



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Desarrollo y validación de un método para evaluar la disolución de progesterona en suspensión oleosa contenida en una cápsula blanda de gelatina

Diego Rafael Monterroza Hernández

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

2015

Desarrollo y validación de un método para evaluar la disolución de progesterona en suspensión oleosa contenida en una cápsula blanda de gelatina

Diego Rafael Monterroza Hernández

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Farmacéuticas

Director (a):

Ph.D. Yolima Baena Aristizábal

Profesora Asociada del Departamento de Farmacia

Línea de Investigación:

Farmacocinética y estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia

Grupo de Investigación:

Sistemas para Liberación Controlada de Moléculas Biológicamente Activas

(SILICOMOBA)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá D.C., Colombia

2015

De la manera más sincera,

Primeramente, a Dios quien es el guía y sustento en todo lo que hago. A mí amada esposa Alexandra y a mis nenas Emma Y Hannah, quienes son mi mayor motivo de vida y por quienes quiero seguir superándome.

A mis padres, porque han sido y serán mi mayor ejemplo de sacrificio, trabajo duro, pero sobretodo de honestidad. A mis hermanos y demás familiares

Al lugar donde laboro, Procaps S.A., porque me han permitido el desarrollo profesional y siempre creen en su gente: "Lo soñamos lo hacemos"

Agradecimientos

A Dios, nuestro creador y proveedor, porque separados de Él: nada podemos hacer.

A la profesora Yolima Baena Aristizábal, Directora del presente trabajo, por su constante guía y apoyo académico.

A Laboratorios Procaps S.A., por su apoyo no sólo con el presente trabajo, sino con la financiación de mis estudios de maestría y los de muchos otros compañeros.

A mi esposa Alexandra y a todos mis compañeros de estudios, porque de ellos también aprendí y aprendo todos los días.

A los profesores de la Universidad Nacional, quienes sacrificaron tiempo con sus familias cada fin de semana, con tal de cumplir de manera loable con su labor de enseñar.

A la Universidad del Atlántico y en especial a la profesora Nury Rebolledo de Martínez, porque su ardua gestión permitió la realización exitosa de esta maestría.

Resumen

El objetivo de este estudio fue desarrollar y validar un método de disolución para progesterona en suspensión oleosa contenida en cápsula blanda de gelatina y evaluar la sensibilidad de dicho método a modificaciones en la formulación (variación del tamaño de partícula de la fase dispersa). Se evaluaron diferentes condiciones como aparato de disolución, velocidad de agitación u oscilación, tipo y cantidad de tensioactivo y pH del medio de disolución. Las mejores condiciones de disolución fueron obtenidas utilizando el Aparato 3 de la Farmacopea de Estados Unidos, a una velocidad de 30 inmersiones por minuto, con un medio de disolución de 250 mililitros de solución tampón de fosfato a pH de 6.8 con 4% (p/v) de Lauril sulfato de sodio, utilizando mallas 30 y 40 en las parte superior e inferior de la celda, respectivamente y empleando un sinker (de QLA Lab. Accesorios, bajo el número de parte: BSK008-JP) para cada cápsula evaluada. El método demostró ser discriminatorio para las formulaciones de progesterona estudiadas. Las muestras fueron cuantificadas por un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) que fue selectivo, lineal, exacto y preciso en un rango de concentración de 24 a 144 microgramos por mililitro.

Palabras clave: Progesterona, Disolución, Cápsula Blanda de Gelatina, Validación, Aparato 3 de la USP.

Abstract

The objective of this study was to develop and validate a dissolution method for progesterone as an oily suspension contained in a soft gelatin capsule, and to evaluate the sensitivity of the method to changes in formulation (differences in particle size distribution of the suspended progesterone). Different conditions were evaluated including dissolution apparatus, apparatus speed or oscillation, type and amount of surfactant, pH of the dissolution medium. The best dissolution conditions were obtained using the apparatus 3 of the U.S. Pharmacopoeia, at a rate of 30 dips per minute, using 250 ml of pH 6.8 phosphate buffer containing 4% (w/v) of sodium lauryl sulphate, using 30 and 40 mesh screen at top and bottom of the sample cell, respectively. Sinkers (from QLA Lab. Accesories, part numebr: BSK008-JP) needs to be used for each capsule. The proposed dissolution method was able to discriminate among the different progesterone formulations evaluated. Samples were quantified by a liquid chromatography method (HPLC, for its acronym in English) that was selective, linear, accurate and precise in a concentration range of 24 to 144 micrograms per milliliter.

Keywords: Progesterone, Dissolution, Soft Gelatin Capsule, Validation, USP Apparatus 3.

