, sulbactam y ácido tósico se mantuvieron casi sin cambios desde el comienzo de la prueba. (PMDA, 2018)

#### *Prueba de estabilidad al calor.*

Después de someter al activo a una condición de 40 ° C durante 12 meses y 50 ° C durante 4 meses, se evidencia una ligera tendencia a tonarse de aspecto amarillento en comparación con el inicio de la prueba. La valoración mostró una caída del 3 al 4% y la rotación óptica cayó ligeramente. (PMDA, 2018)

---

Estabilidad a la humedad.

Tiende a ponerse amarillos con el tiempo cuando se almacenan durante 6 meses a 25 ° C y 65% RH (humedad relativa) y 75% RH. El contenido de humedad aumentó ligeramente, la rotación óptica disminuyó ligeramente y el título disminuyó aproximadamente entre un 5 y un 6%. (PMDA, 2018)

Estabilidad frente a la luz:

Cuando se almacenaron durante 3 semanas bajo luz solar directa y durante 6 meses bajo dispersión de luz en el interior, las muestras en ambas condiciones fueron estables sin cambios en la apariencia, pH, título y otros elementos de prueba. (PMDA, 2018)

Principales productos de degradación obtenidos después de las pruebas de estabilidad acelerada. (PMDA, 2018)

Los principales productos de degradación encontrados tras el sometimiento del activo a las condiciones de estabilidad previamente descritas son los citados a continuación:

- Ampicilina degradada II: Ampicilina ácido penicílico
- Producto de degradación de ampicilina III: Ampicilina cuerpo penicilamina
- Producto de degradación de sulbactam: Cuerpo de penicilamina sulbactam

**Estabilidad en solución acuosa. (PMDA, 2018)**

Tabla 4 Estabilidad de sultamicilina tosilato di hidrato en solución.

Estabilidad de sultamicilina tosilato di hidrato				Resultado		
		Condición de almacenamiento	Período de retención	Envase	Apariencia	Cantidad Remanente %
<b>Prueba de almacenamiento a largo plazo</b>		Temperatura ambiente	39 meses		Sin cambio	98.7
<b>Prueba severa</b>	Calor	40°C	12 meses	Bolsa de polietileno	Blanco amarillento	96.8
		50°C	4 meses		Blanco amarillento	97.6
	Humedad	25°C65%RH	6 meses	Botella de cristal marrón abierta.	Blanco amarillento	95.5
		25°C75%RH	6 meses		Blanco amarillento	94.1
	Luz	Interior	6 meses	PTP	Sin cambio	99.3

**Sultamicilina base frente a diferentes sales.**

Mediante la asociación de la sultamicilina en su forma base con diversos reactivos es posible la obtención de diferentes sales, las cuales presentan ventajas frente a la sultamicilina base. La patente EP0092968A1, cuyo asignado actual es Pfizer®, indica que la sal tosilato presenta un valor de solubilidad intermedio lo cual promueve una mayor estabilidad que la que exhibe la sultamicilina base, (figura 5). Además de la estabilidad reducida de la sultamicilina base, esta también presenta un difícil manejo en términos de producción, por lo cual es evidente la ventaja que posee la sal tosilato en cuanto a la formulación de productos farmacéuticos. (Barth, 1983)

<u>Salt</u>	<u>Apparent Solubility, mg/ml</u>			
	<u>Water</u>	<u>(Final pH)</u>	<u>Simulated Gastric Juice</u>	<u>(Final pH)</u>
Hydrochloride	>94	(2.0)	>79	(1.12)
Benzenesulfonate.2H <sub>2</sub> O*	2.15	(3.4)	1.8	(2.0)
4-Chlorobenzene-sulfonate.2H <sub>2</sub> O*	3.3	(3.8)	6.3	(1.1)

\*crystalline

Figura 5 Solubilidad de diferentes sales de sultamicilina.

Por lo anteriormente expuesto en el mercado colombiano la gran mayoría de productos están formulados con sultamicilina tosilato, sin embargo, existen excepciones; en los cuales se ha formulado el producto con sultamicilina base. (Colombia., 2018)

### **Metodologías analíticas para la cuantificación de sultamicilina.**

Se han propuesto diversas metodologías analíticas para el análisis y el control de calidad de sultamicilina (Kumar et al., 2011; Laviana, Fernández-Marí, Bayod, & Blanco, 2003), sin embargo, actualmente no existe una monografía publicada en las farmacopeas oficiales en Colombia, las cuales por disposición del Decreto 677/1995 se establecen como: Estados Unidos de Norteamérica (USP), Británica (BP), Codex Francés, Alemana (DAB), Europea e Internacional (OMS) o la que en su momento rija para la Unión Europea. En ninguna de ellas, se hace referencia

específica al control de calidad de tabletas de sultamicilina, mediante el establecimiento de una monografía específica para este fin. En algunas farmacopeas como es el caso de la Británica y Europea se encuentran monografías referentes al control de calidad de la materia prima; sultamicilina Tosilato. Únicamente la farmacopea japonesa, la cual no es oficialmente aceptada en el territorio colombiano posee una monografía específica para tabletas de sultamicilina Tosilato.

#### **1.4.1 La Sultamicilina en el mercado colombiano.**

En el mercado colombiano se encuentran diferentes marcas de productos que contienen sultamicilina como principio activo y cuya forma farmacéutica son tabletas. El Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia, a través del termómetro de precios permite establecer los precios de los medicamentos tanto en los canales comerciales como institucionales, con lo cual es posible determinar las diferencias entre el costo de productos en el ámbito comercial.

En la tabla 5, propuesta con base en la información presentada por el SISMED en cuanto a los precios de los medicamentos para el año 2018, se citan los diferentes productos en el mercado de tabletas de sultamicilina, su precio de venta al público en general y el precio de venta institucional.(Colombia., 2018)

Tabla 5. Precios de venta (en pesos colombianos) comerciales e institucionales por tableta de 325 mg de sultamicilina presentes en el mercado colombiano.

MEDICAMENTO	PRECIO DE VENTA COMERCIAL	PRECIO DE VENTA INSTITUCIONAL
<b>INNOVADOR</b>	7443,0	7443,0
<b>G1</b>	600,0	NR
<b>G2</b>	1000,0	NR
<b>G3</b>	1400,0	NR
<b>G4</b>	2243,0	1948,0
<b>G5</b>	2368,7	563,0
<b>G6</b>	2800,0	NR
<b>G7</b>	3641,9	1200,0
<b>G8</b>	3704,3	725,0
<b>G9</b>	4001,9	NR
<b>G10</b>	4925,0	NR
<b>G11</b>	5489,6	4997,0
<b>G12</b>	6549,3	NR
<b>G13</b>	6693,8	5163,6

NR: No Reporta

La tabla 5 permite evidenciar una importante diferencia respecto a precios, al comparar el precio de venta por tableta del producto innovador frente los productos multifuente, cuyos precios pueden ser hasta 10 veces menores que el precio del producto innovador. Éste es uno de los escenarios en donde los estudios comparativos entre medicamentos genéricos frente al innovador cobran relevancia; ya que, si es posible demostrar un comportamiento *in vitro* similar de las formulaciones, también se hará posible la adquisición de aquellos productos que hubiesen cumplido con las características de seguridad y eficacia requeridas para

los medicamentos y de esa manera adquirir el medicamento que resulte ser la mejor alternativa en términos de costo beneficio.

## 2. Objetivos.

### Objetivo general

- ✓ Comparar las características biofarmacéuticas (identidad, contenido, uniformidad de dosis, ensayo de disolución y perfiles de disolución) de tabletas multifuente de liberación inmediata, presentes en el mercado colombiano, conteniendo sultamicilina como principio activo.

### Objetivos específicos

- ✓ Evaluar y comparar características biofarmacéuticas de tabletas de liberación inmediata presentes en el mercado colombiano, conteniendo sultamicilina como principio activo.
- ✓ Desarrollar y validar una metodología analítica para la cuantificación de sultamicilina en tabletas de liberación inmediata.
- ✓ Determinar estadísticamente la posible similitud entre los productos evaluados.

### 3. Metodología

En el presente capítulo se aborda el desarrollo y posterior validación de la metodología analítica para la cuantificación de sultamicilina, tanto tosilato como base, presentes en tabletas de liberación inmediata, empleando HPLC con detector UV. Dicha metodología debería presentar una alta eficiencia; ya que se pretendía no solamente cuantificar el activo presente en las tabletas, sino además utilizarla para obtener los perfiles de disolución; lo cual requería que el tiempo de análisis fuera corto, sin sacrificar la idoneidad requerida para este tipo de análisis.

La metodología obtenida se utilizó para evaluar tanto el contenido como el comportamiento de disolución *in vitro* de productos multifuente, específicamente tabletas, conteniendo sultamicilina como principio activo.

La evaluación de la calidad de los productos mediante la determinación de las características biofarmacéuticas y la evaluación de desempeño de los productos mediante la obtención y posterior comparación entre los perfiles de disolución *in vitro* se realizaron basados en el capítulo <02> y <1090> de la USP. Dichos capítulos refieren las pruebas generales que se le deben realizar a tabletas de liberación inmediata, tanto para determinar su calidad como su desempeño *in vitro*.

---

### 3.1 Instrumentos y equipos.

- HPLC con detector UV marca Hitachi Elite LaChrom ®
- HPLC con detector DAD marca Agilent. ®
- Equipo de disolución SOTAX ® CH-4123.
- Balanza analítica marca Ohaus ® Adventurer AX224/E.
- Agitador Vortex V-1 Plus Boeco ®
- Agitador Magnético.
- Ultrasonido marca ELMA ® E 60 H
- Purificador de Agua Simplicity Milli Q. ®
- Potenciómetro Schott ® Instruments Lab 850.
- Material Volumétrico de vidrio. (balones aforados de 20, 25 mL )
- Estufa eléctrica.
- Micropipeta 100-1000 µL Select Pette ®
- Calibrador Mitutoyo ®
- Durómetro digital marca Kraemer Elektronik ®

Los instrumentos y equipos empleados durante el estudio poseen certificados de mantenimiento, calibración y calificación vigentes.

### **3.2 Sustancias de referencia y reactivos.**

- Sultamicilina Tosilato EP Material de referencia certificado (MSRC), LOTE 3,0 con 92,7% de pureza.
- Sultamicilina Tosilato material de referencia secundario.
- Ampicilina Material de referencia certificado
- Sulbactam Material de referencia certificado.
- Potasio Dihidrogeno fosfato marca Panreac 98-100,5 %
- Hidróxido de sodio 99,0 %. Marca Merck
- Dihidrogeno fosfato de sodio mono hidratado 99-102,0 % marca Panreac
- Acetato de sodio trihidrato 99-101 % marca Panreac
- Ácido acético glacial marca Panreac.
- Trietil amina marca Panreac.
- Acetonitrilo LiChrosolv®
- Metanol LiChrosolv®
- Columna Onyx Monolithic C 18 S/N 070150-52 Phenomenex ®.
- Solución de Ácido fosfórico al 85 %.

---

### **3.3 Métodos**

A continuación, se describen los procedimientos empleados tanto para el desarrollo y validación de la metodología analítica, como para la evaluación de las características biofarmacéuticas de los productos bajo estudio.

#### **3.3.1. Muestras. Criterios de selección de productos evaluados.**

Se seleccionaron cuatro productos, en los cuales se incluyeron tres productos multifuente y el producto comparador de sultamicilina 375 mg, seleccionados a partir de la base CUM de registros sanitarios vigentes del INVIMA. Como criterio de selección de los productos multifuente evaluados se tuvo en cuenta el precio de estos; se eligieron tres productos: uno con precio similar al comparador, uno de valor intermedio y uno de precio bajo. Los productos fueron adquiridos en la ciudad de Bogotá y para cada producto se evaluaron dos lotes. Con el fin de propender por la confidencialidad del estudio, los productos bajo análisis se rotularon con los números; 1, 2, 3 y 4. La tabla 6 relaciona los productos evaluados, su identificación durante el estudio, su precio promedio en el canal comercial y la fecha de vencimiento.

Tabla 6. Identificación, precio y fecha de vencimiento de los productos bajo estudio.

Producto	Identificación	Precio promedio por tableta en pesos colombianos.	Fecha de vencimiento	
			Lote 1	Lote 2
Comparador	1	7500	10-2019	03-2020
Multifuente 1	2	3500	03-2019	07-2020
Multifuente 2	3	5500	05-2019	11-2020
Multifuente 3	4	2000	05-2019	09-2020

### 3.3.2. Desarrollo de la metodología analítica para la valoración de sultamicilina presente en tabletas de liberación inmediata.

El desarrollo de la metodología se realizó mediante la búsqueda de información en la literatura asociada al tema, farmacopeas y artículos científicos. Se realizaron modificaciones y ajustes pertinentes; tanto en flujo, composición de la fase móvil, pH de la fase móvil y en el tipo de columna utilizada, con el fin de obtener una metodología eficiente y de fácil consecución para cuantificar el principio activo sultamicilina presente en las tabletas y determinar la cantidad liberada de principio activo durante la evaluación del comportamiento *in vitro* de disolución.

---

### **3.3.3. Validación de la metodología analítica**

Una vez obtenidas las condiciones cromatográficas adecuadas para el análisis, se procedió a realizar la validación de la metodología analítica propuesta, bajo los lineamientos establecidos por la conferencia internacional de armonización (ICH por sus siglas en inglés), el anexo 7 del informe 49 de la OMS y en el capítulo <1225> de la farmacopea americana (USP). Se evaluaron los siguientes parámetros:

#### **3.3.3.1. Selectividad**

La selectividad del método se determinó mediante el procedimiento de degradación forzada del analito, ya que no se poseían interferencias o productos de degradación para ser añadidos a las muestras y determinar la selectividad por el método de adición de interferencias.

Se sometieron soluciones del fármaco a condiciones de estrés específicas; exposición a la luz, calor, refrigeración y a temperatura ambiente con el fin de generar productos de degradación, los cuales poseen similitud estructural con el fármaco, y se evaluaron los tiempos de retención tanto del fármaco como los de los productos de degradación generados. El criterio de aceptación es que ninguna impureza debería generar una señal que posea una resolución menor a 1,5 respecto al pico o señal de interés.

Se utilizó un procedimiento alternativo complementario para confirmar los resultados de selectividad; dicha técnica fue la de HPLC asociado a detector de

arreglo de diodos DAD. Este método evalúa la coelucion de analitos en un mismo pico o señal. Mediante un algoritmo matemático compara el espectro a lo largo del pico con el fin de determinar si existen otros compuestos que posean espectros diferentes y que hayan coeluido con el analito de interés. Es así como se determinó la pureza de pico en cada uno de los medios en los cuales se cuantificaría el analito, es decir, en fase móvil para la cuantificación y en pH 1,2 4,5 y 6,8 para la obtención de los perfiles. A partir de este análisis se obtuvo además la gráfica de isoabsorbancia o isoplot la cual permitió establecer con certeza la longitud de onda de máxima absorbancia para la sultamicilina.

### 3.3.3.2. Linealidad

Linealidad del sistema.

Se determinó mediante la obtención de una curva de calibración, consistente en cinco niveles de concentración cada uno con tres replicas, como se observa en la tabla 7.

Tabla 7. Puntos establecidos para la evaluación de la linealidad y rango de la metodología analítica.

<b>Nivel de concentración</b>	<b>Concentración (mg/mL)</b>
<b>1</b>	0,050
<b>2</b>	0,075
<b>3</b>	0,100
<b>4</b>	0,125
<b>5</b>	0,150

---

Linealidad del método.

La linealidad del método se evaluó mediante la obtención de una curva de calibración, haciendo uso los mismos niveles de concentración referidos en la evaluación de la linealidad del sistema. Cada concentración se obtuvo a partir de la mezcla de estándar de sultamicilina tosilato junto con los excipientes que comúnmente se encuentran en este tipo de formulaciones.(Inc, 2009; Rojas, 2017)

Los valores de concentración definidos para determinar la linealidad se basaron, en la posible concentración que se hallaría durante la determinación de los perfiles de disolución; teniendo una dosis por tableta de 375 mg dentro de un volumen de 900 mL de medio y asumiendo un 100 % de fármaco liberado, se obtuvo una concentración aproximada de 0,41 mg/ mL, posteriormente se realizó una dilución 3 a 10 y se obtuvo una concentración final de 0,125 mg/mL, este último valor correspondió a un valor cercano al valor de concentración central de la curva de calibración propuesta, tal como se recomienda para la evaluación de la linealidad.

Los puntos propuestos previamente para la elaboración de la curva se fundamentan en lo reportado por USP para la cuantificación y determinación de los perfiles de disolución; lo cual indica que para la cuantificación de un analito en un producto terminado el rango lineal debe encontrarse entre el 80 al 120 % de la concentración del análisis, mientras que para la prueba de disolución se ha definido una tolerancia de  $\pm 20$  % sobre el valor Q especificado.

**Análisis estadístico y criterios de aceptación para la linealidad.**

El análisis estadístico se estableció mediante análisis de variancia ANOVA y prueba T a un nivel de confianza de  $p=0,05$ , los criterios de aceptación se definen en la tabla 8.

Tabla 8. Criterios de aceptación para la evaluación estadística de linealidad.

Prueba	Hipótesis	Criterio de aceptación
<b>Prueba t de Student</b>	<p>Para la correlación</p> <p>H<sub>0</sub>: No Existe correlación significativa entre (x) y (y).</p> <p>H<sub>1</sub>: La correlación entre (x) y (y) es significativa.</p>	Si el valor calculado para t es menor que el valor de t de la tabla para n-2 grados de libertad y una probabilidad de error de 0,05, la hipótesis nula H <sub>0</sub> no se rechaza. De lo contrario, la hipótesis H <sub>0</sub> se rechaza y se acepta la hipótesis alterna H <sub>1</sub> .
	<p>Para la pendiente</p> <p>H<sub>0</sub>: La pendiente no es significativamente diferente de cero.</p> <p>H<sub>1</sub>: La pendiente es significativamente diferente de cero.</p>	Para ambas hipótesis, si el valor calculado para t es menor que el valor de t de la tabla para n-1 grados de libertad y una probabilidad de error de 0,05 la hipótesis nula H <sub>0</sub> no se rechaza. De lo contrario, la hipótesis H <sub>0</sub> se rechaza y se acepta la hipótesis alterna H <sub>1</sub> .
	<p>Para el intercepto</p> <p>H<sub>0</sub>: El intercepto no es significativamente diferente de cero.</p> <p>H<sub>1</sub>: El intercepto es significativamente diferente de cero.</p>	
<b>Análisis de Varianza (ANOVA) para la regresión lineal</b>	<p>H<sub>0</sub> : La regresión no es significativa</p> <p>H<sub>1</sub> : La regresión es significativa</p>	Si el valor calculado para F es mayor que el valor de F de la tabla de Fisher para n-1 grados de libertad y una probabilidad alfa de 0,05, la hipótesis H <sub>0</sub> se rechaza. En consecuencia, se acepta la hipótesis H <sub>1</sub> .

