

Estudio de bioequivalencia *in vitro* de cuatro productos de amoxicilina del mercado colombiano

Luisa Fernanda Ponce D'León* y Adriana María Jaramillo A.*

Resumen

Los estudios de bioequivalencia permiten demostrar si el principio activo tiene el mismo desempeño farmacocinético en el medicamento genérico que en el innovador, para así poderlos considerar intercambiables y garantizar que la eficacia clínica y seguridad del innovador se aplica al genérico. La amoxicilina pertenece a la clase I en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica y por lo tanto se justifica la realización de estudios de bioequivalencia por medio de perfiles de disolución. En esta investigación se efectuó un estudio de bioequivalencia *in vitro* de 4 productos de amoxicilina trihidrato del mercado colombiano en cápsulas de 500 mg. Se concluye que existe bioequivalencia entre 2 productos del estudio, por medio de perfiles de disolución *in vitro*. Sin embargo, los análisis de control de calidad de algunos de estos medicamentos permitieron detectar lotes de amoxicilina fuera de los estándares establecidos.

Palabras clave: Amoxicilina - Bioequivalencia *in vitro*

Summary

Study of *in vitro* bioequivalence for some amoxicillin products from Colombian market

Bioequivalence studies let to assume that pharmacokinetic processes of an active principle are the same in generic drugs as in their correspondent innovator drugs, they are interchangeable, and both clinical efficacy and safety of the innovator can be applied to the generic drug. In agreement with Biopharmaceutics Classification System, amoxicillin belongs to first class and therefore the execution of bioequivalence studies by dissolution profiles has been justified. An *in vitro* bioequivalence study of four commercially available amoxicillin trihydrate (500 mg capsules) preparations from Colombia was carried out in this research. By *in vitro* dissolution profiles, it was concluded from this study that 2 preparations are bioequivalent. However, the quality control analyses of some drugs permitted to detect sub-standard amoxicillin batches.

Key words: Amoxicillin - *In vitro* bioequivalence

Introducción

La detección empírica de fallas en la terapéutica con el uso de algunos medicamentos ha motivado la implementación de normas para mejorar la calidad de los productos farmacéuticos. En Colombia entes gubernamentales

como el INVIMA y la Comisión Revisora de Medicamentos son los encargados de dirigir las políticas en estos aspectos.

La amoxicilina es un antibiótico betalactámico de amplio uso en la práctica médica,

Recibido para evaluación: 10 de marzo de 2004

Aceptado para publicación: 15 de mayo de 2004

* Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.
Departamento de Farmacia
e-mail: lfponced@unal.edu.co

odontológica y veterinaria. Se ha reportado resistencia a las cepas inicialmente susceptibles (1), y esto sumado a la calidad incierta de más de 59 productos que se comercializan con este principio activo, justifican la investigación en este campo. Los estudios de biodisponibilidad nos podrían informar sobre el comportamiento de estos productos y los estudios de bioequivalencia nos garantizarían su intercambiabilidad.

Se dice que dos medicamentos son intercambiables o bioequivalentes, si siendo equivalentes farmacéuticos no difieren significativamente en sus parámetros de extensión y velocidad de absorción, cuando son suministrados en igual dosis molar y bajo condiciones experimentales similares a una muestra poblacional representativa. Si dos productos son bioequivalentes, entonces se asume que su eficacia y seguridad son similares y por lo tanto se acepta su intercambiabilidad (2). Con esta definición, se presume que esta clase de estudios debe hacerse *in vivo*, pero debido a los problemas originados en el desarrollo de estos estudios, al riesgo potencial para los voluntarios, a los altos costos y con el fin de compaginar con las políticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se están creando alternativas válidas para efectuarlos *in vitro*. En Los Estados Unidos el Centro para la Evaluación e Investigación de Medicamentos (CDER por sus siglas en inglés) componente esencial de la FDA y la Convención de la Farmacopea (USP por sus siglas en inglés) están trabajando mancomunadamente para obviar los estudios *in vivo*, creando el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (3), el que contiene los requerimientos mínimos para evaluar algunos medicamentos *in vitro*. Los estudios de bioequivalencia *in vitro* emplean perfiles de disolución comparativos los que se evalúan por métodos estadísticos para asegurar su similitud o diferencia (3).