Contenido

Contenido

1. Aspectos Teóricos	5
1.1 Progesterona.....	5
1.1.1 Historia	6
1.1.2 Acciones fisiológicas y farmacológicas	7
1.1.3 Aspectos biofarmacéuticos	9
1.1.4 Uso de cápsulas blandas para mejorar absorción oral.....	10
1.1.5 Aspectos farmacocinéticos	12
1.2 Ensayos de disolución.....	13
1.2.1 Aparatos de disolución.....	15
2. Objetivos.....	24
2.1. General.....	24
2.1. Específicos	24
3. Parte Experimental.....	25
3.1 Materiales	25
3.2 Equipos	26
3.3 Metodología	27
3.3.1 Desarrollo y validación de la metodología analítica.....	27
3.3.2 Determinación de condiciones sumidero (condiciones sink).	29
3.3.3 Selección del Aparato de Disolución.....	31
3.3.4 Selección de condiciones de disolución.....	32
3.3.5 Evaluación del poder discriminatorio del método	34
4. Resultados y discusión	36
4.1 Desarrollo y validación de la metodología analítica	36
4.2 Determinación de condiciones sumidero.	40
4.3 Selección del aparato de disolución.	45
4.4 Selección de condiciones de disolución.	49
4.5 Evaluación del poder discriminatorio del método.....	55
4.5.1 Descripción de los lotes utilizados.	55
4.5.2 Resultados de Bioequivalencia.	56
4.5.3 Resultados <i>in vitro</i> : perfiles de disolución.	57
4.5.4 Interpretación de los resultados	62
5. Conclusiones y recomendaciones.....	66
5.1 Conclusiones.....	66
5.2 Recomendaciones.....	68

6. Bibliografía..... 83

Lista de figuras

Figura 1-1: Estructura química de la progesterona	5
Figura 1-2 Especificaciones para eje y canastilla del Aparato 1. (Tomado de US Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 38, NF 33, 2016).	17
Figura 1-3 Especificaciones para la paleta de Aparato 2. (Tomado de US Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 38, NF 33, 2016).	18
Figura 1-4 Especificaciones para celdas y vasos del Aparato 3. (Tomado de US Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 38, NF 33, 2016).	21
Figura 1-5 Aparato 4 operado en modo abierto. (Tomado de US Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 38, NF 33, 2016).	22
Figura 1-6 Aparato 4 operado en modo cerrado. (Tomado de US Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 38, NF 33, 2016).	22
Figura 3-1 Diseño experimental utilizado para la selección de las condiciones de disolución en el aparato 3.	33
Figura 4-1 Cromatograma típico con las condiciones cromatográficas seleccionadas.	37
Figura 4-2 Relación entre concentración de LSS y condiciones sumidero para 250 mL de medio.	43
Figura 4-3 Relación entre concentración de LSS y condiciones sumidero para 900 mL de medio.	44
Figura 4-4 Perfil de disolución de progesterona 200 mg, en Aparato 1 (150 rpm) y Aparato 2 (100 rpm); utilizando 900 mL de buffer fosfato pH 6.8 con 4% de LSS.	47
Figura 4-5 Perfil de disolución de progesterona 200 mg, en Aparato 3, 40 inmersiones por minuto); utilizando 250 mL de buffer fosfato pH 6.8 con 4% de LSS.	47
Figura 4-6 Sinkers utilizados durante el diseño experimental.	51
Figura 4-7 Diagrama que muestra la magnitud y signo del efecto de cada variable sobre la respuesta.	52
Figura 4-8 Perfil de disolución obtenido para cada uno de los lotes evaluados, utilizando la metodología de disolución propuesta.	60
Figura 4-9 Efecto del tamaño de partícula en la viscosidad.	63
Figura 5-1 Cromatograma del Placebo.	70
Figura 5-2 Cromatograma de la Solución Estándar.	70
Figura 5-3 Diagrama de residuales para la linealidad del método	73