<b>Análisis de Varianza (ANOVA) para el desvío o falta de ajuste.</b>	<p>H<sub>0</sub>: El desvío de la linealidad no es significativo</p> <p>H<sub>1</sub>: El desvío de la linealidad es significativo</p>	<p>Si el valor calculado para F es mayor que el valor de F de la tabla de Fisher para n-1 grados de libertad y una probabilidad alfa de 0,05, la hipótesis H<sub>0</sub> se rechaza. En consecuencia, se acepta la hipótesis H<sub>1</sub>.</p>
-----------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### 3.3.3.3. Rango

El rango se determinó de manera teórica a partir de la curva de calibración obtenida. Se consideró como rango el valor de concentraciones entre el mínimo y máximo en donde se demostró adecuada precisión exactitud y linealidad.

### 3.3.3.4. Precisión.

La precisión de la metodología se evaluó a dos niveles; repetibilidad y precisión intermedia:

Repetibilidad

*Repetibilidad Instrumental:*

Se analizaron de manera consecutiva de ocho a diez veces una misma muestra en las mismas condiciones cromatográficas, con el fin de determinar la variabilidad aportada por el instrumento. Valores de % CV menores de 2,0 se consideraron como criterio de aceptación.

*Repetibilidad del método.*

Se realizaron nueve determinaciones, correspondientes a tres niveles de concentración cubriendo la concentración de trabajo y para cada nivel de concentración se prepararon tres replicas; 0,7 0,1 y 0,125 mg/ mL. Valores de % CV menores de 2,0 se consideraron como criterio de aceptación.

*Precisión intermedia*

Se determinó en tres concentraciones diferentes, en dos días diferentes, evaluando a dos analistas distintos. Los criterios de aceptación se presentan a continuación:

Evaluación mediante RSD

Los % CV calculados deben ser menores a 2,0 veces al valor de % CV encontrado en la repetibilidad del método.

Evaluación mediante ANOVA

Con el fin de calcular el efecto de cada uno de los factores evaluados; día, analista y nivel de concentración se realizó un diseño matricial con cada uno de los factores involucrados y posteriormente se llevó a cabo el análisis de varianza ANOVA, con el siguiente contraste de hipótesis:

Para un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$

$H_0$ : el factor A no influye

$H_1$ : factor A influye

Se rechaza  $H_0$  cuando:  $F_T > F_{\text{Calculado}}$ .

### 3.3.3.5. Exactitud.

Este parámetro fue determinado mediante el procedimiento de enriquecimiento de un placebo. Dicho placebo se preparó con los excipientes que comúnmente se encuentran en este tipo de formulaciones, posteriormente al placebo se le añadió una cantidad conocida de sultamicilina tosilato, lo anterior se realizó en tres niveles de concentración con tres replicas. Finalmente se determinó el contenido de sultamicilina tosilato presente en la mezcla mediante la aplicación de la metodología analítica propuesta, se calcularon los factores de recuperación, los cuales corresponden al porcentaje de la muestra hallada frente al total que teóricamente se agregó. Los valores permisibles de recuperación para metodologías analíticas que pretendan cuantificar un analito de interés que se encuentre cercano al 100 %, debe encontrarse entre 98-102 %.

Con el fin de establecer la idoneidad estadística de la exactitud se realizaron dos pruebas a saber:

*Test de Cochran:*

Se tiene el siguiente contraste de hipótesis:

Ho: las varianzas no son significativamente diferentes.

H1: las varianzas son significativamente diferentes.

$$G_{exp} = (Varianza\ mayor) / \sum\ varianzas$$

Si  $G_{exp} < G_{tab}$  ( $\alpha=0,05$ ,  $K$ ,  $n$ ) el resultado no es significativo y las varianzas no difieren estadísticamente,  $K$  corresponde a los niveles de concentración y  $n$  al número de réplicas por nivel, para nuestro caso  $K= 3$  y  $n= 3$ .

*Prueba de t.*

Se tiene el siguiente contraste de hipótesis:

$H_0$ : La recuperación media no es significativamente diferente de 100%

$H_1$ : La recuperación media es significativamente diferente de 100 %.

$$t_{exp} = \left[ \frac{|100 - R|}{CV} \right] * \sqrt{n}$$

Donde  $R$  corresponde al valor de recuperación encontrado y  $n$  al número de réplicas en el ensayo.

Si  $t_{exp} < t_{tab}$  ( $\alpha=0,05$ ,  $gl= n-1$ ) la recuperación es satisfactoria y no difiere significativamente de 100 %.

### **3.3.3.6. Estabilidad.**

La estabilidad de las soluciones de sultamicilina tosilato se determinó a partir de los datos de selectividad conocidos, en donde se sometieron soluciones de sultamicilina tosilato de concentración conocida a condiciones de estrés, con el fin de generar la degradación parcial de analito, evidente con la aparición de nuevas señales en el cromatograma. Además, se determinó el porcentaje de degradación

del analito mediante la cuantificación de una solución de sultamicilina tosilato de 0,1 mg/mL, al inicio y pasadas 5 horas en el automuestreador.

#### **3.3.3.7. Sistema de idoneidad.**

El sistema de idoneidad fue evaluado mediante el cálculo de parámetros cromatográficos tales como la resolución, asimetría y *número* de platos teóricos, los cuales poseían valores de aceptación de no menos de 2,0 para la resolución, entre 0,8 y 2,5 para la asimetría y un *número* de platos teóricos mayor a 1000.

#### **3.3.4 Evaluación de características Biofarmacéuticas**

Como previamente se expuso, las características biofarmacéuticas hacen referencia a todas las características de calidad que presenta un producto farmacéutico, las cuales son dependientes principalmente de tres aspectos; los excipientes, el principio activo y los métodos de fabricación de la forma farmacéutica.

Debido a que las tabletas de sultamicilina no poseen una monografía oficial en Colombia, el establecimiento y evaluación de las pruebas biofarmacéuticas a determinar, se realizó teniendo como referencia procedimientos incluidos tanto en la farmacopea americana versión 41 en los capítulos <02> y <711> para tabletas de liberación inmediata como en el anexo 7 del informe 49 de la OMS.

Las pruebas realizadas a los productos evaluados se relacionan a continuación:

- Descripción

Análisis visual de los productos evaluados.

- Análisis dimensional

El análisis dimensional de las tabletas se llevó a cabo mediante el uso de un calibrador pie de rey debidamente calibrado.

- Fuerza de ruptura.

La determinación de la fuerza de ruptura de las tabletas de sultamicilina se realizó mediante el uso de un durómetro digital y bajo las directrices de la USP definidas en el capítulo <1217>.

- Identidad

Se evaluó mediante la comparación entre los tiempos de retención obtenidos entre el cromatograma del material o sustancia de referencia y el encontrado en los cromatogramas de las muestras.

- Valoración del fármaco

Se realizó mediante la aplicación de la metodología analítica HPLC UV propuesta y validada, para la cuantificación de sultamicilina presente en tabletas de liberación inmediata.

- Uniformidad de dosis

La prueba se realizó mediante el método de variación de peso de la USP para tabletas sin cubierta o tabletas recubiertas que contengan 25 mg o más de un fármaco, que corresponda al 25% o más en peso, de la unidad de dosificación.

Para el método de variación de peso se determinaron los pesos individuales de las unidades de dosificación (tabletas) y junto con el valor de contenido se calculó el valor de aceptación. Se aceptaba un lote para un nivel L1 si para el análisis de 10 unidades se encuentra que el valor de aceptación es menor de 15, si no se cumple el nivel L1 sería necesario realizar el análisis gravimétrico con 20 unidades más, con el fin de obtener 30 unidades de dosificación y determinar el valor de aceptación en un nivel L2, cuyo criterio de aceptación es que se encuentre un porcentaje de variación menor al 25,0 %.

- Ensayo de disolución.

El ensayo se llevó a cabo bajo dos condiciones, a saber:

Condición 1: según lo reportado por la farmacopea japonesa en su edición XVII para tabletas de sultamicilina. Las condiciones para realizar el ensayo de disolución fueron las que se muestran a continuación en la tabla 9:

Tabla 9. Condiciones de disolución según farmacopea japonesa. (Sciences, 2018-2019 )

<b>Velocidad de rotación (r.p.m.)</b>	50
<b>Aparato</b>	Paletas
<b>Medio de disolución</b>	Agua
<b>Volumen del medio (mL)</b>	900

---

<b>Criterio de aceptación</b>	En 15 minutos no se ha disuelto menos del 75% de sultamicilina tosilato.
-------------------------------	--------------------------------------------------------------------------

---

Condición 2: las condiciones descritas a en la tabla 10 se proponen, ya que es el medio donde se simula de manera más realista el sitio en donde finalmente el fármaco se pretende liberar y posteriormente absorberse.

Tabla 10. Condiciones de disolución propuestas.

---

<b>Velocidad de rotación (r.p.m.)</b>	75
<b>Aparato</b>	Paletas
<b>Medio de disolución</b>	HCl 0.1 M (pH 1.2)
<b>Volumen del medio (ml)</b>	900
<b>Criterio de aceptación</b>	En 15 minutos no se ha disuelto menos del 75% de sultamicilina tosilato.

---

Al no existir una monografía oficial para las tabletas de sultamicilina tosilato, para el criterio de aceptación sometido a la segunda condición, se estableció como lo indica la farmacopea japonesa en su edición XVII.

### 3.3.5 Perfiles de disolución

El comportamiento de disolución *in vitro* se evaluó mediante la obtención de perfiles de dos lotes de tres productos multifuente comparados frente al producto innovador, en tres medios; pH 1.2, 4.5 y 6.8. El aparato utilizado fue paletas a 75 r.p.m. y un volumen de medio de 900 mL a 37.0 ° C. La obtención de los perfiles de disolución se realizó con base en el anexo 7 del informe 49 de la OMS, y en el capítulo <1090> de la USP, en donde se especifican los equipos, medios, unidades

a evaluar, tiempos de muestreo y demás condiciones requeridas, las cuales se resumen en la tabla número 11.

Tabla 11. Condiciones de disolución experimentales para la obtención de los perfiles de disolución. (WHO, 2015)

<b>Aparato</b>	2: Paletas
<b>Velocidad de rotación (rpm)</b>	75
<b>Medio de disolución</b>	Buffer Fosfato de Potasio pH 6,8 Buffer Acetato de Sodio pH 4,5 Ácido Clorhídrico 0,1 M pH 1,2
<b>Temperatura del medio (°C)</b>	37 ± 0,5
<b>Volumen del medio (ml)</b>	900
<b>Tiempo (minutos)</b>	60
<b>Tiempos de muestreo (minutos)</b>	5, 10, 15, 30, 45, 60.

Se omitió el punto de 90 minutos ya que, al observar los primeros perfiles obtenidos, se pudo concluir que a partir del minuto 45 ya no se liberaba más fármaco al medio y se veía un marcado efecto de dilución, atribuido a la reposición de medio que se daba en cada punto.

Durante el análisis, en cada tiempo de muestreo se tomó una alícuota de 10 mL, posteriormente esta alícuota fue pasada a través de un filtro de 0,45 µm y de este filtrado se tomó una alícuota para obtener una dilución 3 a 10. Se realizó reposición de medio para cada punto de muestreo evaluado, con el fin de mantener las condiciones SINK del medio de disolución.

Las muestras fueron dispuestas de manera aleatoria en cada una de las posiciones del equipo de disolución, para cada producto evaluado. Los cuatro productos fueron evaluados de manera conjunta con el fin de someter a las mismas condiciones a los productos y evitar posibles sesgos.

### **Manejo de residuos.**

Debido a la gran cantidad de residuos generados durante la consecución de los perfiles de liberación *in vitro*, el manejo de los desechos se realizó bajo las directrices de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, en cuanto a manejo de residuos. Previa a su disposición final, los residuos fueron sometidos a un proceso de inactivación (Fukutsu, Kawasaki, Saito, & Nakazawa, 2006), haciendo uso de una solución de hipoclorito de sodio al 5,0 %, con el fin de desactivar el anillo betalactámico y de ese modo evitar posibles problemas de resistencia.

### **3.3.6 Evaluación estadística**

La comparación de los perfiles de disolución se realizó a través de la evaluación mediante el cálculo del área bajo la curva (ABC), la eficiencia de la disolución (ED), y el factor de similitud ( $f_2$ ).

El ABC fue calculado mediante el método de los trapecios, una vez obtenidos los valores de ABC se utilizaron los mismos para determinar la eficiencia de disolución. Para el cálculo de  $f_2$  se utilizaron datos que exhibían una varianza de menos de 20 % para el primer punto de la curva y de menos del 10% para los siguientes puntos,

---

teniendo en cuenta que sólo deberá considerarse un punto de la curva después de que se haya alcanzado una disolución del 85% del producto de comparación. Se requirieron un mínimo de tres puntos (excluyendo el tiempo cero) para realizar el cálculo de  $f_2$ .

Para establecer la similitud entre perfiles el valor calculado de  $f_2$  debería ser igual o superior a 50.

## 4. Capítulo 4. Resultados y discusión.

### 4.1 Desarrollo y validación de la metodología analítica para la valoración de tabletas de sultamicilina.

#### 4.1.1 Obtención de espectro de absorción molecular.

Se preparó una solución de concentración de 0,1 mg / mL de sultamicilina tosilato y se realizó un barrido UV desde 200 nm hasta 450 nm, con el fin de determinar la longitud de onda en donde el activo presentaba una mayor absorción. Dicho espectro se presenta a continuación en la figura 6.

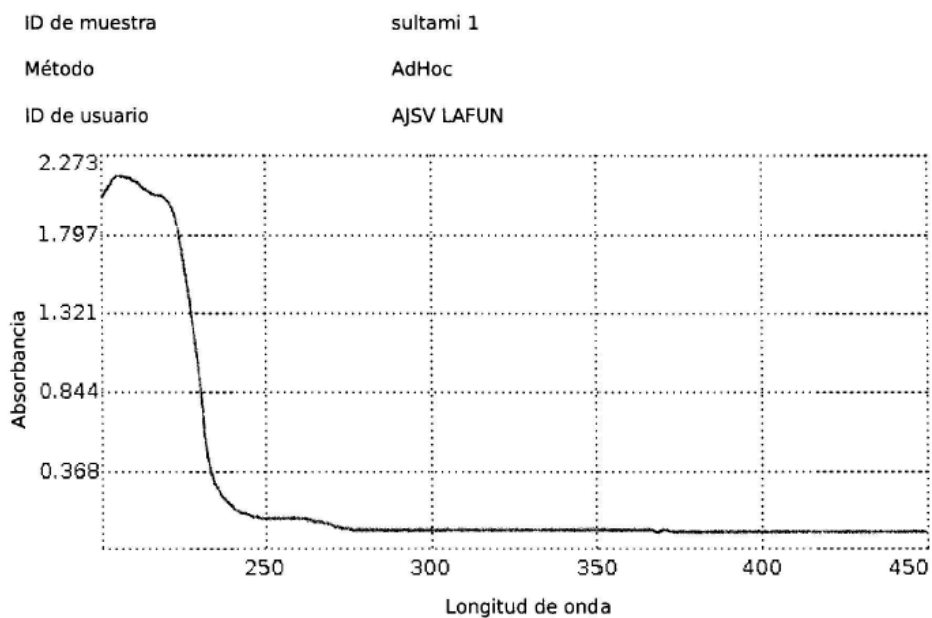


Figura 6. Espectro de absorción molecular EAM de Sultamicilina Tosilato 0,1 mg/mL.

A partir del espectro previamente obtenido se estableció como longitud de onda de cuantificación 215 nm, la cual es la longitud de onda que presenta mayor absorción

y además este valor es consistente con las metodologías propuestas por otros autores. (Argekar & Kunjir, 1996; Kumar et al., 2011; Laviana et al., 2003; Rogers et al., 1983)

## **4.1.2. Sistema cromatográfico.**

### **Columna**

La fase estacionaria consistió en una columna monolítica fase asociada C18. El uso de este tipo de columnas provee una mayor eficiencia en cuanto al análisis, ya que dichas columnas son capaces de resistir altas presiones derivadas de altos flujos. Además, las muestras no requieren poseer una alta pureza para ser analizadas. El proveedor de dichas columnas asegura que es posible reducir los tiempos de retención de forma significativa, cuando se comparan con las columnas convencionales. (Phenomenex, 2007; Sklenarova et al., 2012). Lo anterior se confirmó ya que por lo referido en la literatura para el análisis de sultamicilina tosilato por HPLC y haciendo uso de las columnas empacadas convencionales, los tiempos de análisis requeridos contemplaban un tiempo mínimo de 10 minutos. El uso de la columna monolítica permitió un tiempo de análisis de 2,5 minutos, lo cual corresponde a una reducción significativa del tiempo de análisis requerido, con lo cual se obtiene un menor gasto de solventes, un mejor aprovechamiento de los recursos y por ende una metodología analítica más eficiente.

## **Fase móvil.**

Según la literatura los solventes utilizados para el análisis HPLC UV de sultamicilina en diversas matrices, consistían usualmente en mezclas de buffer de fosfatos a pH 3,0 y Acetonitrilo o metanol. En estos últimos solventes la solubilidad de la sultamicilina es alta.

El pKa de la sultamicilina tosilato es de 7,3, lo cual significa que esta molécula es una base débil y que a este valor de pH se encuentra disociada en un 50 %, con el fin de que la sultamicilina se encuentre en su mayoría disociada se requiere que el pH sea 1/2 veces el valor de pKa. El buffer de fosfatos a pH 3,0 hace que cumpla la condición previamente expuesta, de este modo se propende por una mayor solubilidad, una menor interacción entre la molécula de sultamicilina y la fase estacionaria apolar, resultando en un proceso de separación más eficiente.

## **Metodologías farmacopéicas existentes.**

La farmacopea japonesa *XVII*, en la monografía para tabletas de sultamicilina, específicamente para el ensayo de disolución indica las siguientes condiciones, consignadas en la tabla 12, para el análisis por HPLC.