El presente estudio tiene como objetivo fundamental comparar las biodisponibilidades *in vitro* de 4 productos de amoxicilina trihidrato (cápsulas de 500 mg) del mercado colombiano, asumiendo que si son iguales, sus efectos terapéuticos y tóxicos también lo serán.

Parte experimental

Selección de los productos

Los productos incluidos en este estudio fueron seleccionados de acuerdo a los siguientes parámetros: presentación en cápsulas de 500 mg de amoxicilina trihidrato, volumen en ventas en el año 2000, contrato con el Instituto de Seguros Sociales ISS y con la IPS de UNISALUD para el año 2001 y cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura BPM para el año 2001. Se escogen cuatro productos: la formulación de referencia designada con la letra A y 3 formulaciones de prueba, una que se comercializa como producto de marca designado como B y 2 que se comercializan con denominación genérica designados con las letras C y D respectivamente.

Control de calidad

Se realizó a 3 lotes de cada uno de los productos seleccionados los respectivos estudios rutinarios (verificación de la rotulación, prueba de hermeticidad del envase y características organolépticas) y aquellas pruebas sugeridas en la monografía de la USP 25 (identificación, cuantificación, uniformidad de dosis, determinación de humedad y pruebas de disolución) (4). Para algunas de las pruebas los productos fueron evaluados frente a patrones secundarios de amoxicilina trihidrato previamente valorados contra patrones primarios y almacenados bajo condiciones de humedad y temperatura que aseguraran su estabilidad.

Estandarización y validación del método de cuantificación de amoxicilina

Se siguen los delineamientos planteados en la USP 25 (4) (Ensayo de Categoría III) y en la norma de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) de 1994 (5). La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro con arreglo de diodos UV-VIS Hewlett Packard modelo 8452A y se evaluaron parámetros de especificidad, linealidad, exactitud, precisión, cantidad mínima detectable y cuantificable tanto para el sistema como para el método.

Selección de los lotes que entran al estudio de bioequivalencia *in vitro*

La selección del lote de comportamiento intermedio de cada producto que entra al estudio de bioequivalencia *in vitro* se realizó con base en la Guía para los estudios de Bioequivalencia de Productos Genéricos (6) y a la Guía para la Industria de Pruebas de Disolución para Formas de Dosificación Oral de Liberación Inmediata (3), publicadas por la FDA; para ello se estableció lo siguiente:

Selección del lote del producto de referencia

Por medio de los ensayos de control de calidad se seleccionaron 3 lotes del producto de referencia, los que debían ser aceptados para todos los criterios indicados en la monografía correspondiente de la USP vigente. Tomando 6 unidades de cada uno de los 3 lotes seleccionados se realizaron los perfiles de disolución con muestreo a los 0, 10, 20, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos, empleando el aparato y las condiciones indicados para la prueba de disolución en la USP 25 (4). Para este fin se empleó un equipo de disolución Hanson Research SR8 Plus de 8 vasos.

Con los datos obtenidos en los 3 lotes, se efectuó un análisis estadístico multivariado (MANOVA en SAS System) con el fin de establecer si se detecta una diferencia significativa del comportamiento de disolución entre lotes. Debido a que no se pudo evidenciar una diferencia estadísticamente significativa entre los lotes del producto de referencia, se procedió a hacer lo siguiente:

- a. Linealizar la relación entre el porcentaje disuelto acumulado (PDA) y el tiempo de disolución mediante la transformación del PDA en $\ln(100 - \text{PDA})$. Este procedimiento se debe hacer en forma independiente con cada una de las 6 cápsulas de cada lote evaluado.
- b. Hallar la pendiente k de la recta que presente la mejor correlación y obtener el valor promedio de k en cada lote.
- c. Comparar los valores de k promedio en los 3 lotes. El lote con el valor intermedio de k es seleccionado como el de referencia para el estudio de bioequivalencia *in vitro*.

Selección de los lotes de los productos de ensayo

Se sigue el mismo procedimiento indicado para el producto de referencia, aclarando que es primordial que la potencia del lote a elegir, no difiera en más del 5% de la del lote del producto de referencia seleccionado para el ensayo de Bioequivalencia

Estudio de bioequivalencia *in vitro*

Este estudio se realizó con base en la Guía para estudios de Bioequivalencia de Productos Genéricos (6) y a la Guía para la Industria de Pruebas de Disolución para Formas de Dosificación Oral de Liberación Inmediata (3) publicadas por la FDA.