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1 Aparatos de disolución para formas farmacéuticas sólidas orales incluidos en las farmacopeas cubiertas por ICH.	15
Tabla 1-2 Dimensiones de los vasos utilizados para Aparato I, de acuerdo a USP.	17
Tabla 3-1: Medios de disolución utilizados para la evaluación de selectividad en las condiciones cromatográficas iniciales.	28
Tabla 3-2: Medios evaluados para condiciones de sumidero, cuando el solvente utilizado fue agua.	29
Tabla 3-3: Medios evaluados para condiciones de sumidero, cuando el solvente utilizado fue jugo gástrico simulado, sin enzimas (JGS).	30
Tabla 3-4: Medios evaluados para condiciones de sumidero, cuando el solvente utilizado fue tampón de acetato de pH 4.5 (ACE).	30
Tabla 3-5: Medios evaluados para condiciones de sumidero, cuando el solvente utilizado fue tampón fosfato de pH 6.8 (FOS).	31
Tabla 4-1 Condiciones cromatográficas HPLC para el análisis de muestras de disolución.	36
Tabla 4-2 Resumen de resultados de la validación del método de análisis por HPLC.	38
Tabla 4-3 Datos de solubilidad en equilibrio para progesterona y establecimiento de condiciones sumidero, para 250 mL y 900 mL de varios medios con cantidades crecientes de LSS a 37°C (n=2).	40
Tabla 4-4 Perfil de disolución de progesterona 200 mg, en Aparato 1, con 900 mL de buffer fosfato pH 6.8 con 4% de LSS, operado a 150 rpm.	45
Tabla 4-5 Perfil de disolución de progesterona 200 mg, en Aparato 2, con 900 mL de buffer fosfato pH 6.8 con 4% de LSS, operado a 100 rpm.	46
Tabla 4-6 Perfil de disolución de progesterona 200 mg, en Aparato 3, con 250 mL de buffer fosfato pH 6.8 con 4% de LSS, operado a 40 inmersiones por minuto.	46
Tabla 4-7 Variables seleccionadas para el diseño experimental.	49
Tabla 4-8 Resultados obtenidos para el diseño experimental.	52
Tabla 4-9 Condiciones seleccionadas para el método de disolución.	54

Tabla 4-10 Datos de los lotes de referencia y prueba utilizados en la evaluación del poder discriminatorio del método.....	56
Tabla 4-11. Resumen de resultados para los estudios de bioequivalencia de los lotes Prueba 1 y Prueba 2 contra el lote Referencia.	57
Tabla 4-12 Resultados individuales de 12 cápsulas del lote Referencia usando la metodología de disolución propuesta.	58
Tabla 4-13 Resultados individuales de 12 cápsulas del lote Prueba 1 usando la metodología de disolución propuesta.	58
Tabla 4-14 Resultados individuales de 12 cápsulas del lote Prueba 2 usando la metodología de disolución propuesta.	59
Tabla 4-15 Resultados de factor de similitud (f2) y diferencia (f1) para cada una de las posible comparaciones entre los tres lotes evaluados.	61
Tabla 4-16 Resultados de viscosidad promedio para las suspensiones de los productos.	63
Tabla 5-1 Resultados de Linealidad del Método.	72
Tabla 5-2 Análisis de Varianza De La Linealidad Del Método.....	74
Tabla 5-3 Resultados de exactitud (recuperación).....	75
Tabla 5-4 Resultados del ensayo de exactitud (efecto del filtro)	76
Tabla 5-5 Resultados de Precisión Instrumental.....	77
Tabla 5-6 Resultados de precisión del método (repetibilidad).....	78
Tabla 5-7 Resultados de precisión intermedia	78
Tabla 5-8 Resultados de estabilidad de la muestra analítica	80
Tabla 5-9 Resultados de Robustez.....	81

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LSS	Lauril Sulfato de Sodio
rpm	Revoluciones por minuto
USP	United States Pharmacopeia

Introducción

La progesterona (pregn-4-en-3,20-diona), es el principal progestágeno humano de origen natural, y en su mayoría es sintetizada por el ovario y la placenta, aunque también puede ser sintetizada por el hígado y las glándulas adrenales (L.J. Roberts II, 2001). Los progestágenos presentan acciones fisiológicas y farmacológicas sobre el sistema neuroendocrino, el sistema reproductor, las glándulas mamarias y el sistema nervioso central, entre otros (M.I. Whitehead, 1980).

Tradicionalmente, se aceptaba que la progesterona tenía muy poca actividad farmacológica por vía oral, debido a que cuando se administra por esta vía, experimenta alta degradación por efecto del metabolismo hepático de primer paso (V. Pucci, 2003). Por esta razón, la progesterona era usualmente administrada como una solución oleosa para uso intramuscular, como gel vaginal, pesarios o como supositorios; vías que resultaban poco aceptadas por los pacientes y por lo tanto no garantizaban el cumplimiento de la terapia requerida (J.T. Hargrove, 1989). Sin embargo, debido a que en la década de los 80's aparecieron diversos reportes que evidenciaban el hecho que la absorción oral de progesterona mejoraba por el tamaño de partícula y la formulación (V. Pucci, 2003), (Z. Chakmakjian, 1987), (F.A. Kind, 1987), (M.Cheema, 1987), una formulación oral con adecuada biodisponibilidad llegó a estar disponible a principios de la década de los 90 (V. Pucci, 2003), la cual mostró ser efectiva principalmente para el tratamiento del síndrome premenstrual (E.W. Freeman, 1995). La formulación consistía de progesterona micronizada suspendida en una base oleosa constituida por una mezcla de aceite de maní y lecitina de soya. El producto final era una cápsula blanda de gelatina, que estaba disponible en concentraciones de 100 y 200 mg.