Tabla 12. Condiciones cromatografías para la cuantificación de sultamicilina presente en tabletas, según farmacopea japonesa XVII.

<b>Detector</b>	UV A 222 nm
<b>Columna</b>	C18 acero inoxidable d= 4.6 mm, L : 15 cm
<b>Fase móvil</b>	Buffer de fosfatos pH 5.5
<b>Flujo</b>	Ajustar hasta que el tiempo de retención se de 8 minutos

#### Composición de la fase móvil.

Con la información recolectada se procedió a realizar un primer análisis con una proporción de 80:20 ACN: buffer de fosfatos pH 3.0, esto con el fin de determinar si la separación de los componentes era efectiva. El resultado de dicha corrida es mostrado a continuación en la figura 7.

NOMBRE DE LA MUESTRA: STD SULTAMICILINA 0.1 MG ML 2  
VIAL : 2  
VOLUMEN DE INYECCIÓN: 10

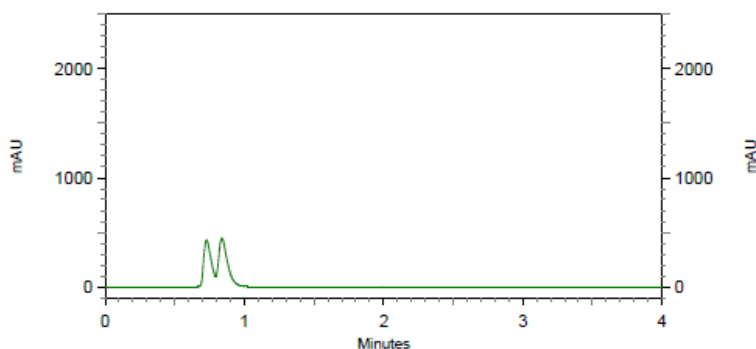


Figura 7. Cromatograma de Sultamicilina Tosilato 0.1 mg/mL 80: 20 ACN: Buffer Fosfato pH 3.0 1 mL / min

El cromatograma obtenido permite evidenciar dos señales o picos, los cuales por lo reportado en literatura hacen referencia al tosilato y a la sultamicilina respectivamente. (Argekar & Kunjir, 1996; Laviana et al., 2003; Rogers et al., 1983).Lo anterior fue confirmado ya que al analizar muestras de tabletas cuyo principio activo era sultamicilina base, solo se evidenció la segunda señal o pico, perteneciente a sultamicilina base.

Con el fin de obtener una fase móvil adecuada y económicamente viable se procedió a disminuir la proporción de Acetonitrilo en la mezcla, obteniendo una proporción óptima de 65: 35 buffer de fosfato pH 3,0 y ACN a un flujo de 1, 4 mL/min.

NOMBRE DE LA MUESTRA: STD 0.1 70 30  
VIAL : 2  
VOLUMEN DE INYECCIÓN: 10

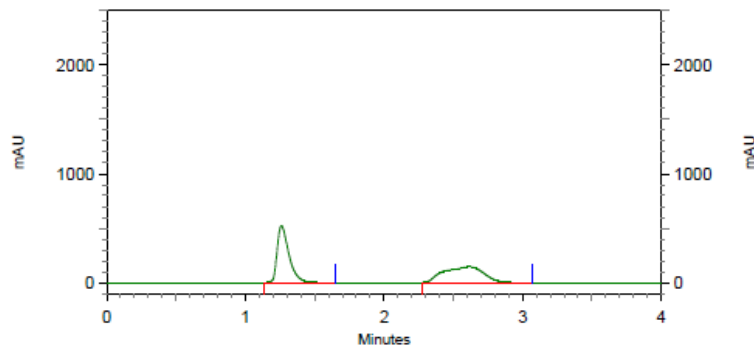


Figura 8. Cromatograma de Sultamicilina Tosilato 0.1 mg/mL 70:30 Buffer Fosfato pH 3.0: ACN Flujo 1 ml/ min.

NOMBRE DE LA MUESTRA: STD 0.1 6040 1,2 ml min  
VIAL : 2  
VOLUMEN DE INYECCIÓN: 10

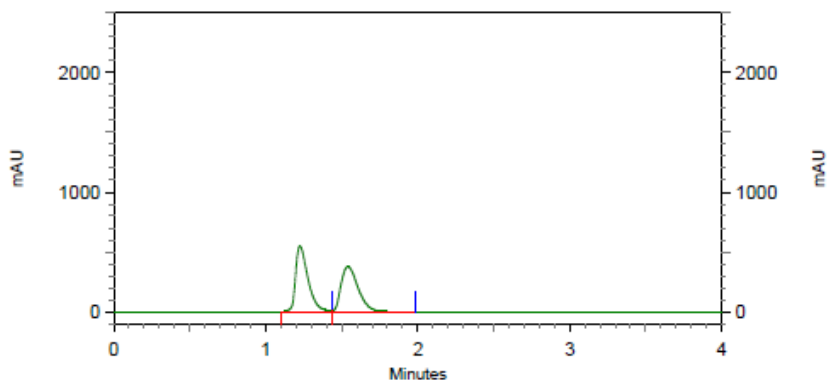


Figura 9. Cromatograma de Sultamicilina Tosilato 0.1 mg/mL 60:40 Buffer Fosfato pH 3.0:  
ACN flujo 1.2 mL / min.

NOMBRE DE LA MUESTRA: std 6535 14  
VIAL : 2  
VOLUMEN DE INYECCIÓN: 10

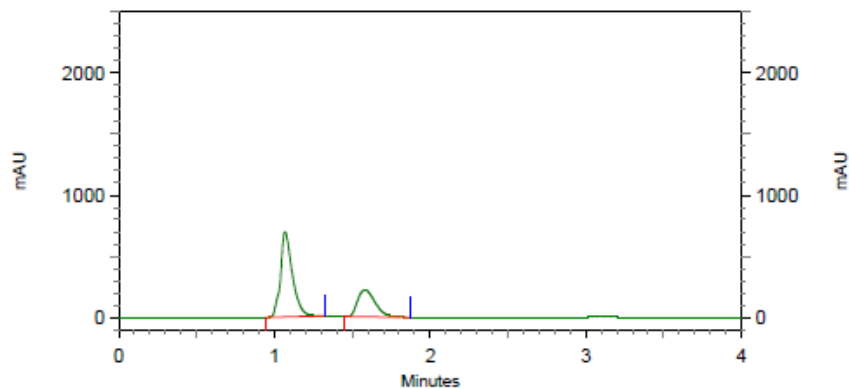


Figura 10. Cromatograma de Sultamicilina Tosilato 0.1 mg/mL 65:35 Buffer Fosfato pH 3.0:  
ACN flujo 1.4 mL / min.

No obstante, dado que las condiciones previamente definidas no proveían una adecuada simetría en el pico de interés, se adicionó a la mezcla trietil amina, como

par iónico, el cual se añade usualmente como modificador para mejorar la forma de los picos y controlar el tiempo de retención de los compuestos aminados, tal es el caso de la sultamicilina. (Chuang, Ragan, & Prasad, 1994). De esa manera la asimetría, la forma y el ancho de las señales se vio significativamente mejorada. La fase móvil finalmente consistió entonces en una mezcla de Buffer de fosfato pH 3,0, Acetonitrilo y TEA (65:35:0,1), el pH final de la mezcla era de aproximadamente 3,65. El cromatograma obtenido con el uso de esta fase móvil se presenta en la figura 11.

NOMBRE DE LA MUESTRA: STD 0.1 mg/mL + TEA  
VIAL : 4  
VOLUMEN DE INYECCIÓN: 10

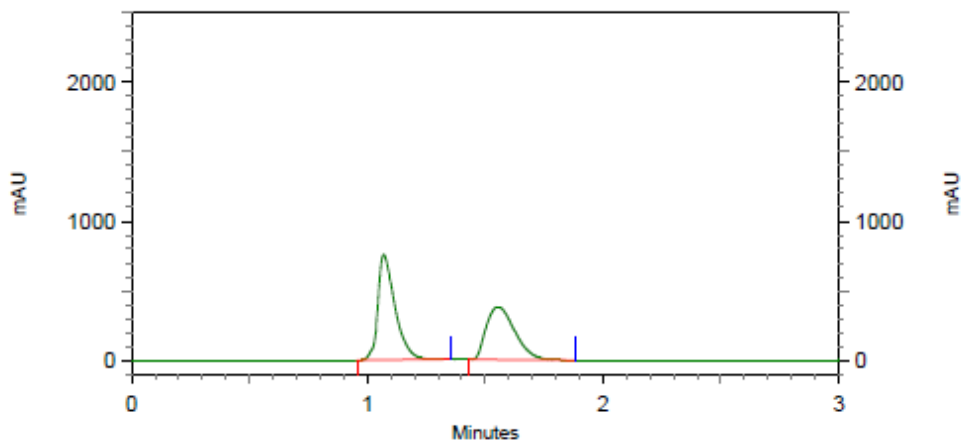


Figura 11. Cromatograma de Sultamicilina Tosilato 0.1 mg/mL 65:35 Buffer Fosfato pH 3.0: ACN TEA flujo 1.4 mL / min.

Las condiciones cromatográficas propuestas permitieron obtener tiempos de retención cortos, señales adecuadas y que cumplen el sistema de idoneidad

---

propuesto, todo dentro de un tiempo de análisis de 2,5 minutos, el cual es un tiempo de análisis que se consideró adecuado, no solo para cuantificar el activo presente en las tabletas, sino también para determinar el comportamiento de liberación *in vitro* (ensayo de disolución y perfiles de liberación) de los productos evaluados. Las condiciones cromatográficas propuestas permiten obtener un tiempo de análisis aproximadamente 70 % menor cuando se compara con la metodología HPLC indicada por la farmacopea japonesa edición XVII.

## **4.2. Validación de la metodología analítica para la valoración de sultamicilina.**

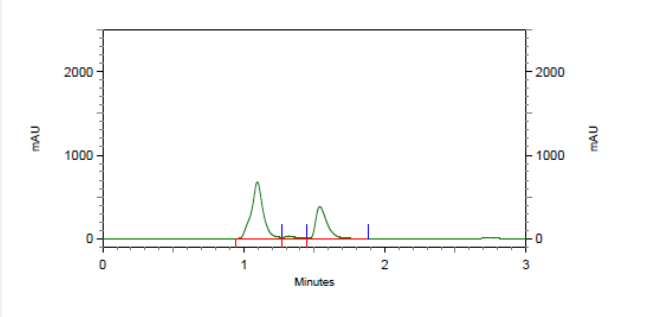
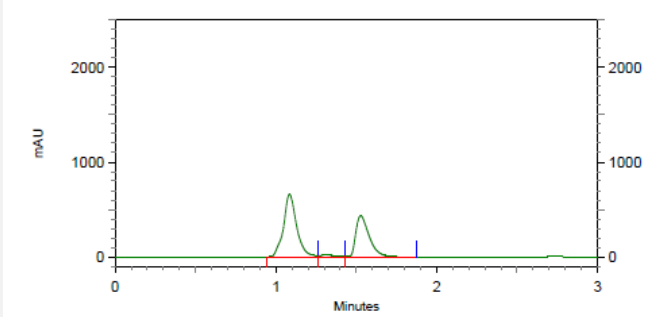
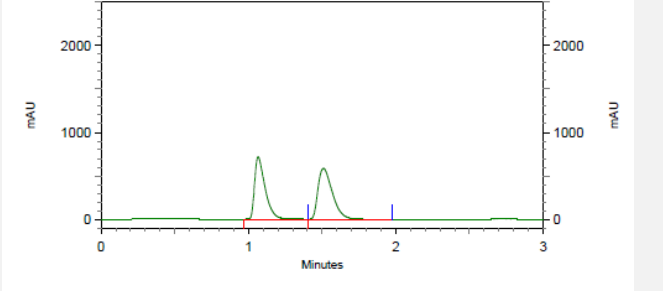
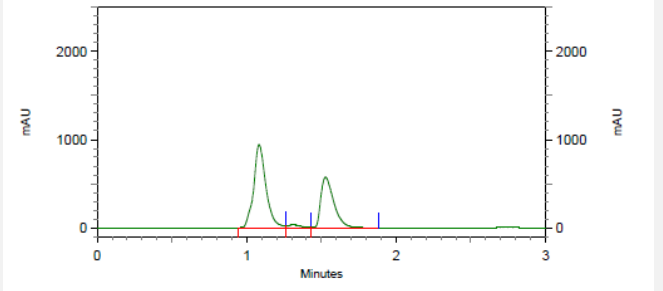
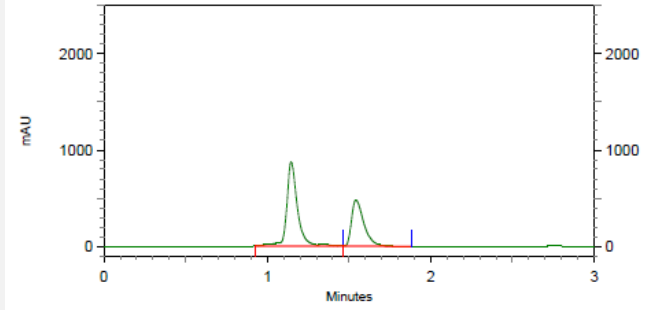
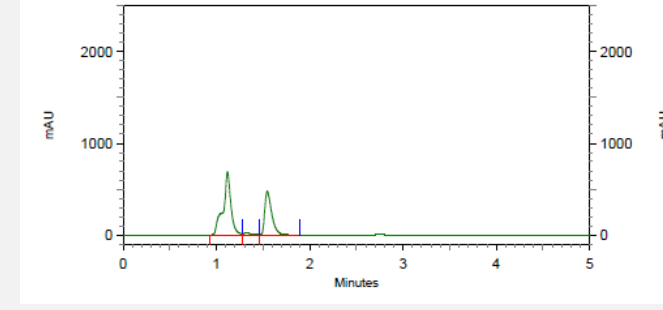
A continuación, se presentan los resultados correspondientes a cada uno de los parámetros de validación seleccionados.

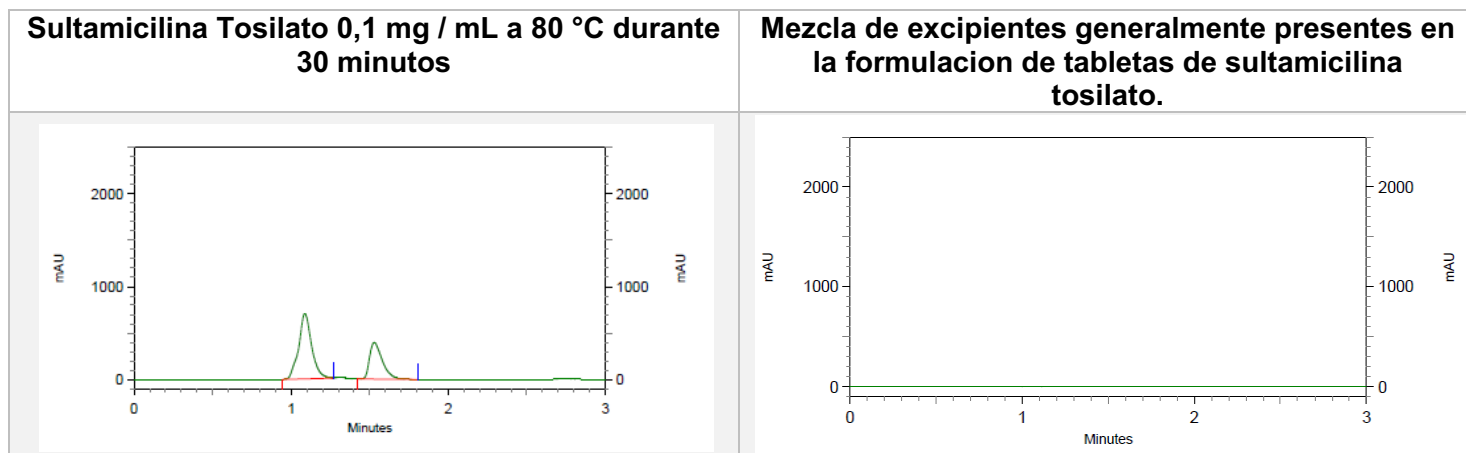
### **4.2.1. Selectividad.**

En la tabla 13 se presentan las condiciones de estrés a las que fue sometido el activo, sultamicilina tosilato 0,1 mg/ mL, así mismo los cromatogramas obtenidos en cada una de las condiciones descritas.

4-72 Comparación biofarmacéutica de productos multifuente de tabletas de liberación inmediata de sultamicilina, presentes en el mercado colombiano.

Tabla 13. Cromatogramas de correspondientes a muestras de sultamicilina tosilato 0,1 mg/mL, sometidas a condiciones de estrés.

<p><b>Sultamicilina Tosilato 0,1 mg / mL en fase móvil en el automuestreador a temperatura ambiente de 25-30 °C HR% 50 %</b></p>	<p><b>Sultamicilina Tosilato 0,1 mg / mL en fase móvil 25-30 °C HR% 50 % después de 3 horas.</b></p>
	
<p><b>Sultamicilina Tosilato 0,1 mg / mL en fase móvil a 4,5 °C 20 % HR después de 5 meses</b></p>	<p><b>Sultamicilina Tosilato 0,1 mg / mL en fase móvil bajo la exposición de la luz durante cuatro días</b></p>
	
<p><b>Sultamicilina Tosilato 0,1 mg / mL a pH ácido (HCl 0,1 Molar)</b></p>	<p><b>Sultamicilina Tosilato 0.1 mg / mL a pH Básico (NaOH 0.02 Molar)</b></p>
	



Los cromatogramas previamente presentados en la tabla 13, indican, de manera visual la ausencia de otras señales correspondientes a impurezas producidas tras el sometimiento del activo a las condiciones estrés utilizado, que generen baja resolución respecto a la señal de la sultamicilina. La selectividad se evaluó tanto con el material de referencia certificado como tabletas, obteniéndose resultados similares.

Como técnica confirmatoria de la selectividad del método analítico se utilizó HPLC-DAD y se obtuvieron las perezas de pico en cada uno de los medios utilizados; a saber: fase móvil; pH 1,2 4,5 y 6,8. Los resultados se muestran a continuación:

4-74 Comparación biofarmacéutica de productos multifuente de tabletas de liberación inmediata de sultamicilina, presentes en el mercado colombiano.