Diseño experimental

Con el lote seleccionado de cada producto (referencia y prueba), se realizaron los perfiles de disolución en 12 unidades de cada lote con las condiciones de la USP 25 (4) y bajo el siguiente diseño experimental:

Diseño de tratamiento

En el que el factor de tratamiento es el lote de cada producto A, B, C y D; la variable independiente es el tiempo, la variable dependiente es el PDA y la unidad experimental es la cápsula.

Diseño de control de error

El diseño utilizado puede visualizarse en la Figura 1 y se hace de acuerdo al diseño del equipo de disolución de 8 vasos.

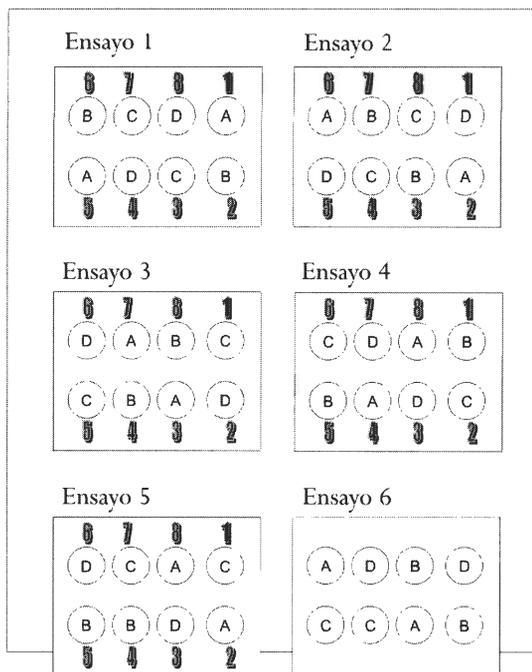


Figura 1. Diseño de control de error.

Muestreo y diseño de observación

Este tipo de ensayo es multivariado y con submuestreo puesto que se toman varias variables respuesta en el tiempo a cada unidad experimental: 0, 10, 20, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos. Además, se realizan réplicas ya que es necesario hacer 2 diluciones de la muestra tomada a los siguientes tiempos: 30, 45, 60, 75 y 90 minutos. Igualmente las lecturas de las muestras en el espectrofotómetro se repiten para luego promediarlas.

Análisis estadístico

El método independiente con factor de similitud (3) permite comparar el comportamiento del lote del producto de referencia con el del lote de un producto prueba, tomando los valores de PDA promedio (de los perfiles de disolución de las 12 cápsulas de cada lote) en cada intervalo de tiempo y calculando el factor $f1$ de diferencia y el factor $f2$ de similitud con las ecuaciones siguientes.

$$f1 = \left\{ \frac{\sum_{i=1}^n |R_i - T_i|}{\sum_{i=1}^n R_i} \right\} * 100$$

$$f2 = 50 * \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2 \right]^{-0.5} * 100 \right\}$$

Donde

N = Número de puntos

R_t = Valor de disolución promedio del lote de referencia en el tiempo t

T_t = Valor de disolución promedio del lote de prueba en el tiempo t .

Para garantizar la bioequivalencia entre un producto de referencia y el de comparación, se requiere que $f1$ sea menor a 15 y $f2$ mayor a 50. En caso de presentarse contradicción entre los resultados de $f1$ y $f2$, prima la decisión por el factor $f2$ de similitud.

Resultados y discusión

En los ensayos de control de calidad, específicamente en la prueba de disolución, se detecta que ni con el tercer requerimiento, los 3 lotes del producto A y un lote del producto B alcanzan los parámetros definidos para su aceptación (datos no mostrados). Estos análisis sugieren la necesidad de una mayor vigilancia a los medicamentos que se comercializan en el país con el fin de verificar si cumplen con los estándares de calidad. Aún así se continuaron los estudios para la selección del lote de comportamiento intermedio para cada producto, de acuerdo a los métodos ya descritos.

El análisis estadístico MANOVA no detectó diferencias significativas entre los perfiles de disolución de los lotes del producto de referencia, y con el método de las pendientes se detectó al lote A2 como el de comportamiento intermedio. Para los productos de ensayo sucedió lo mismo y se eligieron los lotes B2, C1 y D2 para el estudio de bioequivalencia *in vitro*.