Debido a que la disolución del activo desde su sistema de entrega, influye significativamente en la biodisponibilidad y desempeño clínico del medicamento, el ensayo de disolución de formas farmacéuticas sólidas ha llegado a ser una de las especificaciones más importantes a ser evaluadas en un medicamento, tanto en la fase de desarrollo como

en la fase de manufactura comercial (R. Krishna, 2008); y, debido a que no hay otro ensayo de desempeño *in vitro* con tal relación al desempeño *in vivo*, los ensayos de disolución y de liberación del fármaco a partir del medicamento, son un requisito regulatorio indispensable para el desarrollo y aprobación de todas las formas sólidas orales. Además de los anteriores beneficios, los ensayos de disolución permiten la evaluación *in vitro* del efecto que las propiedades biofarmacéuticas del principio activo, de la formulación y del método de manufactura; tienen sobre la cantidad de principio activo liberado desde el medicamento y la velocidad con que lo hace (Y. Qiu, 2009), lo que permite el control lote a lote de atributos de calidad del producto que no son detectados por otros ensayos comúnmente realizados como la valoración o la uniformidad de contenido.

La farmacopea de Los Estado Unidos (USP por sus siglas en inglés) en su capítulo general <711>: “Disolución”, describe los diferentes aparatos a ser usados en los ensayos de disolución; las recomendaciones de esta farmacopea fueron recientemente armonizadas con las que para el mismo tema tienen la farmacopea europea (EP) y la farmacopea japonesa (JP). Adicionalmente, existen guías para la industria emitidas por diferentes organismos reguladores, (FDA Guidance for Industry: Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms, 1997) e incluso artículos donde un autor o asociación expresa su posición sobre el tema de disolución en general o una aplicación específica (Federation International of Pharmaceutique. FIP Guidelines for dissolution testing of solid oral products, 2001).

La mayoría de las pruebas de disolución que aparecen en la USP, para tabletas y cápsulas de liberación inmediata o modificada, utilizan el aparato 1 o 2 (canastillas o paletas, respectivamente). Sin embargo, considerando que el producto que se estudia en la presente investigación es el de cápsulas blandas que contienen progesterona en una matriz oleosa, una suspensión semifluida del principio activo en una base oleosa, podrían existir diversos problemas en el desarrollo de un método de disolución para este medicamento utilizando los aparatos anteriormente mencionados; estos problemas incluyen: (a) que la fase oleosa forme una capa separada en la parte superior del medio de disolución, o (b) aparición de gotas de aceite suspendidas en el medio. Todo esto puede afectar negativamente la liberación del principio activo y causar problemas con el muestreo y cuantificación de las cantidades disueltas, especialmente al inicio del ensayo de disolución (J. Hu, 2005).

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo y validación de un método de disolución para progesterona 100 y 200 mg/cápsula en una base oleosa contenida en cápsula blandas de gelatina. Se evaluaron diferentes medios de disolución con cantidades variables de diversos tensioactivos, diferentes aparatos de disolución de la USP y se desarrolló y validó un método cromatográfico para la cuantificación de la progesterona en las muestras de disolución. Al final, se evaluó la capacidad del método para detectar cambios en la velocidad y magnitud de la disolución de las cápsulas de progesterona, debidos a modificaciones en la formulación y/o parámetros de manufactura del producto.