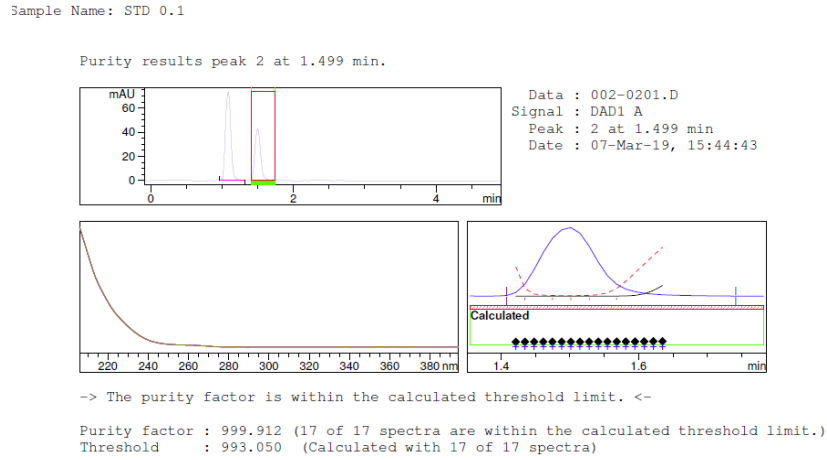


Figura 12. Pureza de pico Sultamicilina tosilato material de referencia en fase móvil.

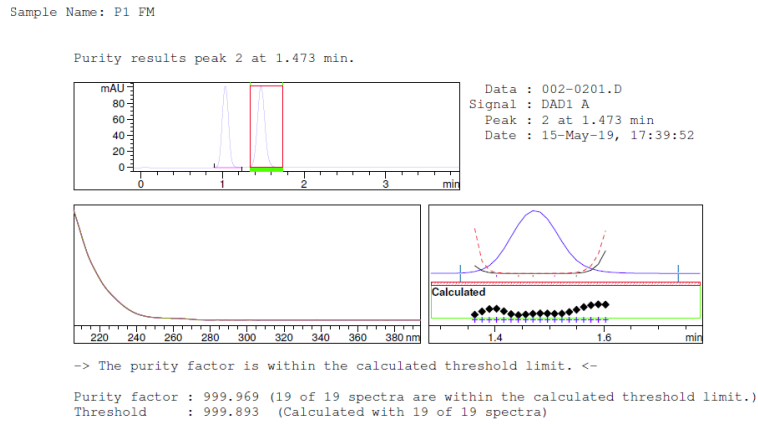


Figura 13. Pureza de pico Sultamicilina tosilato tabletas en fase móvil.

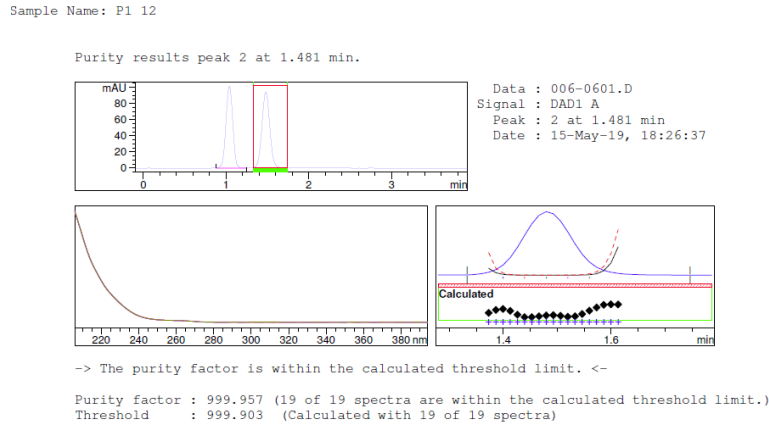


Figura 14. Pureza de pico Sultamicilina tosilato tabletas en pH 1,2.

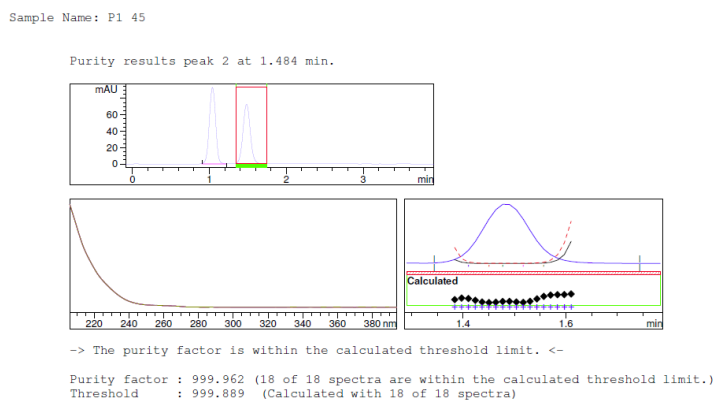


Figura 15. Pureza de pico Sultamicilina tosilato tabletas en pH 4,5.

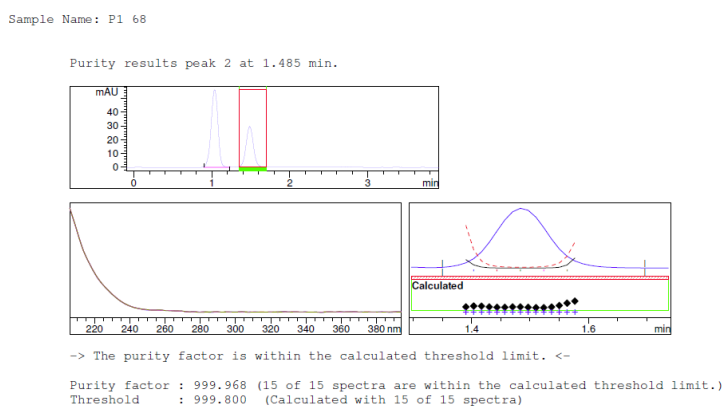


Figura 16. Pureza de pico Sultamicilina tosilato tabletas en pH 6,8.

La selectividad mediante la obtención de la pureza de pico se evaluó tanto con el material de referencia certificado, estándar secundario y a los cuatro productos bajo análisis, obteniéndose resultados similares a los previamente mostrados para cada una de las muestras evaluadas.

Gracias al análisis por HPLC DAD se pudo obtener el isograma, mostrado en la figura 17, en donde se aprecia que la longitud de onda de mayor absorción de la sultamicilina tosilato se encuentra en 215 nm.

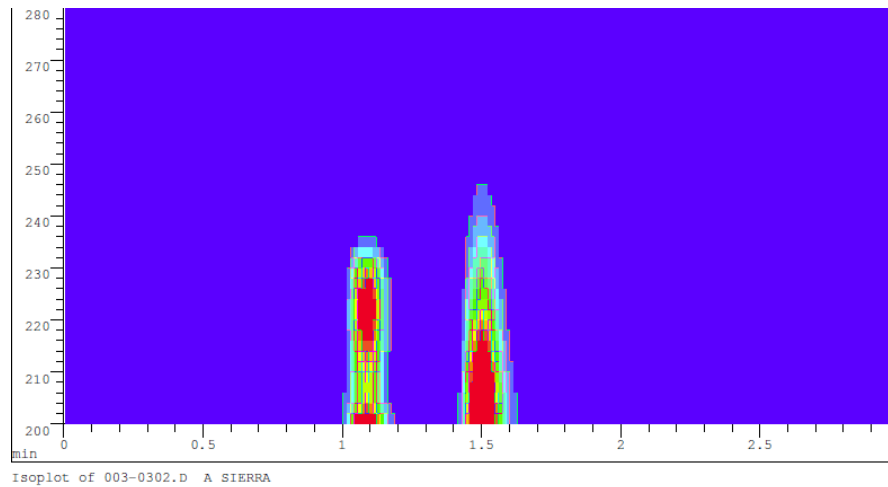


Figura 17. Isograma (longitud de onda vs tiempo) sultamicilina tosilato 0.1 mg / mL. Gracias a los resultados obtenidos se pudo establecer que la metodología propuesta resultó ser selectiva para la cuantificación y evaluación del desempeño de liberación de sultamicilina presente en tabletas de liberación inmediata.

#### 4.2.2. Linealidad.

Tabla 14. Resultados de linealidad para el sistema y el método.

Sistema			Método		
Concentración mg/mL	Replica	Área Sultamicilina	Concentración mg/mL	Replica	Área Sultamicilina
0,049	1	6647052	0,051	1	6780154
	2	6552892		2	6658908
	3	6667225		3	7318760
0,074	1	10125204	0,076	1	10237783
	2	9593896		2	10147595
	3	9592633		3	10651368
0,098	1	13148435	0,101	1	13222430
	2	13179619		2	13457629
	3	13340089		3	14108234
0,123	1	16348787	0,126	1	16457678
	2	16349524		2	16890264
	3	16061134		3	17211132
0,148	1	19526926	0,152	1	19275884
	2	19171617		2	19592871
	3	19963288		3	20766823

Los datos consignados en la tabla 14 corresponden a áreas bajo la curva, integradas mediante el software EZChrom Elite Chromatography Data System desarrollado por Agilent Technologies, para la señal correspondiente a sultamicilina. En total se evaluaron 5 concentraciones a partir de tres replicas independientes, para un total de 15 datos. Con los datos de área obtenidos y mediante el método de mínimos cuadrados se obtuvo la curva de regresión tanto para el sistema como para el método, las cuales se muestran en las figuras 18 y 19 respectivamente.

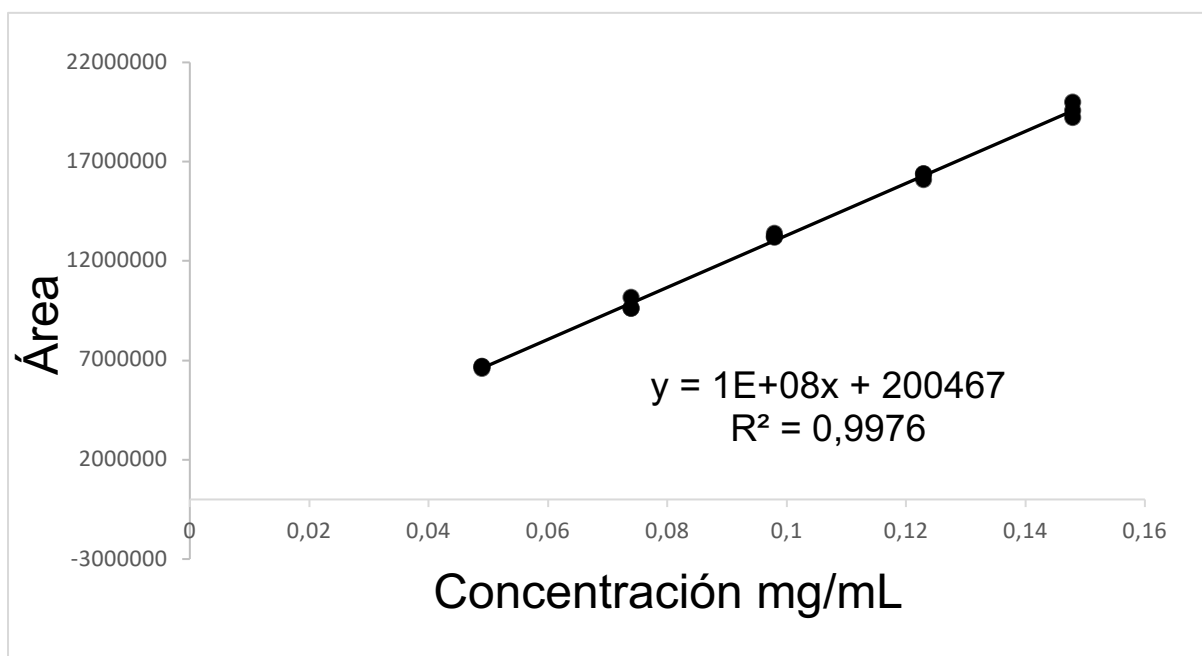


Figura 18. Curva de regresión para el sistema.

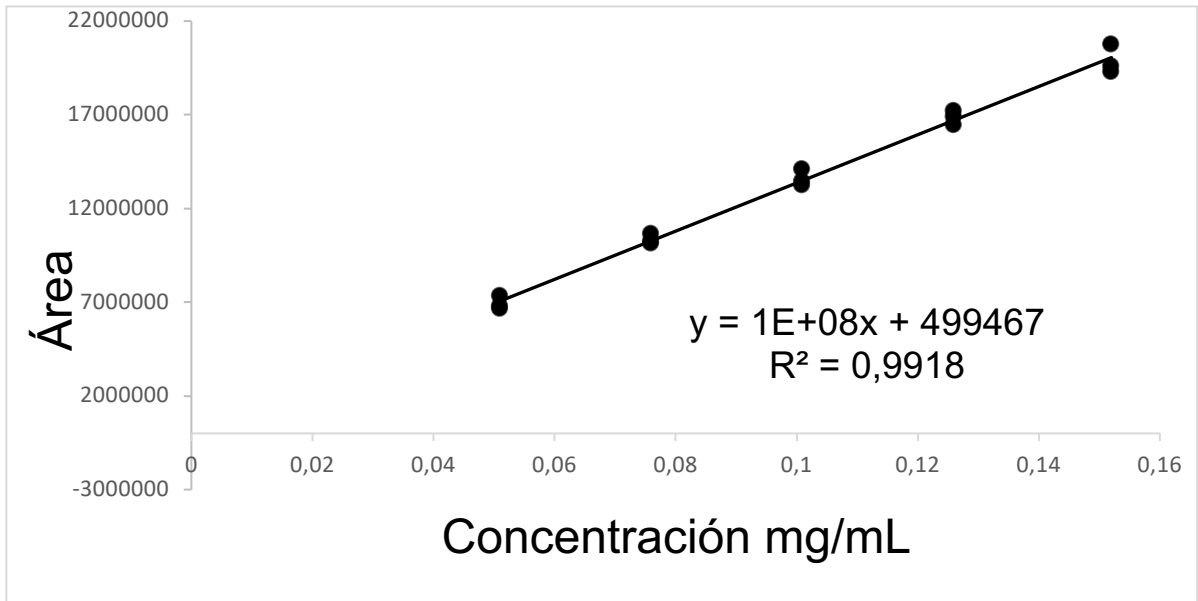


Figura 19. Curva de regresión para el método.

**Evaluación estadística de la linealidad.**

La tabla 15 resume los resultados de las pruebas estadísticas realizadas y si se rechaza o no la hipótesis planteada.

Tabla 15. Resultados de las pruebas estadísticas para evaluar la linealidad.

Evaluación estadística de la linealidad						
Prueba	Parámetro evaluado	Valor calculado	sistema	método	Valor de tablas	Resultado
t	Correlación	$t_r$	76,79	108,65	2,16	$t_r$ es mayor que t de tablas, se rechaza $H_0$ y se dice que existe una correlación significativa entre X y Y
	Intercepto	$t_a$	0,83	1,62		$t_a$ es menor que t de tablas, se acepta $H_0$ , el intercepto es igual a cero
	Pendiente	$t_b$	77,67	40,7		$t_b$ es mayor que t de tablas, se rechaza $H_0$ y se dice que la pendiente es diferente de cero.
ANOVA	Regresión	$F_{cal}$	6032,5	1656,2	4,7	$F_{cal}$ es mayor que F tablas, $H_0$ se rechaza, la regresión es significativa.
	Desvío o falta de ajuste	$F_{cal}$	0,5	0,2	3,7	$F_{cal}$ es menor que F tablas, $H_0$ se acepta, el desvío o falta de ajuste no es significativo.

---

La prueba  $t$  se utilizó con el fin de evaluar la idoneidad de la correlación entre  $X$  y  $Y$ , la pendiente y del intercepto, tanto del sistema cromatográfico como del método. Se encontró que el valor de  $t_r$  calculado resultó ser mayor que  $t$  reportado en tablas, por lo que se concluye que existe correlación significativa entre los valores de  $X$  y  $Y$ .

En los resultados encontrados para la prueba  $t$ , se determinó un valor de  $t_b$  calculado mayor al reportado en tablas; con lo cual la hipótesis propuesta se rechaza y se dice que la pendiente es estadísticamente diferente de cero. Caso contrario con el intercepto, ya que el valor encontrado  $t_a$  resultó ser menor que el valor de  $t$  reportado por tablas, con lo cual se acepta la hipótesis propuesta, dando como resultado que el punto de corte de la recta con el eje  $Y$  no resulta ser estadísticamente diferente de cero.

La prueba ANOVA evidencia que la regresión es significativa tanto para el método como para el sistema, ya que, en ambos casos,  $F$  calculado resultó ser mayor que  $F$  de tablas, dando como resultado la aceptación de la hipótesis propuesta. Además, para el desvío se encontró que  $F$  calculado era menor que el valor de  $F$  reportado por tablas es entonces que se acepta la hipótesis propuesta y se dice que el desvío no es significativo. Los resultados derivados del tratamiento estadístico permitieron determinar que el parámetro de linealidad cumple con los requerimientos establecidos en las normas aplicables.

### 4.2.3. Precisión.

#### Repetibilidad instrumental.

Los resultados correspondientes a la precisión instrumental se encuentran consignados en la tabla 16:

Tabla 16. Resultados de la precisión instrumental. Inyecciones sucesivas de sultamicilina material de referencia certificado 0,1 mg / mL

Repetición	Área Sultamicilina
1	13582870
2	13633248
3	13651103
4	13592856
5	13648879
6	13412700
7	13410698
8	13522948
<b>Promedio</b>	13556912,75
<b>desviación</b>	98888,13
<b>%RSD</b>	0,73%

El valor de % de RSD resultó ser menor que 2,0 % con lo cual es posible afirmar que el sistema cromatográfico funciona de manera adecuada y no aporta una variación significativa al análisis.

#### Repetibilidad del método.

Los resultados de la repetibilidad del método y del sistema son derivados de determinaciones en tres niveles de concentración con tres replicas en cada nivel, para un total de 9 determinaciones; los resultados se muestran en la tabla 17.

Tabla 17. Resultados de la repetibilidad del método.

<b>Repetibilidad del método.</b>			
<b>Concentración mg/mL</b>	0,07	0,10	0,12
<b>Área</b>	9890129	13287272	16337074
	10005620	13411699	16507974
	10208320	13507952	16454837
<b>Promedio</b>	10034689	13402308	16433295
<b>Desviación</b>	161074,9755	110639,34	87463,1004
<b>% RSD</b>	1,61%	0,83%	0,53%

Los datos reportados en la tabla 17 evidencian que existe un aumento de la variación a medida que se disminuye la concentración, este comportamiento es congruente con lo reportado en la literatura, dicho comportamiento fue descrito por Horwitz, él estableció que la pérdida de precisión es proporcional a la disminución de concentración. (Rojas, 2017). El valor de RSD encontrado tanto para el sistema como el método resultó ser menor de 2,0 %, lo cual, la metodología analítica propuesta cumple con lo establecido en los criterios de aceptación para la repetibilidad.