Los datos promedio obtenidos a partir de los ensayos de disolución realizados en los 4 lotes escogidos (A2, B2, C1 y D2) se presentan en la Tabla 1. Se puede apreciar que el único que no cumple con el requerimiento de una disolución mayor al 80% en el tiempo 60 es el A, que en este caso es el producto de referencia. El producto D presenta valores de disolución mayores en todos los puntos de muestreo. La variabilidad de los datos representada por el CV no es mayor al 20% en los primeros puntos de muestreo, ni al 10% en los posteriores.

En la Figura 2 observamos un comportamiento similar en los 4 productos aunque la curva del producto D presenta una ligera separación de las otras 3 curvas.

El análisis estadístico mediante un modelo independiente con factor de similitud para detectar la bioequivalencia entre los 4 productos genera los resultados consignados en la Tabla 2.

Tabla 1. Promedio y CV de los perfiles de disolución realizados en el estudio de bioequivalencia *in vitro*.

Producto	Tiempo	Promedio	LC sup	LC inf	DS	CV
A	0	0.00	0.00	0.00	0.0000	0.00
	10	40.14	42.93	37.35	4.9322	12.29
	20	52.35	54.48	50.22	3.7650	7.19
	30	60.26	62.79	57.72	4.4802	7.44
	45	71.25	73.54	68.96	4.0470	5.68
	60	79.14	81.79	76.50	4.6700	5.90
	75	85.76	89.21	82.31	6.0904	7.10
	90	90.92	93.56	88.28	4.6657	5.13
B	0	0.00	0.00	0.00	0.0000	0.00
	10	41.55	44.93	38.16	5.9852	14.41
	20	54.53	57.28	51.77	4.8656	8.92
	30	63.40	66.11	60.77	4.7819	7.54
	45	73.66	76.03	71.30	4.1767	5.67
	60	81.45	83.94	78.95	4.4120	5.42
	75	88.36	90.91	85.82	4.4934	5.09
	90	93.77	96.83	90.70	5.4139	5.77
C	0	0.00	0.00	0.00	0.0000	0.00
	10	48.33	52.51	44.14	7.3981	15.31
	20	58.49	61.67	55.32	5.6152	9.60
	30	65.46	68.28	62.64	4.9869	7.62
	45	73.33	76.06	70.61	4.8142	6.56
	60	80.74	83.38	78.10	4.6694	5.78
	75	86.26	89.52	83.00	5.7658	6.68
	90	90.83	94.33	87.34	6.1721	6.79
D	0	0.00	0.00	0.00	0.0000	0.00
	10	53.83	58.33	49.33	7.9522	14.77
	20	64.37	67.77	60.98	5.9978	9.32
	30	71.43	74.86	68.01	6.0539	8.48
	45	79.06	82.55	75.57	6.1629	7.80
	60	86.09	89.63	82.55	6.2545	7.26
	75	91.75	95.55	87.94	6.7307	7.34
	90	95.92	99.72	92.11	6.7192	7.01

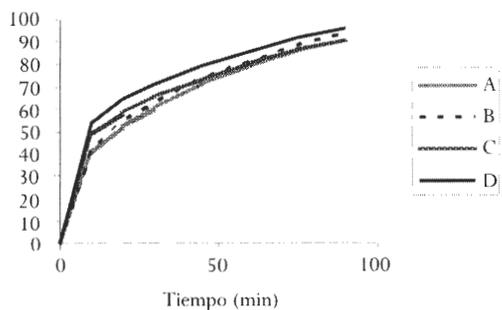


Figura 2. Perfiles de disolución promedio comparativos del ensayo de bioequivalencia *in vitro*.

Tabla 2. Determinación de la bioequivalencia entre el producto A de referencia y los productos B, C y D de comparación.