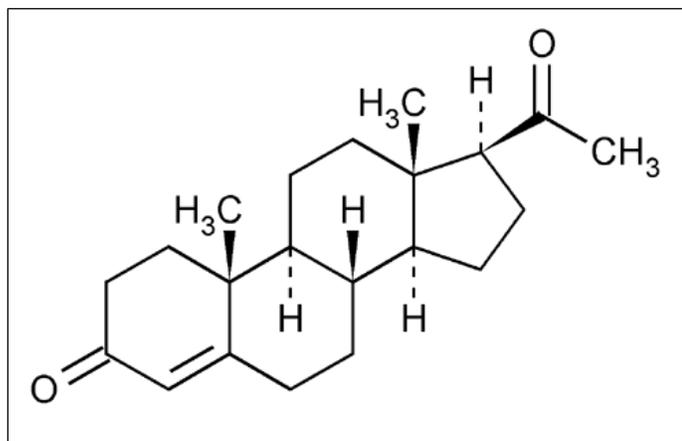
1. Aspectos Teóricos

1.1 Progesterona

La progesterona es secretada por los ovarios, principalmente a partir del cuerpo amarillo, durante la segunda semana del ciclo menstrual; aunque la secreción en realidad empieza justo antes de la ovulación, a partir del folículo que está destinado a liberar el óvulo. La formación de progesterona a partir de precursores esteroides ocurre también en ovarios, pero también en los testículos, corteza suprarrenal y placenta (L.J. Roberts II, 2001).

La progesterona (pregn-4-en-3,20-diona) se presenta como un polvo blanco cristalino en dos formas cristalinas; prismas ortorrómbicos y agujas ortorrómbicas. Su fórmula molecular es $C_{21}H_{30}O_2$ y su estructura química se muestra en la [Figura 1-1](#) (US Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 38, NF 33, 2016).

Figura 1-1: Estructura química de la progesterona



Se encuentran cinco formas polimórficas de progesterona; las cuales difieren en sus puntos de fusión. El polimorfo I (o forma alfa), funde entre 126 y 131°C; el polimorfo II (o forma beta), funde a aproximadamente 121°C. Los polimorfos III y V son obtenidos por una segunda fundición del polimorfo II. El polimorfo IV funde a aproximadamente 106°C y raras veces es encontrado, por último, el polimorfo V funde a aproximadamente 100°C (R. Duclos, 1991).

El polimorfo recomendado para uso en productos farmacéuticos es el I (forma alfa), y por esta razón, la USP especifica un rango de fusión entre 126 y 131°C como una prueba de rutina para el análisis del principio activo.

De acuerdo a la USP, la progesterona es prácticamente insoluble en agua, soluble en alcohol, acetona y dioxano; pero es escasamente soluble en aceites vegetales (US Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 38, NF 23, 2016). El coeficiente de reparto octanol-agua ($\log K_{ow}$) es de aproximadamente 3.9 (O'Neil., 2006).

1.1.1 Historia

En el año de 1933, Corner y Allen aislaron una hormona a partir de los cuerpos amarillos de cerdas, y la denominaron "*progestágeno*". Al siguiente año, varios grupos en Europa aislaron el mismo compuesto y lo denominaron "*lúteo-esterona*", al desconocer el nombre previo asignado por Corner y Allen. Esta diferencia en nomenclatura se resolvió en 1935, en una reunión social en Londres, organizada por el famoso farmacólogo inglés Sir Henry Dale, quien ayudó a convencer a las dos partes de que el nombre "*progesterona*" era una convención adecuada que incorporaba elementos de las dos designaciones previas. Los estudios posteriores sobre el compuesto aislado, fueron muy difíciles al principio, debido a la dificultad de obtener cantidades adecuadas a partir de fuentes animales (orina especialmente).

Los precios de la progesterona llegaron a ser de hasta 1000 dólares por gramo que para su época (década de los 30s), resultaron ser astronómicos. Además, la utilidad farmacológica de la progesterona quedó limitada por el hecho de que, al menos con las

formulaciones disponibles en esa época, no tenía actividad significativa por vía oral, debido al extenso metabolismo hepático de primer paso (L.J. Roberts II, 2001).

Las dificultades anteriores sólo se superaron gracias a los avances que trajeron los trabajos de varios químicos brillantes (Goldzieher, 1989). El primero de los avances fue la síntesis de progesterona a partir del producto vegetal diosgenina efectuada por Russel Marker durante la década de los 40s; esta síntesis permitió la obtención de cantidades adecuadas, económicamente viables y libres de contaminación transversal (lo que ocurría con la síntesis a partir de materiales de origen animal) de la progesterona. El segundo avance, consistió en la síntesis de los primeros progestágenos activos por vía oral: los denominados compuestos “19-nor”, que incluían la noretindrona (llevada a cabo por Carl Djerassi en Syntex) y de su isómero estructural noretindrel (realizada por Frank Colton en Searle). Este segundo avance fue quizás uno de los más relevantes de su tipo durante el siglo XX, ya que sentó las bases para la fabricación de los primeros anticonceptivos orales eficaces, medicamentos que han tenido enorme efecto en la sociedad moderna (L.J. Roberts II, 2001).