#### **Precisión intermedia.**

La precisión intermedia se determinó utilizando el modelo matricial que se presenta en la tabla 18.

Tabla 18. Resultados de la precisión intermedia.

<b>Precisión intermedia</b>				
<b>Concentración mg/mL</b>	<b>Analista</b>	<b>Área</b>		
		<b>DÍA 1</b>	<b>DÍA 2</b>	
<b>0,075</b>	1	9890128,5	9829032	
		10005620	10116891	
	2	10118547	9830015	
		10115235	9828049	
<b>0,1</b>	1	13586242,5	13287272	
		12912284,5	13411699	
	2	13300898	13412700	
		13273646	13410698	
<b>0,125</b>	1	16507974	15959790,5	
		16454837	16337073,5	
	2	15655584	16344945	
		15634622	16329202	

Evaluación estadística de la precisión.

Tabla 19. Evaluación estadística de la precisión intermedia. Suma de cuadrados de cada factor evaluado.

<b>FC =</b>	$(\sum Y)2/24$	<b>4,149E+15</b>
<b>SCT =</b>	$(\sum Y^2) - FC$	<b>1,547E+14</b>
<b>SCA =</b>	$(\sum A1)2/12 + (\sum A2)2/12 - FC$	<b>4,548E+10</b>
<b>SCD =</b>	$(\sum D1)2/12 + \sum D2)2/12 - FC$	<b>1,716E+10</b>
<b>SCR =</b>	$(\sum R1)2/12 + (\sum R2)2/12 - FC$	<b>474623863</b>

Tabla 20. Evaluación estadística de la precisión intermedia. ANOVA de la precisión.

<b>FUENTE</b>	<b>gl</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fcalc.</b>	<b>F. tab.</b>
<b>Analista</b>	1	4,5475E+10	45475225121	0,0058806	4,35
<b>Día</b>	1	1,716E+10	17160047386	0,0022190	4,35
<b>Replica</b>	1	474623863	474623862,5	0,0000614	4,35
<b>Error</b>	20	1,5466E+14	7,73311E+12		
<b>Total</b>	23	1,5473E+14	6,72719E+12		

El resultado del análisis de varianza permite evidenciar que ninguno de los valores de F calculados resultó ser mayor que el reportado por tablas, por lo que es posible decir que los factores evaluados durante la precisión intermedia; Analista, Día y Replica, no aportan una variación significativa a la metodología propuesta.

#### 4.2.4. Exactitud.

Se utilizó el método de placebo cargado para evaluar la exactitud de la metodología propuesta, dicho método indica que se deben utilizar los excipientes que usualmente se encuentran en una tableta, realizar una mezcla con las proporciones adecuadas y adicionar una cantidad conocida del activo, con el fin de determinar su recuperación al ser sometida la muestra a las condiciones de análisis. Los excipientes y proporciones utilizados se muestran en la tabla 21.

Tabla 21. Excipientes y proporciones utilizados para realizar la exactitud por el método del placebo cargado.

#	INGREDIENTE	FUNCIÓN	PROPORCIÓN	CANTIDAD EN mg	para 1 g (mg)
1	Sultamicilina	Principio activo	52.1	375.12	697.02
2	Almidón de maíz	Diluyente, desintegrante, aglutinante	14	100.8	138.724
3	Estearato de magnesio	Lubricante	0,8	5.76	7.927
4	Poli etilenglicol	Aglutinante	2	0.144	0.198
5	Lactosa anhidra	Diluyente.	34	244.8	336.901
		TOTAL	100.92	726.624	1000

La exactitud se evaluó en tres niveles de concentración en dos días diferentes, se determinó el porcentaje de recuperación, tal como se muestra en la tabla 22.

Tabla 22. Resultados de porcentaje de recuperación en tres niveles de concentración.

Concentración	% recuperación
0,075	97%
	99%
	101%
0,10	102%
	97%
	99%
0,124	105%
	100%
	99%
<b>Promedio</b>	<b>99,9%</b>

### ***Pruebas estadísticas***

Los resultados referentes a las pruebas estadísticas para evaluar la idoneidad de la exactitud encontrada se encuentran consignados en la tabla 23.

Tabla 23. Resultados de las pruebas estadísticas para evaluar la exactitud.

Test de Cochran	prueba t	G tablas	t tablas
<b>G exp</b>	<b>t exp</b>	0,87	2,31
<b>0,50</b>	0,015		

Gracias a los valores reportados en la tabla 23 para las pruebas estadísticas, es posible determinar que los valores tanto de G experimental como de t experimental son menores que los reportados por tablas para cada estadístico con un valor de confianza de 0,05. Con lo que podemos concluir respectivamente que las varianzas

no son significativamente diferentes y que la recuperación promedio no difiere de manera significativa de 100 %. Lo anterior nos permite afirmar que la metodología propuesta cumple con el parámetro de exactitud.

#### 4.2.5. Rango.

Se demostró que en el rango evaluado; 0,050 0,75 0,10 0,125 y 0,150 mg/mL, el método cumplía los parámetros de selectividad, linealidad, precisión y exactitud. Por lo cual se estableció como el rango de cuantificación las concentraciones previamente descritas.

#### 4.2.6. Estabilidad

Los cromatogramas reportados en la prueba de selectividad permitieron establecer la ausencia de señales correspondientes a productos de degradación del analito, cuando soluciones de este se sometieron a las condiciones de estrés descritas en el ensaño de selectividad. Los datos de porcentaje de degradación se muestran en la tabla 24.

Tabla 24. Resultados de porcentaje de degradación de sultamicilina tosilato en solución 0,1 mg/ mL después de 5 horas.

Ensayo	Área señal sultamicilina		Porcentaje de degradación
	inicial	Después de 5 horas	
Día 1	13515118	13191643	2,4 %
Día 2	13234547	12940848	2,2 %

Según los datos de estabilidad reportados por la literatura,(PMDA, 2018) la molécula de sultamicilina tosilato no resulta ser higroscópica, lo cual favorece a su estabilidad, y es estable en suspensión o solución saturada, con una tasa residual después de 39 meses de 98,7 %. No obstante, durante el análisis de la estabilidad se encontró un porcentaje de degradación de aproximadamente 2,3 % después de 5 horas, razón por la cual el tiempo requerido de análisis de los perfiles de disolución se estableció como máximo 3,5 horas, con el fin de promover la estabilidad de las muestras analizadas.

#### 4.2.7. Sistema de idoneidad.

Los parámetros cromatográficos seleccionados para determinar la idoneidad del sistema fueron: la resolución entre los picos, la asimetría de pico y el número de platos teóricos. Los datos de cinco repeticiones sucesivas se presentan a continuación en la tabla 25.

Tabla 25.Resultados del sistema de idoneidad.

<b>Repetición</b>	<b>Resolución</b>	<b>Asimetría</b>	<b>Número de platos teóricos</b>
<b>1</b>	2,81	1,38	1115
<b>2</b>	2,79	1,42	1104
<b>3</b>	2,80	1,37	1101
<b>4</b>	2,80	1,43	1128
<b>5</b>	2,78	1,38	1110
<b>Promedio</b>	2,80	1,40	1111,60
<b>Desviación</b>	0,011	0,027	10,644
<b>RSD %</b>	0,41	1,94	0,96

Los resultados obtenidos de resolución, asimetría y número de platos teóricos se encuentran por encima del valor establecido como criterio de aceptación, con lo cual es posible concluir que la metodología analítica propuesta cumple con los criterios de idoneidad cromatográfica.

### 4.3 Evaluación de características Biofarmacéuticas.

Los resultados y la discusión de estos se realizan para cada una de las características biofarmacéuticas evaluadas.

#### Descripción y características organolépticas

Los resultados de la prueba de descripción se encuentran consignados en la tabla 26. Los productos evaluados consistieron en su mayoría en tabletas de color blanco con o sin ranura, tras la revisión de los registros sanitarios en la base de datos del INVIMA se encontraron que la descripción reportada para los productos era congruente con resultado encontrado para la característica evaluada.

Tabla 26. Resultados de la prueba de descripción y características organolépticas.

Prueba	Resultado							
	P 1 lote 1	P 1 lote 2	P 2 lote 1	P 2 lote 2	P 3 lote 1	P 3 lote 2	P 4 lote 1	P 4 lote 2
<b>Descripción y características organolépticas</b>	Tabletas blancas, capsulares, biconvexas, sin ranura	Tabletas blancas, capsulares, biconvexas, sin ranura	Tabletas blancas, capsulares, biconvexas, sin ranura	Tabletas blancas, capsulares, biconvexas, sin ranura	Tabletas blancas, capsulares, biconvexas, ranuradas por una cara.	Tabletas blancas, capsulares, biconvexas, ranuradas por una cara.	Tabletas, capsulares, biconvexas, sin ranura	Tabletas, capsulares, biconvexas, sin ranura

### Análisis dimensional.

Tabla 27. Resultados del análisis dimensional.

Prueba	Resultado							
	P 1 lote 1	P 1 lote 2	P 2 lote 1	P 2 lote 2	P 3 lote 1	P 3 lote 2	P 4 lote 1	P 4 lote 2
*Análisis dimensional (mm)	d=	d=	d=	d=	d=	d=	d=	d=
	6,2±0,02	6,3±0,01	5,3±0,005	5,6±0,005	5,4±0,012	5,1±0,09	5,0±0,07	5,0±0,09
	h=	h=	h=	h=	h=	h=	h=	h=
	6,7±0,03	6,8±0,04	7,1±0,025	7,1±0,040	8,1±0,065	8,1±0,119	8,9±0,066	8,9±0,118

**d= Diámetro, h= Altura.**

Los resultados del análisis dimensional, presentados en la tabla 27, refieren un tamaño de unidad de dosificación promedio de 5,5 mm para el diámetro y de 7,7 mm para la altura de las tabletas, no se encontraron variaciones significativas respecto a la altura y al diámetro entre los lotes uno y dos de un mismo producto, sin embargo, entre marcas comerciales es posible encontrar formulaciones que presentan un tamaño de tableta ligeramente mayor.

### Valoración.

Tabla 28. Resultados encontrados referentes al contenido de sultamicilina por producto y lote evaluado.

Prueba	Resultado			
	P 1 lote 1	P 1 lote 2	P 2 lote 1	P 2 lote 2
Valoración %	105,0±0,032	105,4±0,021	101,1±0,045	101,5±0,019
Prueba	P 3 lote 1	P 3 lote 2	P 4 lote 1	P 4 lote 2
Valoración %	103,2±0,067	102,9±0,017	88,9±0,011	92,3±0,023

El procedimiento de manejo de muestras para la cuantificación se encuentra consignado en el anexo A del presente trabajo.

---

Al ser la única monografía disponible para las tabletas de sultamicilina, se eligió criterio de aceptación para el contenido, el consignado en la farmacopea japonesa edición XVII. Tres de los cuatro productos evaluados; productos uno, dos y tres, cumplen con el criterio de aceptación propuesto por la farmacopea japonesa edición XVII para tabletas de sultamicilina tosilato, cuyo valor se debería encontrar entre 90-105 %. Solamente el lote número uno del producto cuatro se encuentra fuera de especificación con un valor de 88.9 %. El lote dos del producto cuatro se encuentra muy cercano al límite inferior de especificación, con un valor de 92.3 %, sin embargo, cumple.

Es posible decir que el no cumplimiento por parte del lote uno del producto cuatro sea debido a que a la fecha del análisis se encontraba muy cercano de su fecha de caducidad, no obstante, los productos dos y tres presentaban una fecha de caducidad para el lote uno cercana a la fecha de análisis, sin embargo, los productos dos y tres cumplieron con la prueba de contenido. Se pueden atribuir los resultados encontrados para el contenido del producto cuatro, con la estabilidad inferior que presenta la sultamicilina base respecto a la sultamicilina tosilato. Lo anterior es derivado de la patente EP0092968A1, en la cual se indica que la sultamicilina tosilato presenta una mayor estabilidad y mejorías en cuanto a propiedades de flujo, que hacen de esta sal de particular de elección para la formulación de productos a base de sultamicilina.

**Fuerza de ruptura (kp).**

Tabla 29. Resultados de fuerza de ruptura encontrados.

		<b>Resultado</b>			
<b>Prueba</b>	P 1 lote 1	P 1 lote 2	P 2 lote 1	P 2 lote 2	
<b>Fuerza de ruptura (kp)</b>	33,4±2,2	26,4±0,97	36,9±6,2	37,8±5,95	
<b>Prueba</b>	P 3 lote 1	P 3 lote 2	P 4 lote 1	P 4 lote 2	
<b>Fuerza de ruptura (kp)</b>	40,3±7,3	38,9±2,7	40,4±0,79	40,0±2,7	

Esta prueba permite establecer la capacidad que posee la unidad de dosificación al ser sometida al estrés del uso diario, transporte y manipulación, con el fin de que mantenga su integridad y la elegancia que un producto farmacéutico debe poseer. La literatura indica que generalmente existe una relación entre el mecanismo de liberación del fármaco desde una matriz sólida y el valor de fuerza de ruptura que la matriz exhiba; entre más fuerza sea requerida para que la unidad de dosificación se rompa, es decir entre más dureza presente la tableta, la velocidad con la que el fármaco se libera desde la tableta es menor y viceversa. (Franco-Ospina et al., 2012)

En los resultados consignados en la tabla 29 se encontró que el producto uno, quien es el producto comparador, poseía el menor valor de fuerza de ruptura y presentaba un mayor porcentaje de liberación tanto en el ensayo de disolución como en los perfiles de disolución obtenidos. La fuerza de ruptura encontrada para el producto cuatro fue la que presentó un mayor valor, este producto además presentó el menor porcentaje de liberación tanto en las pruebas de disolución como

en los perfiles de disolución. Los productos dos y tres poseían valores de fuerza de ruptura intermedios, lo cual se vio relacionado con los valores intermedios de porcentaje de fármaco liberado.

Los resultados de la evaluación de esta característica afirman lo reportado por la literatura en cuanto a la influencia de la fuerza de ruptura y el mecanismo de liberación del fármaco.(Franco-Ospina et al., 2012).

### **Uniformidad unidades dosificación.**

Tabla 30.Resultados de la prueba de uniformidad de unidades de dosificación.

<b>Prueba</b>	<b>Resultado</b>							
	P 1 lote 1	P 1 lote 2	P 2 lote 1	P 2 lote 2	P 3 lote 1	P 3 lote 2	P 4 lote 1	P 4 lote 2
<b>Uniformidad unidades dosificación L1</b>	15,7	20,0	14,8	11,3	20,7	30,1	26,1	41,9
<b>Uniformidad unidades dosificación L2</b>	13,7	17,4	X	X	17,5	25,3	23,4	36,0

*X: No se requirió su evaluación en un nivel L2.*

La realización de este ensayo permitió establecer la variación hallada entre las unidades de dosificación de cada lote de producto evaluado. La uniformidad de unidades de dosificación se realizó por variación de peso dado las características de la formulación. En la tabla 30 se encuentran los resultados de la prueba, se encontró que solo el producto dos generaba un valor de aceptación calculado según USP, menor de 15,0 con lo cual fue el único producto que en primera instancia cumplió con el nivel L1. Para los demás productos bajo estudio fue necesario llegar hasta el nivel L2, en donde la variación proveniente de los pesos

individuales de treinta unidades de dosificación debería ser menor al valor de aceptación de 25,0 reportado por USP. Aún con la evaluación a un nivel L2, el lote dos del producto cuatro produjo un valor de variación mayor al valor de aceptación reportado, por lo cual se estableció el no cumplimiento de esta prueba por parte del producto evaluado.

La prueba de uniformidad de unidades de dosificación da cuenta del grado de homogeneidad del principio activo encontrado en las unidades de dosificación, así, valores de variación pequeños (nivel L1 y L2 según USP), indican que se ha dado la incorporación del activo a la unidad de dosificación, para el caso específico, tabletas, de manera homogénea. El no cumplimiento de esta característica implica que existe una variación significativa respecto al contenido del activo en la tableta, lo cual puede derivar en la administración incorrecta de la dosis y en por ende en algunos casos provocar fallo terapéutico.(Franco-Ospina et al., 2012; USP, 2018)

### **Disolución.**

El ensayo de disolución se llevó a cabo en dos condiciones previamente descritas en las tablas 9 y 10, las variaciones se realizaron en cuanto a la velocidad de rotación de las paletas y el medio de disolución utilizado. El criterio de aceptación para ambas condiciones fue el descrito por la farmacopea japonesa para tabletas de sultamicilina tosilato; en donde sí se encontraba una liberación mayor al 75 % en 15 minutos se consideraba como aceptable.

Tabla 31. Resultados de las pruebas de disolución en cada una de las condiciones evaluadas.

<b>Resultado</b>								
<b>Prueba</b>	<b>P 1 lote 1</b>	<b>P 1 lote 2</b>	<b>P 2 lote 1</b>	<b>P 2 lote 2</b>	<b>P 3 lote 1</b>	<b>P 3 lote 2</b>	<b>P 4 lote 1</b>	<b>P 4 lote 2</b>
<b>Disolución % pH 1,2,900 mL, paletas, 75 rpm</b>	95,4±2,4	91,4±2,1	80,5±2,5	72,4±1,9	87,0±2,8	90,72±2,0	79,4±3,0	83,1±3,6
<b>Disolución % 900 mL Agua, paletas, 50 rpm</b>	82,5±2,1	86,6±2,3	55,2±2,8	44,0±4,9	67,5±1,6	79,5±2,9	2,7±0,1	2,3±0,1

En los resultados reportados en la tabla 31 se encontraron valores de porcentaje de activo disuelto menores en la condición uno, la cual corresponde a las condiciones referidas por la monografía para tabletas de sultamicilina tosilato por la farmacopea japonesa XVII. La condición uno, implica el peor caso al que podría enfrentarse el activo en términos de solubilidad, ya que el medio, agua, exhibe un pH neutro, la molécula de sultamicilina con un pKa de 7,3 se encuentra en su mayoría como forma base, dicha forma es menos soluble, además la velocidad de rotación de 50 r.p.m. es inferior a la reportada por las guías para la evaluación de las características de los productos multifuente. Únicamente el producto uno cumplió con la prueba de disolución en la condición uno referida por la farmacopea japonesa, los demás productos exhibieron una liberación menor al valor de aceptación indicado en esta condición. El producto cuatro presentó una liberación de tan solo el 2,5 % en la condición uno, esto quizás es atribuible a la utilización de

la sultamicilina base para formular el producto, la cual como previamente se ha discutido, presenta una menor estabilidad, solubilidad y peores propiedades de flujo referentes a la formulación.