Productos comparados	Factor de diferencia f1	Factor de similitud f2	Observaciones
A-B	3.61	60.10	Bioequivalentes
A-C	6.10	44.97	No bioequivalentes
A-D	14.82	29.06	No bioequivalentes

Es importante resaltar el hecho de que a pesar de que en las pruebas individuales de disolución practicadas en A y B, el lote del producto A seleccionado no cumple con la especificación de la USP 25 (4) y el lote del producto B ensayado si la cumple, la comparación entre los 2 perfiles de disolución promedio efectuado en las condiciones indicadas no permitió detectar una diferencia estadísticamente significativa entre estos 2 lotes, razón por la que se pueden considerar bioequivalentes. Se puede concluir que la prueba de disolución como tal es altamente discriminativa entre los productos, pero el ensayo de comparación de los perfiles de disolución no detecta las diferencias que a la luz de la prueba de disolución son significativas.

Al hacer comparaciones múltiples entre los diversos productos del estudio (de todos contra todos) pero considerando a cada uno como si fuese el de referencia en cada caso, se demuestra que no se puede detectar una diferencia estadísticamente significativa entre los productos B y C.

De esta manera, podemos decir que existe intercambiabilidad entre los productos B y C, pero no entre B y D o C y D. El producto D no se considera intercambiable al producto A, B o C. Esta afirmación demuestra que los estudios de bioequivalencia no son necesariamente un parámetro de calidad, puesto que en todos los perfiles de disolución del ensayo de bioequivalencia *in*

vitro el producto D presenta un mejor desempeño en todos los puntos de muestreo.

En vista de los problemas de disolución con el producto de referencia A, se decidió hacer algunos perfiles de disolución bajo las condiciones de la USP 23 (7) con los 4 productos del estudio en la fase de selección de los lotes que entraban a la fase de bioequivalencia *in vitro*. Se pudo observar (datos no publicados) que todos los lotes cumplían con las especificaciones para la prueba de disolución. De todos modos es evidente que en las condiciones de la USP 25 (4) se discrimina mejor el comportamiento entre lotes, pero esta información no sería útil si no tuviese algún tipo de repercusión *in vivo*. Por lo general muchos investigadores han establecido que las pruebas de disolución son tan sensibles que a veces detectan diferencias significativas que no tienen ninguna importancia *in vivo* en especial si el margen de seguridad del medicamento es muy amplio (2).

Conclusiones

En este estudio se demuestra la bioequivalencia *in vitro* de la formulación del producto B (prueba) con respecto al producto A (referencia), bajo iguales condiciones de disolución y con base en un protocolo realizado a partir de los documentos internacionales que dan pautas sobre estos ensayos. Al hacer comparaciones múltiples entre los diversos productos del estudio, se demuestra que no se puede detectar una

diferencia estadísticamente significativa entre los productos B y C. En consecuencia también se les puede declarar bioequivalentes e intercambiables.

Por su facilidad de desarrollo y confiabilidad se propone la aceptación del procedimiento establecido en el presente trabajo de investigación, para evaluar la bioequivalencia *in vitro* de medicamentos que de acuerdo al sistema de clasificación biofarmacéutica sean candidatos para este tipo de ensayos.

Los resultados arrojados por esta investigación ofrecen una herramienta en la política de selección de productos farmacéuticos en las diversas instituciones del sector salud. Los criterios de calidad deben primar sobre los económicos para asegurar un mejor servicio a la población colombiana.

Bibliografía

1. J. Mensa, J.M. Gatell, M.T. Jiménez de Anta y G. Prats, "Guía de Terapéutica Antimicrobiana", 10ª Edición, Editorial Masson. Barcelona, España, 2000.
2. L. Shargel, y A.B.C. Yu. "Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics". 2a. Edición. Ed. Appleton-Century-Crofts. Norwalk, Connecticut, 1985.
3. FDA, Center for Drug Evaluation and Research CDER. "Guía para la industria. Pruebas de disolución de formas de dosificación oral sólidas de liberación inmediata". Rockville, USA. 1997. <http://www.fda.gov/cder/guidance.htm>, febrero de 1998.
4. United States Pharmacopeial Convention, Inc. United States Pharmacopeia Convention 25, the National Formulary 20. Philadelphia, USA. 2002.
5. International Conference on Harmonisation ICH. "Text on Validation of Analytical Procedures". Federal Register. 1994.
6. FDA, Center for Drug Evaluation and Research CDER. "Guideline for Bioequivalence Studies of Generic Products". Documento suministrado por la OPS seccional Bogotá.
7. United States Pharmacopeial Convention, Inc. United States Pharmacopeia Convention 23, the National Formulary 18. Philadelphia, USA. 1995.