1.1.2 Acciones fisiológicas y farmacológicas

La progesterona ejerce su acción principal a través del receptor de progesterona intracelular, aunque se ha postulado sobre un receptor de progesterona unido a la membrana (M. Luconi, 1998), (S. Jang, 2005). Además, la progesterona es un antagonista muy potente del receptor de mineralcorticoides (el receptor de la aldosterona y otros mineralocorticoides). La progesterona previene la activación de los receptores de mineralcorticoides al unirse a estos receptores con una afinidad que supera incluso a la de la aldosterona y otros corticosteroides como el cortisol y la corticosterona (R. Rupprecht, 1993). Algunas de las acciones fisiológicas y farmacológicas de la progesterona se resumen a continuación (L.J. Roberts II, 2001):

Acciones neuroendocrinas

La progesterona que se produce durante la fase luteínica del ciclo menstrual tiene dos efectos fisiológicos principales: primero, la disminución de la frecuencia del generador de impulsos hipotalámicos y segundo, el aumento de la amplitud de los impulsos de hormona luteinizante liberados a partir de la hipófisis (L.J. Roberts II, 2001).

Aparato reproductor

La progesterona liberada durante la fase luteínica del ciclo menstrual disminuye la proliferación endometrial impulsada por estrógenos, lo que a su vez conduce al desarrollo de un endometrio secretor. Al final del ciclo, la cantidad de progesterona producida en el cuerpo lúteo disminuye y este es el principal detonante para la finalización de un ciclo menstrual. La progesterona también influye sobre las glándulas endocervicales, y la abundante secreción acuosa de las estructuras estimuladas por estrógenos se modifica hasta ser un material escaso y viscoso. Las acciones anteriores, junto con otras menos conocidas, disminuyen la penetración de los espermatozoides en el cuello uterino (L.J. Roberts II, 2001).

Glándulas mamarias

Durante el embarazo, y en menor grado durante el transcurso de la fase luteínica del ciclo menstrual, la progesterona, junto con los estrógenos, desencadena la proliferación de los ácinos de las glándulas mamarias. Hacia el final del embarazo, los ácinos se llenan de secreciones y la vasculatura de la glándula se halla muy aumentada (L.J. Roberts II, 2001).

Sistema nervioso central

Si se mide la temperatura corporal con sumo cuidado, a diario, durante el ciclo menstrual normal, puede notarse un incremento de alrededor de 0.56°C a la mitad del ciclo; esto se correlaciona con la ovulación. El aumento de temperatura persiste durante lo que resta del ciclo hasta el inicio del flujo menstrual. Está claro que dicho incremento se debe a la progesterona, como puede mostrarse mediante administración de la hormona (L.J. Roberts II, 2001).

Glándulas mamarias

Los progestágenos poseen muchos efectos metabólicos. La progesterona en sí incrementa las concentraciones basales de insulina y el aumento de esta última luego de ingestión de carbohidratos, pero normalmente no causa un cambio de la tolerancia a la glucosa. Sin embargo, la administración a largo plazo de progestágenos más potentes, como norgestrel, puede disminuir la tolerancia a la glucosa. La progesterona estimula la actividad de lipoproteínas y parece aumentar el depósito de lípidos. Se ha reportado que la progesterona y sus análogos como la medroxiprogesterona generan acciones nulas o

reducciones moderadas de las concentraciones plasmáticas de lipoproteínas de alta densidad (L.J. Roberts II, 2001).

1.1.3 Aspectos biofarmacéuticos

El sistema de clasificación biofarmacéutica (SCB) fue presentado por Gordon Amidon y sus colaboradores en el año 1995 (G. Amidon, 1995), como una herramienta científica que permitía clasificar los fármacos basados en su solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal, de la siguiente forma:

Fármacos Clase I: alta solubilidad y alta permeabilidad.

Fármacos Clase II: baja solubilidad y alta permeabilidad.

Fármacos Clase III: alta solubilidad y baja permeabilidad.

Fármacos Clase IV: baja solubilidad y baja permeabilidad.

Cuando se combina esta clasificación con la disolución del medicamento que contiene el fármaco, el SCB llega a tener en cuenta los tres principales aspectos que gobiernan la velocidad y magnitud de la absorción oral de un fármaco: **(a)** disolución del fármaco desde el medicamento que lo contiene, **(b)** solubilidad del fármaco, y **(c)** permeabilidad del fármaco. Esto permite que el SCB pueda ser usado para justificar bioexenciones para la aprobación medicamentos. Así, cuando la disolución *in vivo* de un medicamento oral de liberación inmediata es rápida (no menos del 85% en 30 minutos) o muy rápida (no menos del 85% en 15 minutos) en relación con el vaciado gástrico y el fármaco es de alta solubilidad, es improbable que la velocidad y la magnitud de la absorción del fármaco contenido en ese medicamento dependa de la velocidad de disolución y/o el tiempo de tránsito en el tracto gastrointestinal (Food and Drug Administration, 2015). Bajo tales circunstancias, la demostración de biodisponibilidad *in vivo* o bioequivalencia pudiera no ser necesaria (bioexención) para medicamento que contienen fármacos Clase I o Clase III, siempre que los excipientes utilizados no afecten significativamente la absorción del fármaco (L.X. Yu, 2002).