En la condición dos, donde el pH era de 1,2 la sultamicilina tosilato se encuentra en su mayoría en forma iónica y por ende más soluble en un medio polar como lo es el HCl 0,1 M, la velocidad de rotación se ajustó a lo reportado por las guías para la evaluación de los productos multifuente. La condición dos refiere características que asemejan en mayor medida a las que *in vivo* será sometido el medicamento y posteriormente el fármaco liberado, ya que se trata de un producto de liberación inmediata, en donde el objetivo es que el fármaco sea liberado desde la forma farmacéutica en un 85 % en menos de 30 minutos. Los productos así evaluados, en su mayoría exhibieron una liberación mayor al 75 % en 15 minutos, con lo cual cumplirían con el criterio de aceptación para esta prueba. No obstante, el porcentaje de fármaco liberado del lote dos del producto dos, se encuentra por debajo de la especificación en ambas condiciones evaluadas.

Una mayor o menor liberación del fármaco en un medio específico es dependiente de factores fisicoquímicos propios de la molécula, tecnológicos y de formulación del producto en cuestión.

## 4.4 Perfiles de disolución.

Los resultados de los perfiles de disolución para cada producto se muestran a continuación:

Tabla 32. Resultados de liberación (%) en pH 1,2.

% sultamicilina liberado pH 1,2								
Tiempo (min)	Producto 1		Producto 2		Producto 3		Producto 4	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5	72,7±3,5	75,0±1,6	51,1±4,1	45,8±1,6	58,1±3,2	54,8±11,5	70,6±3,3	74,5±2,1
10	92,2±1,6	89,7±1,7	72,9±2,0	64,0±2,0	79,6±3,3	81,5±6,3	79,0±2,5	84,0±2,5
15	95,4±2,4	91,4±2,1	80,5±2,5	72,4±1,9	87,0±2,8	90,7±2,0	79,4±3,0	83,1±3,6
30	95,2±2,3	89,8±2,1	86,3±2,9	82,4±2,2	89,1±2,9	89,6±1,6	80,1±2,6	82,8±2,6
45	93,0±1,9	87,8±1,6	86,6±3,3	84,7±2,3	87,3±2,3	87,2±1,8	77,8±2,1	80,5±2,5
60	90,8±2,0	85,2±1,8	84,7±2,0	84,2±2,3	85,5±2,3	84,7±1,9	76,2±2,1	77,5±2,1

Tabla 33. Resultados de liberación (%) en pH 4,5.

% sultamicilina liberado pH 4,5								
Tiempo (min)	Producto 1		Producto 2		Producto 3		Producto 4	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5	66,0±3,7	70,9±1,5	46,7±2,4	39,1±1,8	54,1±3,3	44,5±11,5	9,8±1,9	10,3±1,6
10	82,2±4,9	82,5±1,8	63,7±3,2	55,1±1,8	74,3±4,5	69,1±6,6	15,9±1,1	14,4±1,0
15	84,1±5,1	83,5±1,9	71,9±4,0	63,6±1,9	82,8±5,2	80,5±2,7	19,9±1,4	17,8±1,2
30	82,9±4,8	82,6±2,3	77,0±4,5	71,7±2,1	83,8±5,0	84,9±3,9	25,7±1,7	23,2±1,3
45	81,4±5,3	80,9±2,6	78,5±4,5	74,5±2,6	83,0±4,3	82,1±3,1	29,9±2,4	26,8±1,3
60	79,0±5,2	77,5±2,1	76,9±4,5	77,2±2,2	80,9±4,3	79,0±3,2	32,1±2,6	28,9±1,1

Tabla 34. Resultados de liberación (%) en pH 6,8.

% sultamicilina liberado pH 6,8								
Tiempo (min)	Producto 1		Producto 2		Producto 3		Producto 4	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ND	ND
5	9,1±0,60	11,7±1,2	4,3±0,41	4,7±0,40	5,18±0,6	5,70±1,3	ND	ND
10	14,3±1,4	17,3±1,9	6,0±0,65	6,7±0,50	7,58±1,0	10,73±1,5	ND	ND
15	15,6±1,5	18,3±2,1	7,0±0,70	7,6±0,60	8,92±1,1	13,52±1,6	ND	ND
30	14,1±1,5	16,3±1,6	8,5±0,74	8,2±0,80	9,99±1,2	14,49±1,6	ND	ND
45	11,7±1,2	12,1±1,4	8,4±0,70	7,9±0,80	9,42±1,0	12,94±1,7	ND	ND
60	9,3±0,90	8,6±1,2	7,6±0,67	6,9±0,80	8,34±0,90	10,28±1,6	ND	ND

ND: No Detectado.

De cada lote de producto se evaluaron 12 tabletas, los resultados se calcularon como el promedio de las unidades evaluadas. Las muestras se procesaron según lo descrito en la metodología.

A continuación, se presentan los análisis correspondientes a los resultados de los perfiles de disolución:

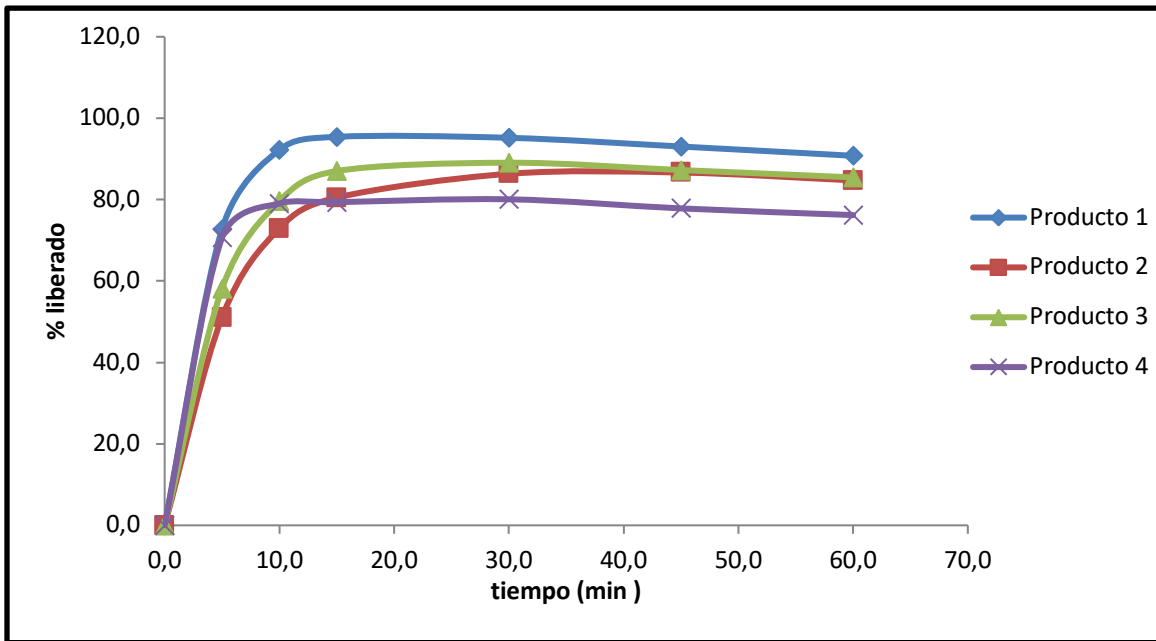
**Graficas:**

Figura 20. Perfil lote 1 pH 1,2.

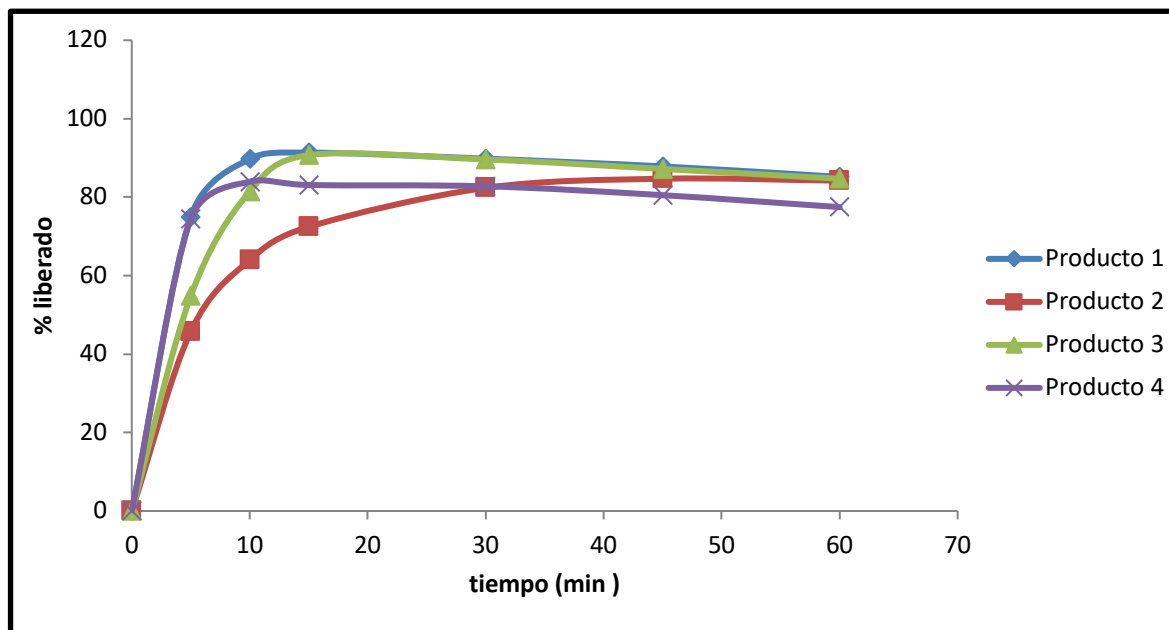


Figura 21. Perfil lote 2 pH 1,2.

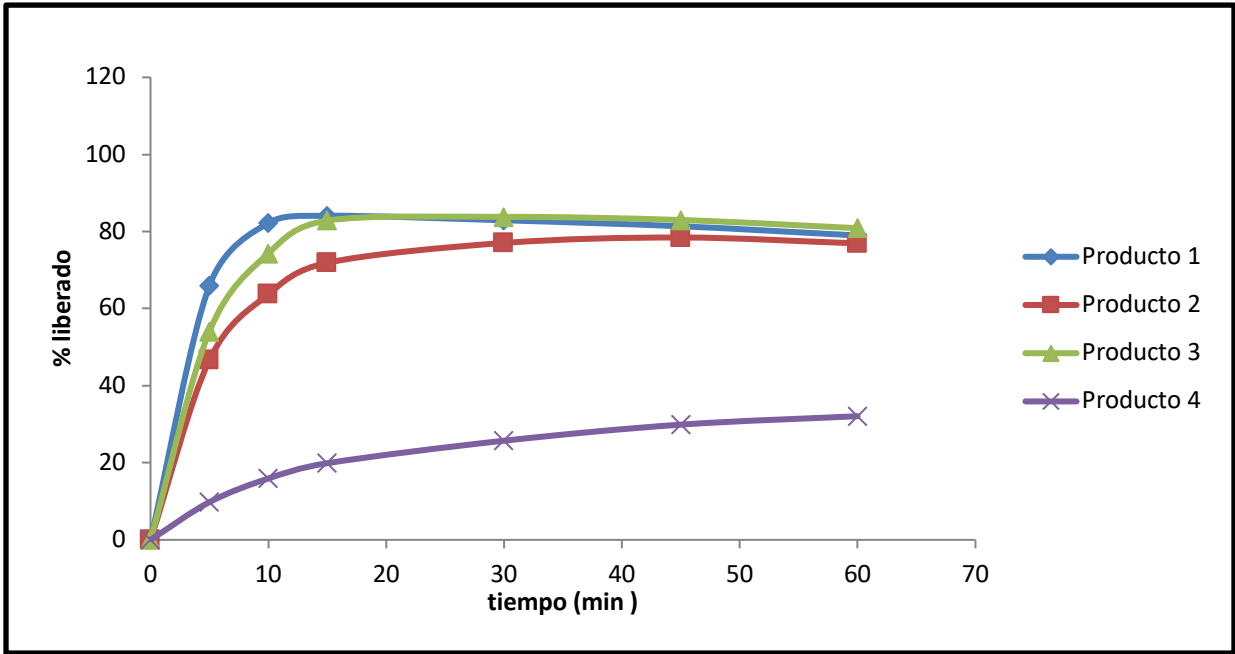


Figura 22. Perfil lote 1 pH 4,5.

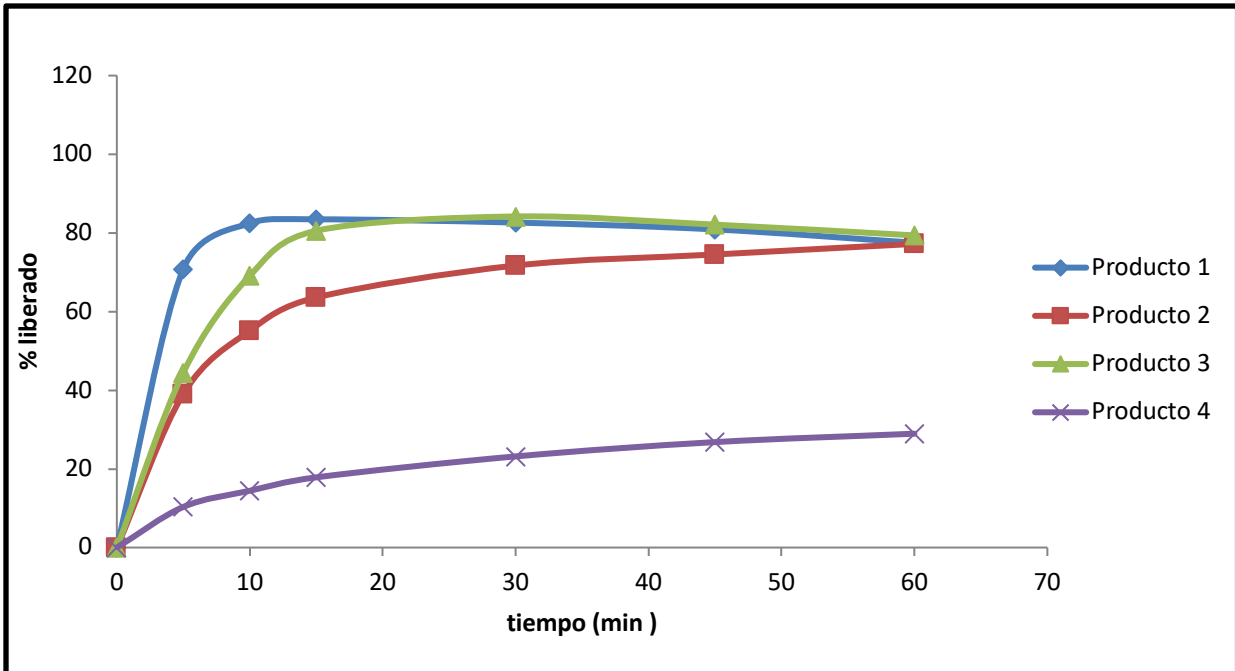


Figura 23. Perfil lote 2 pH 4,5.

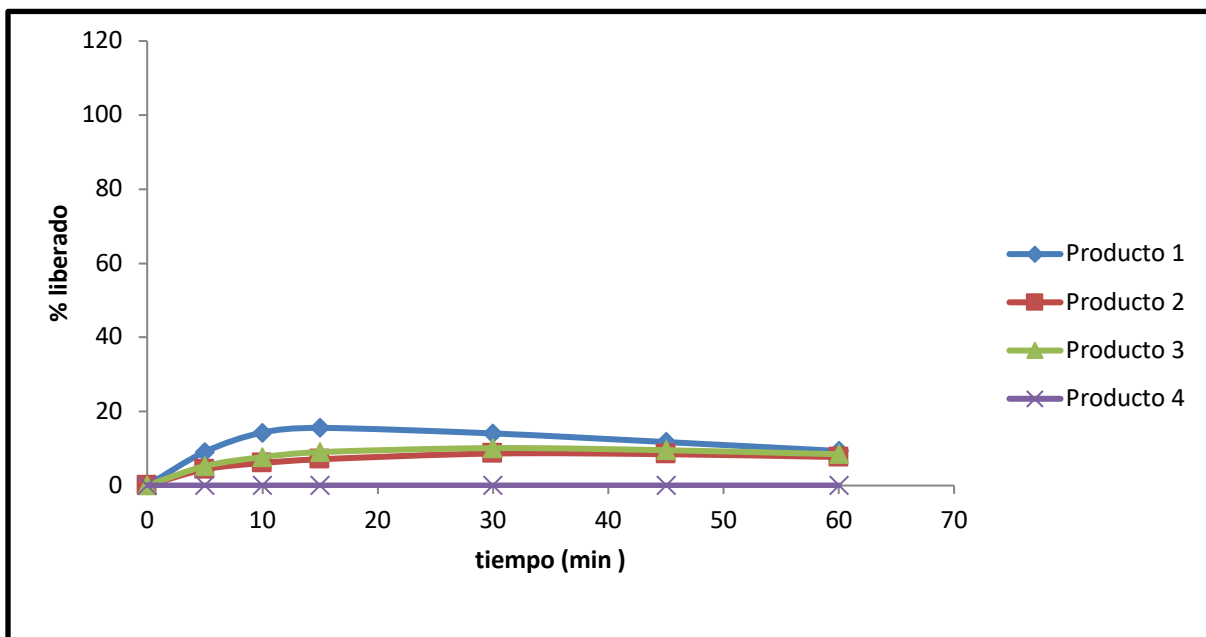


Figura 24. Perfil lote 1 pH 6,8.