La mayoría de agencias regulatorias coinciden con el concepto de FDA (Food and Drug Administration) de aceptar posibles bioexenciones solo en el caso de fármacos Clase I o Clase III (alta solubilidad), aunque la Organización Mundial de la Salud también contempla

una posible bioexención en el caso de fármacos Clase II, cuando éstos sean ácidos débiles en un medicamento que garantiza al menos una rápida disolución; ya que de este modo al llegar al intestino delgado, su disolución sería muy rápida (el pH favorecería la rápida disolución de ácidos débiles como el ibuprofeno) (Series, 2006).

Además de los casos en los que los excipientes puedan influir en la absorción del fármaco, existen otras situaciones a la opción de una bioexención basada en el SCB para fármacos Clase I o Clase III. Estas situaciones incluyen: fármacos con rango terapéutico estrecho y productos diseñados para disolverse en la cavidad oral.

Aunque progesterona no es considerado un fármaco de rango terapéutico estrecho ni tampoco el medicamento en cápsula blanda se diseña para disolución en la cavidad bucal, la progesterona es, de acuerdo al SCB, un fármaco Clase II, es decir, baja solubilidad y alta permeabilidad (A. Dahan, 2006), y no puede ser considerado un ácido débil, por lo que no aplicaría para una posible bioexención en la mayoría de agencias regulatorias.

1.1.4 Uso de cápsulas blandas para mejorar absorción oral

En la sección anterior se explicó el uso principal para el cual el SCB fue diseñado: establecer posible correlación entre la disolución de un fármaco contenido en un medicamento y la posible bioexención de estudios *in vivo* para biodisponibilidad o bioequivalencia. Sin embargo, el SCB es también una herramienta importante en el desarrollo de medicamentos orales de acción sistémica (D. Siya, 2015).

La justificación para el uso del SCB en el desarrollo de este tipo de medicamentos, se da en que, para garantizar un efecto farmacológico, el fármaco debe comportarse como uno de Clase I, es decir, que a través de estrategias de formulación y/o procesos de manufactura, el formulador debe resolver los problemas de solubilidad y/o permeabilidad que en principio ofrecen los fármacos diferentes a Clase I.

Como se mencionó anteriormente, la progesterona es un fármaco Clase II (baja solubilidad y alta permeabilidad), por lo que los esfuerzos al momento de formular este fármaco en una forma oral, deben ser encaminados a mejorar sus problemas de solubilidad, ya que es

muy probable que su biodisponibilidad sea determinada por la velocidad de disolución del fármaco contenido en el medicamento. Las estrategias para mejorar la solubilidad en fármacos, incluyen (P. Khadka, 2014):

- Micronización.
- Formulaciones autoemulsificables.
- Obtención de sales más solubles.
- Solubilización por cosolvencia o ionización.
- Formación de complejos con ciclodextrinas.
- Micelas poliméricas.
- Liposomas.
- Nanopartículas sólidas lipídicas.

En el caso de progesterona, para mejorar su biodisponibilidad mejorando su solubilidad, se han reportado algunas de las estrategias anteriores; por ejemplo, el uso de complejos de inclusión con ciclodextrinas (F.A. Kind, 1987), en los que se ha demostrado la eficacia de este tipo de complejos en aumentar la solubilidad de la progesterona (A. Dahan J. M., 2010), y por ende su biodisponibilidad. Este aumento en la solubilidad de la progesterona a través del uso de ciclodextrinas ha sido utilizado para desarrollar un método de disolución para cápsulas de progesterona en matriz oleosa (A. Besisns, 2008). Este método de disolución utiliza el Aparato I de la USP operado a 150 rpm y con 1000 mL de Agua con 1% de Kleptose® (beta ciclodextrina, obtenida de Roquette, Francia). Sin embargo, en ensayos preliminares realizados en el Laboratorio Farmacéutico que respaldó económicamente la presente tesis, este método no mostró poder discriminatorio entre fórmulas con diferencias en tamaño de partícula, y el tiempo de la prueba (6 horas) es muy largo para poder ser aplicado en forma rutinaria para control de calidad de los lotes fabricados.