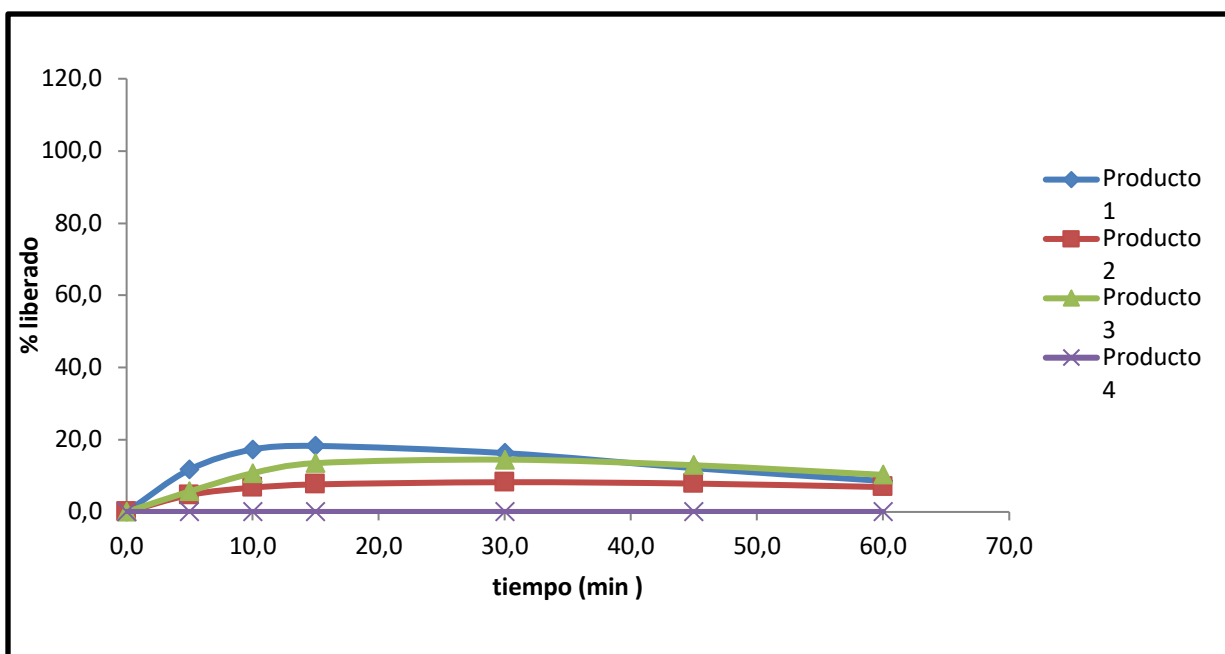


Figura 25. Perfil lote 2 pH 6,8.

Se calcularon valores de área bajo la curva ABC y la eficiencia de disolución para cada lote de los cuatro productos evaluados. Los resultados se muestran a continuación en la tabla 35.

Tabla 35. Resultados de área bajo la curva y eficiencia de disolución para cada producto evaluado.

<b>ÁREA BAJO LA CURVA</b>								
	producto 1		producto 2		producto 3		producto 4	
<b>pH</b>	lote 1	lote 2	lote 1	lote 2	lote 1	lote 2	lote 1	lote 2
<b>1,2</b>	5282,50	5040,50	4653,75	4411,00	4845,75	4875,75	4482,00	4654,25
<b>4,5</b>	4639,00	4635,75	4180,25	3879,00	4578,83	4462,83	1402,25	1268,25
<b>6,8</b>	729,75	818,50	432,00	426,25	506,70	705,90	0,00	0,00

<b>EFICIENCIA DE DISOLUCIÓN</b>								
	producto 1		producto 2		producto 3		producto 4	
<b>pH</b>	lote 1	lote 2	lote 1	lote 2	lote 1	lote 2	lote 1	lote 2
<b>1,2</b>	88,0%	84,0%	77,6%	73,5%	80,8%	81,3%	74,7%	77,6%
<b>4,5</b>	77,3%	77,3%	69,7%	64,7%	76,3%	74,4%	23,4%	21,1%
<b>6,8</b>	12,2%	13,6%	7,2%	7,1%	8,4%	11,8%	0,0%	0,0%

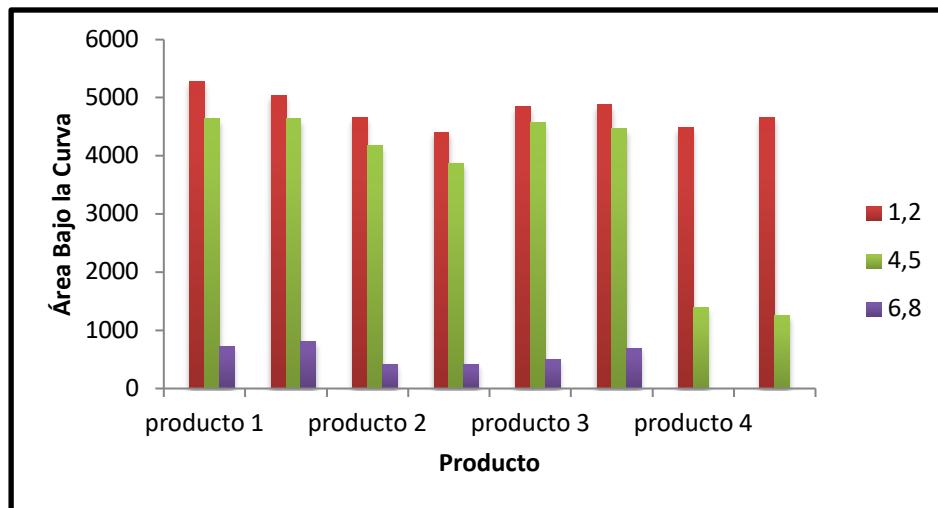


Figura 26. Área bajo la curva (ABC) para los dos lotes de cada uno de los productos evaluados en tres pH diferentes.

Comparación estadística áreas bajo la curva.

Con el fin de determinar la variación del área bajo la curva (ABC) de los lotes uno y dos de cada producto evaluado, se realizó una prueba t, con un intervalo de confianza del 95,0 % de donde se deriva la tabla 37.

Tabla 36. Resultados de la prueba t: evaluación de variabilidad interlote.

Marca	pH	Lote	ABC ± SD			
1	1,2	1	5012,4	±	194,7	
		2	5040,7	±	175,0	
	4,5	1	4638,4	±	495,3	
		2	4698,8	±	200,2	
	6,8	1	729,6	±	125,8	
		2	818,7	±	152,8	
2	1,2	1	4655,5	±	235,4	
		2	4410,7	±	201,2	*
	4,5	1	4180,4	±	409,2	
		2	3932,4	±	187,6	
	6,8	1	437,3	±	66,3	
		2	426,6	±	69,0	
3	1,2	1	4844,9	±	226,8	
		2	4875,7	±	169,6	
	4,5	1	4578,8	±	446,2	
		2	4524,1	±	253,8	
	6,8	1	512,7	±	103,8	
		2	705,9	±	145,7	**
4	1,2	1	4482,8	±	209,3	
		2	4653,2	±	220,3	
	4,5	1	1402,6	±	186,9	
		2	1286,5	±	117,4	
	6,8	1	---	±	---	
		2	---	±	---	

---: La liberación en pH 6,8 del producto cuatro fue cero. Las diferencias entre las áreas bajo la curva (ABC) entre lotes de la misma marca, se determinaron mediante prueba t de Student.  $p < 0,05$  se considera estadísticamente diferente.

La tabla 37 permite establecer que no existen variaciones significativas entre los valores de ABC para el producto uno en los tres pH evaluados, el mismo comportamiento exhibe el producto cuatro, salvo que este último no presenta

liberación en el pH 6,8, por lo cual la prueba estadística no pudo ser aplicada. Los productos dos y tres presentan una variación interlote en el pH 1,2 y 6,8 respectivamente. Mediante un análisis de ANOVA y posteriormente DUNNETT'S se determinó además de la variación de los valores de ABC entre los productos evaluados en cada pH, cuál de ellos resultaba ser estadísticamente diferente del producto uno, el cual es el producto comparador. Los resultados se evidencian en la figura 27.

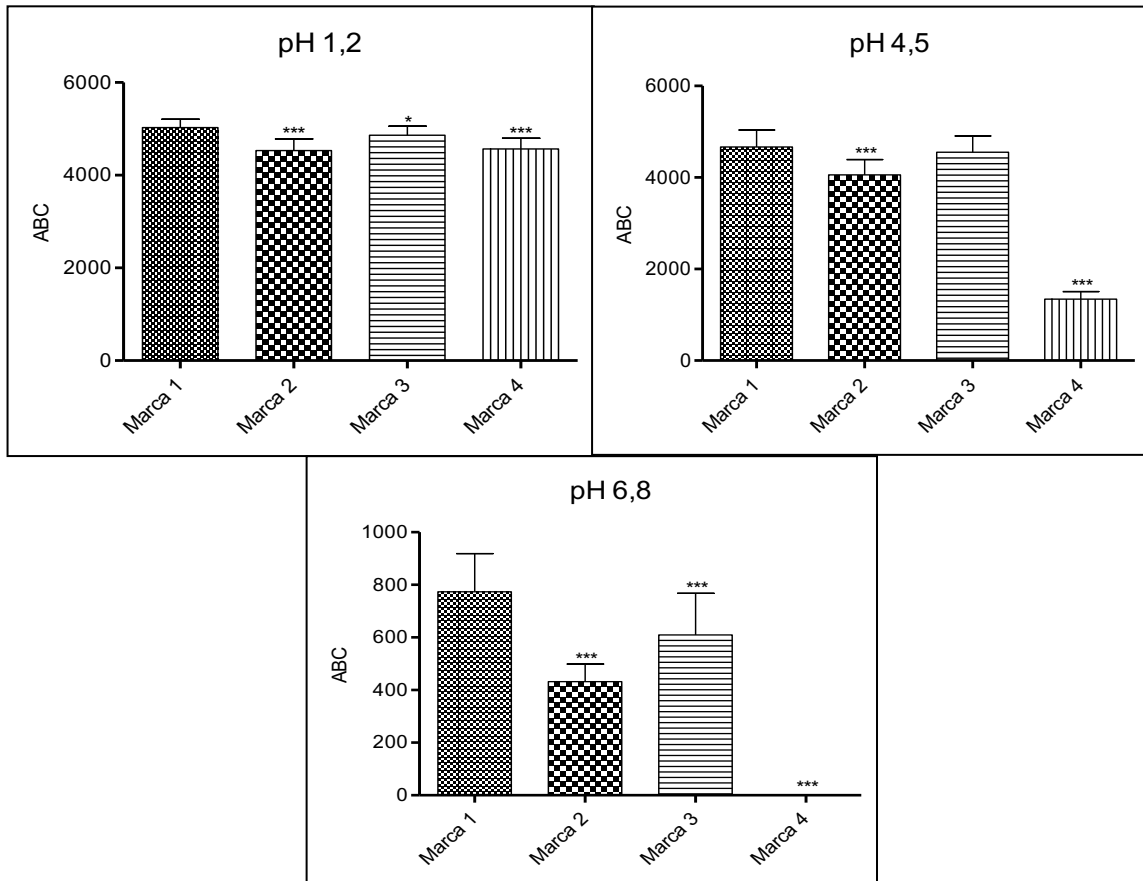


Figura 27. Variación encontrada para los cuatro productos en cada uno de los pH evaluados. Las diferencias entre las áreas bajo la curva (ABC) entre marcas se determinaron mediante análisis de varianza (Anova) y prueba de Tukey *post hoc*.  $p < 0,05$  se consideraron significativas.

Se encontró que el único producto que no presentaba una variación significativa respecto al producto uno resulto ser el producto tres, excepto en pH 1,2, donde si existe una diferencia significativa entre los valores de ABC entre el producto uno y tres. Estos resultados son congruentes con el valor encontrado para  $f_2$ , en donde el único producto estadísticamente similar resulto ser el producto tres. Los demás productos evaluados exhiben una alta variación al ser comparados frente al producto uno en todos los tres valores de pH evaluados. La figura 28 brinda un panorama global del comportamiento del ABC de cada producto evaluado en cada medio evaluado.

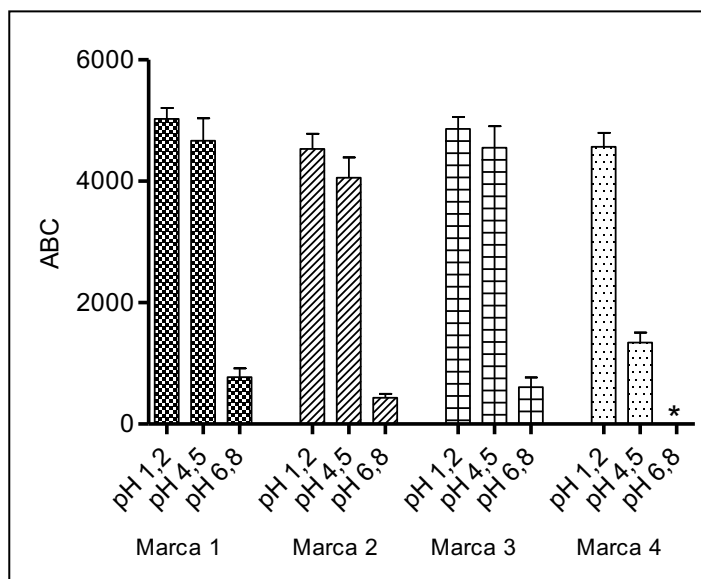


Figura 28. Comportamiento del ABC exhibido por cada producto en tres valores de pH diferentes.

Se evidencia una clara influencia del pH del medio de disolución respecto al valor área bajo la curva encontrado; a medida que aumenta el pH el valor de ABC disminuye de manera significativa. Mientras que los productos uno y tres presentan

valores de ABC similares en los tres pH evaluados, el producto 4 presenta una marcada disminución del ABC, sensible al aumento de pH del medio.

Los resultados referentes a los perfiles de disolución dan cuenta de la gran variación que presentan los productos de sultamicilina tabletas 375 mg, comercializados en Colombia, ya que solo uno de los productos resulta poseer similitud en cuanto a la cinética de liberación *in vitro*. Lo anterior es posiblemente atribuible al uso de diferentes sales como principio activo y a procesos tecnológicos involucrados.

## 4.5 Evaluación estadística.

### *Factor de similitud F2*

La tabla 36 consigna los valores de F2 para cada uno de los productos evaluados.

Tabla 37. Valores de f2 calculados para cada producto evaluado.

	<b>Factor f2</b>			
	Producto 1	Producto 2	Producto 3	Producto 4
<b>pH 1,2</b>	100,0	39,7	52,7	49,7
<b>pH 4,5</b>	100,0	39,8	52,0	11,6
<b>pH 6,8</b>	100,0	58,0	67,7	43,4

*El factor f2 para el producto 1 se determinó como control.*

Los perfiles obtenidos dan cuenta de la cinética de liberación que presenta la sultamicilina en los tres pH evaluados, los resultados de ABC evidencian que el pH donde se da la mayor liberación de la sultamicilina es el pH 1,2, seguido por el pH 4,5 y pH 6,8. Los resultados hacen posible evidenciar la marcada relación existente

entre el porcentaje liberado de fármaco y la solubilidad que presenta la molécula de sultamicilina, en cada uno de los medios evaluados.

Los perfiles permiten evidenciar que el producto cuatro exhibe un menor porcentaje de liberación en pH 4,5 y no detectable en pH 6,8, atribuible al hecho del uso de la sultamicilina en forma de base y no de la sal tosilato.

Según la normatividad si un producto presenta una liberación de más del 85 % al minuto 15 no es necesario realizar la evaluación de similitud mediante el uso del factor  $f_2$ , los resultados consignados en la tabla 32, evidencian que los únicos productos presentaron una liberación superior al 85 % en el minuto 15 fue el producto uno y tres en ambos lotes, con lo anterior es congruente con lo referido por la normatividad aplicable para este caso. El factor de similitud  $f_2$  indica que existen diferencias significativas entre los perfiles de los productos dos y cuatro frente al producto comparador, en los pH 1,2 y 4,5, mientras que en el pH 6,8 el único producto que presentó una diferencia significativa fue el número cuatro. Mediante la aplicación del factor  $f_2$  es posible afirmar que el producto tres fue el único que presenta similitud en los perfiles de liberación *in vitro*, cuando se compara con el producto innovador. Un valor de  $f_2$  por encima de 50 significa que existe una diferencia menor al 10% entre el producto evaluado y el producto comparador.

### Relación entre características biofarmacéuticas y la eficiencia de disolución.

La figura 29 relaciona las características biofarmacéuticas que poseen mayor relación con el desempeño de liberación que presentan los productos de sultamicilina evaluados.

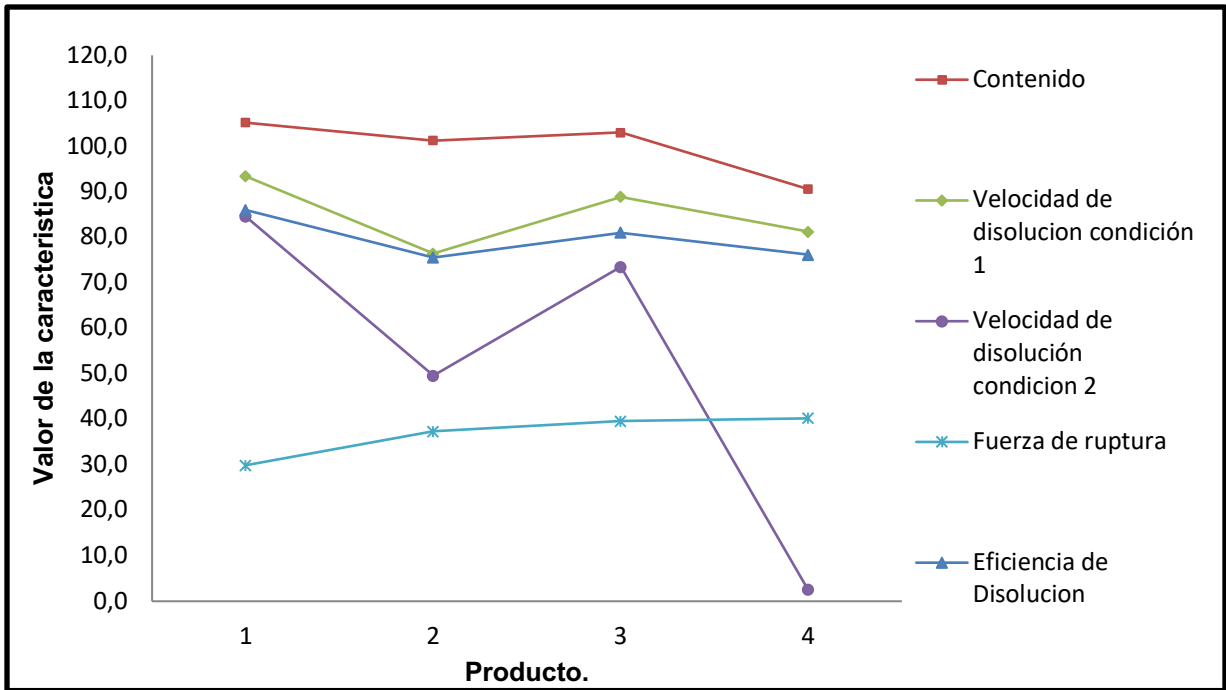


Figura 29. Comparación de los resultados encontrados.

La figura 29 evidencia que existe una relación directa entre el contenido encontrado en cada producto evaluado, la eficiencia de disolución a pH 1,2 y la velocidad de disolución en la condición uno (pH 1,2). Mientras la fuerza de ruptura resulta ser una característica inversa frente al porcentaje de sultamicilina liberada al medio desde la unidad de dosificación.

Solamente el producto comparador cumple cuando se evalúa en la condición dos de disolución, lo que da cuenta de que el comportamiento cinético de liberación *in vitro* no solamente es atribuible a la especie química con que se ha formulado el

producto; ya que tanto el producto uno, dos y tres presentaban sultamicilina tosilato como principio activo. Por lo cual los procesos tecnológicos y de formulación utilizados resultan ser de suma importancia y afectan de manera directa del desempeño del producto.

### **Implicaciones clínicas**

Gracias a los resultados obtenidos tanto de caracterización biofarmacéutica como de la obtención de los perfiles de liberación *in vitro*, permiten establecer que existen diferencias entre los productos bajo estudio.

Se conoce que la sultamicilina posee una ventana terapéutica amplia y se podría considerar que las variaciones encontradas no afectarían de manera significativa el desempeño de los productos en la práctica clínica (Betrosian & Douzinas, 2009; Ferreira et al., 2006; LÓPEZ, 1998). En clínica se hace uso de los índices farmacocinéticos y farmacodinámicos (PK/PD) que son usados como predictores para determinar la eficacia clínica de un fármaco antibiótico, así la eficacia de los fármacos betalactámicos, como es el caso de la sultamicilina, radica en que las concentraciones séricas se encuentren durante el tiempo necesario y suficiente por encima de la concentración mínima inhibitoria CIM y no de la concentración del fármaco, se puede entonces decir que la eficacia es tiempo dependiente. (Meibohm & Derendorf, 1997; Ono et al., 2016)

El panorama mostrado previamente implica que la sultamicilina debe alcanzar una concentración sérica por encima de la CIM, la cual es específica para cada

microorganismo, y mantenerse durante el tiempo requerido para ejercer su acción. Un producto que presente una liberación reducida, que contenga un fármaco que exhiba baja solubilidad y poca estabilidad en el medio fisiológico implicaría que el tiempo sobre la CIM se viera significativamente reducido y de este modo llevar a fallos terapéuticos y de manera conjunta a un aumento de la resistencia por parte de las bacterias productoras de betalactamasas.

### **Implicaciones económicas**

La caracterización biofarmacéutica de los medicamentos que contienen una molécula que por su naturaleza no requiere estudios de bioequivalencia, cobra importancia al momento de establecer la posible similitud entre el producto de referencia y uno competidor o multifuente ; ya que si se encuentra que en el mercado existe un producto que presente similitud con el producto innovador y cuyo precio sea inferior, sería éste el producto de elección en el ámbito de la adquisición de tecnologías sanitarias. Resultaría una práctica errónea realizar la adquisición de medicamentos únicamente basados en el precio que estos presenten en el mercado en donde se comercialicen, ya que como evidencian los resultados del estudio, no todos los medicamentos presentes en el mercado y que contengan la misma molécula como principio activo, presentan características biofarmacéuticas y de desempeño similares con el producto innovador.





## V. Capítulo 5. Conclusiones y Recomendaciones

### 5.1.1. Conclusiones.

De la culminación del presente trabajo se desarrolló y validó una metodología analítica HPLC UV para la cuantificación y determinación de los perfiles de liberación *in vitro* de tabletas de liberación inmediata de sultamicilina.

Se evaluaron tres productos presentes en el mercado colombiano consistentes en tabletas de liberación inmediata de sultamicilina 375 mg en cuanto a sus características biofarmacéuticas, encontrándose diferencias respecto al producto innovador referentes al contenido del activo, la uniformidad unidades de dosificación. Además, gracias a la metodología desarrollada y validada se obtuvieron perfiles de liberación *in vitro* en tres pH diferentes, en donde se encontró que solo un producto era similar en cuanto a liberación con el producto comparador.

Los resultados permiten evidenciar que la mayoría de los productos evaluados no se pueden considerar un equivalente o alternativa farmacéutica, ya que difieren en cuanto a algunas de las características evaluadas, lo anterior es debido quizás a la carencia de una monografía oficial para tabletas de sultamicilina tosilato, lo que propicia la falta de armonización en cuanto a los criterios de calidad

requeridos para los productos fabricados en el país y de ese modo se genera la variabilidad encontrada durante el estudio.





Comparación biofarmacéutica de productos multifuente de tabletas de liberación inmediata de sultamicilina, presentes en el mercado colombiano.

## **A. Anexo: Preparación de muestras.**

### *Preparación Buffer de fosfato pH 3,0.*

Se pesaron 2,7 g de Dihidrogeno fosfato de sodio mono hidratado, se transfirieron a un balón aforado de 1000 mL, se añadió 1,0 mL de trietilamina y se completó a volumen con agua tipo uno. Se sometió a agitación durante 2 minutos, posteriormente se ajustó a pH 3,0 con ácido fosfórico al 85%.

### *Preparación de fase móvil*

Para obtener 1000 mL de fase móvil, se transfirieron 650 mL de Buffer de fosfato pH 3,0 a un balón aforado de 1000 mL y se completó a volumen con Acetonitrilo grado HPLC.

### *Solución madre de sultamicilina tosilato material de referencia certificado.*

Se pesaron 10,8 mg de sultamicilina tosilato MSRC y se transfirieron a un balón aforado de 20 mL, se completó a volumen con fase móvil. Se obtuvo una solución madre con una concentración de 0,5 mg/mL.

*Preparación de los puntos requeridos para la curva de calibración.*

Se tomaron alícuotas de la solución madre de sultamicilina tosilato MSRC las cuales fueron aforadas con fase móvil, el volumen de las alícuotas, de la fase móvil y la concentración final se describe en la tabla 38.

Tabla 38. Valores de volumen y concentración requeridos para la preparación de la curva de calibración, a partir de la solución madre de sultamicilina tosilato.

<b>Punto</b>	<b>Concentración solución madre sultamicilina tosilato (mg/mL)</b>	<b>Volumen de la alícuota (mL)</b>	<b>Volumen final (mL)</b>	<b>Concentración solución sultamicilina tosilato (mg/mL)</b>
<b>1</b>	0,5	1,0	10,0	0,050
<b>2</b>		1,5		0,075
<b>3</b>		2,0		0,100
<b>4</b>		2,5		0,125
<b>5</b>		3,0		0,150

*Preparación ácido clorhídrico 0.1 M, pH 1,2.*

Se tomaron 8,3 mL de ácido clorhídrico al 37 % y se transfirieron a un balón aforado de 1000 mL, se completó a volumen con agua destilada y se sometió a agitación magnética durante 10 minutos.

*Preparación solución buffer Acetato de sodio pH 4,5.*

Se pesaron 3,0 gramos de acetato de sodio tri hidrato y fueron transferidos a un balón aforado de 1000 mL, se adicionaron 1,6 mL de ácido acético glacial y se completó a volumen con agua destilada. Se sometió a agitación magnética durante 10 minutos.

*Preparación solución buffer fosfato de potasio pH 6,8.*

Se pesaron 6,80 gramos de potasio dihidrogeno fosfato y 0,89 gramos de hidróxido de sodio, se transfirieron a un balón aforado de 1000 mL y se completó a volumen con agua destilada. Se ajustó a pH 6,8 con hidróxido de sodio 1,0 M. se sometió a agitación magnética durante 10 minutos

**Cuantificación de sultamicilina presente en las tabletas***Preparación de estándar de sultamicilina tosilato 0,10 mg/mL.*

A partir de la solución madre de sultamicilina 0,5 mg/mL, se tomó una alícuota de 2,0 mL la cual fue transferida a un balón aforado de 10,0 mL y se completó a volumen con fase móvil, de este modo se obtuvo una concentración de trabajo de 0,10 mg/ mL.

*Preparación soluciones muestra de tabletas de sultamicilina.*

A partir de los valores de los pesos promedio de 20 tabletas se calculó la cantidad de mezcla que en teoría contendría 10,0 mg de sultamicilina, la cantidad calculada fue trasferida a un balón aforado de 20,0 mL, se completó a volumen con fase móvil y se sometió a ultrasonido durante cinco minutos. Posteriormente la solución fue filtrada por una membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  y se tomó una alícuota de 2,0 mL la cual fue transferida a un balón aforado de 10, 0 mL y se completó a volumen con fase móvil, con el fin de obtener una solución de muestra que en teoría debería poseer una concentración de 0,1 mg/mL.

*Preparación placebo para determinar la exactitud.*

El método de placebo enriquecido se realizó mediante la adición de cantidades conocidas de sultamicilina tosilato material de referencia certificado a la mezcla de excipientes que se citan en la tabla 39.

Tabla 39. Cantidades de sultamicilina tosilato y excipientes.

#	INGREDIENTE	FUNCIÓN	PROPORCIÓN	CANTIDAD EN mg	para 1 g (mg)
1	Sultamicilina	Principio activo	52.1	375.12	697.02
2	Almidón de maíz	Diluyente, desintegrante, aglutinante	14	100.8	138.724
3	Estearato de magnesio	Lubricante	0,8	5.76	7.927
4	Polietilenglicol	Aglutinante	2	0.144	0.198
5	Lactosa anhidra	Diluyente.	34	244.8	336.901
		TOTAL	100.92	726.624	1000

Con el fin de obtener los tres niveles de concentración para la evaluación de la exactitud se tomaron cantidades de mezcla que teóricamente contuvieran 10,0 mg de sultamicilina y se procedió tal como se describe en *Preparación soluciones muestra de tabletas de sultamicilina.*

*Formula para el calculo de % de sultamicilina encontrado para cuantificación y disolución:*

$$\% \text{ Sultamicilina} = \left( \frac{A * B}{C} \right) \left( \frac{D}{E} \right) \left( \frac{100}{F} \right)$$

*Donde:*

*A: Promedio de áreas de la señal correspondiente a Sultamicilina base en la muestra.*

*B: Concentración estándar de sultamicilina.*

*C: Promedio de áreas de la señal correspondiente a Sultamicilina base del estándar.*

*D: Volumen Final*

*E: Volumen Alícuota.*

*F: Cantidad teórica presente de sultamicilina.*



## Bibliografía

- A, A.-j., Jum'a, S., & Karaman, R. (2014). Prodrugs Overview. In (pp. 77-102).
- Akova, M. (2008). Sulbactam-containing  $\beta$ -lactamase inhibitor combinations. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 185-188. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01847.x>
- Amidon, G. L., Lennernas, H., Shah, V. P., & Crison, J. R. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res*, 12(3), 413-420.
- Argekar, A. P., & Kunjir, S. S. (1996). Quantitative estimation of sultamicillin p-toluenesulfonate in pharmaceutical preparations by reverse-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15(3), 423-427. doi:[https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(96\)01868-7](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(96)01868-7)
- Barth, W. E., Jasys, Vytautas John. (1983). E. P. APPLICATION.
- Betrosian, A. P., & Douzinas, E. E. (2009). Ampicillin-sulbactam: an update on the use of parenteral and oral forms in bacterial infections. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 5(9), 1099-1112. doi:10.1517/17425250903145251
- Chuang, C.-Z., Ragan, F. A., & Prasad, C. (1994). Use of Triethylamine as an Ion-Pairing Reagent. *Journal of Liquid Chromatography*, 17(11), 2383-2394. doi:10.1080/10826079408013487
- Claudia Patricia Vacca González, J. F. F., Jorge A. Z. Bermúdez. (2006). Definición de medicamento genérico ¿un fin o un medio? Análisis de la regulación en 14 países de la Región de las Américas. *Rev Panam Salud Publica*, 20, 314-323.
- Colombia, M. d. S. y. P. S.-R. d. (2016). *Resolución 1124 de 2016*.
- Colombia., M. d. s. y. P. S.-R. d. (2018). Termómetro de precios de medicamentos. Retrieved from <https://www.minsalud.gov.co/salud/MT/Paginas/termometro-de-precios.aspx>
- DrugBank. (2018-2019). Sultamicillin Retrieved from <https://www.drugbank.ca/drugs/DB12127>.  
<https://www.drugbank.ca/drugs/DB12127>

- English, A. R., Girard, D., & Haskell, S. L. (1984). Pharmacokinetics of sultamicillin in mice, rats, and dogs. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 25(5), 599-602. doi:10.1128/aac.25.5.599
- Ferreira, J. B., Rapoport, P. B., Sakano, E., Kós, A. O. D. Á., Piltcher, O. B., Pignatari, S. S. N., . . . Mocellin, M. (2006). Eficácia e segurança de Sultamicilina (Ampicilina/Sulbactam) e Amoxicilina/Clavulanato no tratamento das infecções de via aéreas superiores em adultos: um estudo multicêntrico, aberto e randomizado. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, 72, 104-111. Retrieved from [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-72992006000100016&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72992006000100016&nrm=iso)
- Franco-Ospina, L. A., Matiz-Melo, G. E., & Pájaro-Bolívar, I. B. (2012). Estudio biofarmacéutico comparativo de marcas comerciales de tabletas de ciprofloxacino disponibles en el mercado colombiano. *Revista de Salud Pública*, 14, 695-709. Retrieved from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0124-00642012000400013&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-00642012000400013&nrm=iso)
- Fukutsu, N., Kawasaki, T., Saito, K., & Nakazawa, H. (2006). An Approach for Decontamination of  $\beta$ -Lactam Antibiotic Residues or Contaminants in the Pharmaceutical Manufacturing Environment. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54(9), 1340-1343. doi:10.1248/cpb.54.1340
- IMS. (2015). *The Role of Generic Medicines in Sustaining Healthcare Systems: A European Perspective*. IMS Institute for Healthcare Informatics
- Inc, P. (2009). Material safety data sheet- Sultamicillin Tosylate Tablets. In.
- INVIMA. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. Retrieved from <https://www.invima.gov.co/>
- Kumar, V. J., Gupta, P. B., Kumar, K. S. R. P., Ray, U. K., Sreenivasulu, B., Kumar, G. S. S., . . . Mukkanti, K. (2011). Identification, isolation and characterization of a new degradation product in sultamicillin drug substance. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54(3), 582-587. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.09.016>
- Laviana, L., Fernández-Marí, F., Bayod, M., & Blanco, D. (2003). HPLC for in-process control in the production of sultamicillin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31(2), 321-328. doi:[https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00642-8](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00642-8)
- Levin, A. S. (2002). Multiresistant Acinetobacter infections: a role for sulbactam combinations in overcoming an emerging worldwide problem. *Clinical Microbiology and Infection*, 8(3), 144-153. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00415.x>
- Lode, H., Hampel, B., Bruckner, G., & Koeppe, P. (1989). The pharmacokinetics of sultamicillin. *APMIS Suppl*, 5, 17-22.
- LÓPEZ, E. L. M. R., NOEMÍ A. MD. (1998). Clinical use of sultamicillin (ampicillin/sulbactam) in children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 17(3), S12-S14.

- Meibohm, B., & Derendorf, H. (1997). Basic concepts of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) modelling. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 35(10), 401-413.
- OMS. (2016). Plan de Acción Mundial sobre la Resistencia a los Antimicrobianos. In O. M. d. I. Salud (Ed.).
- Ono, A., Tomono, T., Ogihara, T., Terada, K., & Sugano, K. (2016). *Investigation of biopharmaceutical drug properties suitable for orally disintegrating tablets* (Vol. 4).
- OPS, O. P. d. I. S. (2011). *Guía para la implementación de estrategias de medicamentos genéricos en los países de América Latina y el Caribe como mecanismo para mejorar el acceso a los medicamentos*. Washington D.C. OPS © 2011.
- Phenomenex. (2007). ONYX Monolithic HPLC Columns Retrieved from <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/91f2fee6-dbda-48cb-b883-63e60293ae85.pdf>. Retrieved 2018 <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/91f2fee6-dbda-48cb-b883-63e60293ae85.pdf>
- PMDA. (2018). Pharmaceuticals and Medical Devices Agency Unasyn Tablets 375 mg Retrieved from [http://www.info.pmda.go.jp/go/pack/6131008F1030\\_2\\_07/](http://www.info.pmda.go.jp/go/pack/6131008F1030_2_07/). Retrieved 2018-2019 [http://www.info.pmda.go.jp/go/pack/6131008F1030\\_2\\_07/](http://www.info.pmda.go.jp/go/pack/6131008F1030_2_07/)
- Rogers, H. J., Bradbrook, I. D., Morrison, P. J., Spector, R. G., Cox, D. A., & Lees, L. J. (1983). Pharmacokinetics and bioavailability of sultamicillin estimated by high performance liquid chromatography. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 11(5), 435-445. doi:10.1093/jac/11.5.435
- Rojas, J. N., Sierra. . (2017). *Como Validar sus Metodologías Analíticas*.
- Sciences, N. I. o. H. (2018-2019 ). Japanese Pharmacopoeia Seventeenth Edition (JP17) Name and Structure Database. Retrieved from <http://jpdb.nihs.go.jp/jp/index.aspx>. <http://jpdb.nihs.go.jp/jp/index.aspx>
- Sklenarova, H., Chocholous, P., Koblová, P., Zahalka, L., Satinsky, D., Matysová, L., & Solich, P. (2012). *High-resolution monolithic columns - A new tool for effective and quick separation* (Vol. 405).
- USP. (2018). *U.S. Pharmacopoeia-National Formulary 41 NF 36* (Vol. 41).
- WHO. (2015). *Annex 7. Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability*.
- WHO. (2018). *GUIDELINES ON VALIDATION – APPENDIX 4 ANALYTICAL METHOD VALIDATION*. Retrieved from [https://www.who.int/medicines/areas/quality\\_safety/quality\\_assurance/28092018Guideline\\_Validation\\_AnalyticalMethodValidation-Appendix4\\_QAS16-671.pdf](https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/28092018Guideline_Validation_AnalyticalMethodValidation-Appendix4_QAS16-671.pdf)