En el caso de la formulación de progesterona en cápsulas blandas, el aumento en la biodisponibilidad utiliza la combinación de dos estrategias: (a) la micronización, que tal como se espera es efectiva aumentando la velocidad de disolución en fármacos Clase II (J.T. Hargrove, 1989), y (b) formulación a base de lípidos ya que la absorción de este fármaco es favorecida por una dieta rica en lípidos y al mismo tiempo minimiza, mediante

el incremento del transporte linfático, el marcado efecto de primer paso hepático que sufre la progesterona (Lignieres., 1999), (F.A. Kind, 1987), lo que normalmente ocasiona que una vez absorbida, la progesterona sea metabolizada rápidamente a varios metabolitos menos activos, como pregnanediol, pregnenolona, entre otros (U.B. aespOttosom, 1984). El resultado es un incremento en la biodisponibilidad de la progesterona en cápsula blanda con contenido oleoso, cuando es comparada con la misma dosis en una forma farmacéutica como tableta o cápsula dura, en las cuales no es sencillo acomodar cantidades significativas de lípidos.

El hecho de que la absorción de la progesterona debiera ser principalmente afectada por su velocidad de disolución, le da vital importancia al contar con un método de disolución que pueda detectar y cuantificar diferencias significativas entre lotes con diferente tamaño de partícula de manera que dicho método pueda no sólo guiar el desarrollo de formulaciones similares y utilizarlo de manera rutinaria para el control de calidad de los lotes fabricados, sino que pudiera también ser utilizado para establecimiento de una correlación *in vitro in vivo* aceptable, lo que es esperado para fármacos Clase II donde la absorción es principalmente afectada por la velocidad de disolución del fármaco desde el medicamento, lo que permitiría a futuro el poder realizar cambios en la formulación o en el proceso de manufactura sin requerir nuevos estudios *in vivo* (ICH: International Conference of Harmonization, 2006)

1.1.5 Aspectos farmacocinéticos

La información de esta sección es tomada del inserto aprobado a la fecha para el producto referente en el mercado de Estados Unidos: Prometrium® 100 and 200 mg (Solvay Pharmaceuticals, Inc, 2013).

Absorción:

Luego de la administración oral de progesterona micronizada, suspendida en una matriz oleosa y contenida en una cápsula blanda, las concentraciones máximas plasmáticas se obtienen en las siguientes 3 horas aproximadamente. Las concentraciones de progesterona en suero parecen ser lineales y proporcionales a la dosis administrada, en un rango de 100 mg/día a 300 mg/día administrada a mujeres pos-menopaúsicas. Aunque dosis mayores a 300 mg/día no han sido estudiadas en mujeres, las concentraciones en suero en un estudio realizado a voluntarios hombres, mostró igualmente linealidad y proporcionalidad en la dosis en un rango de 100 mg/día a 400 mg/día y, la farmacocinética fue en términos generales consistente con la observada en mujeres.

Distribución.

De la progesterona que pasa a sangre, entre un 96% a 99% se une a proteínas, principalmente a la albúmina (50% a 54%) y a la transcortina (43% a 48%).

Metabolismo.

La progesterona es metabolizada principalmente, y de manera significativa, en el hígado produciendo pregnanedioles y pregnanolona, los cuales son conjugados en el hígado en metabolitos de tipo glucorónido y sulfato. Los metabolitos de progesterona que son excretados en la bilis pueden ser des-conjugados y posteriormente metabolizados en el intestino por un mecanismo de reducción, dehidroxilación y epimerización.

Excreción.

Los metabolitos principales de progesterona son excretados en la bilis y la orina y son eliminados principalmente por el riñón. Los metabolitos que son excretados en la bilis pueden experimentar reciclamiento entero-hepático o ser excretados por las heces fecales.

1.2 Ensayos de disolución

El ensayo de disolución es una de las pruebas actualmente utilizadas para demostrar el desempeño de una forma de dosificación sólida para uso oral, pues el fármaco requiere estar disuelto como paso previo a su absorción, para que el producto ejerza una acción farmacológica. Este ensayo no sólo proporciona información valiosa para el control de calidad, formulación y proceso de manufactura de un producto, sino que permite en

muchos casos la evaluación del desempeño *in vivo* de un producto farmacéutico (M. lagace, 2004), (Y. Qiu, 2009).

Un ensayo de disolución se define como una prueba de calidad que provee una medida de la cantidad y velocidad en que un fármaco se libera y disuelve desde un medicamento hacia un medio acuoso, bajo unas condiciones especificadas. El perfil de disolución del fármaco, desde el medicamento hacia el medio acuoso, es la resultante de una combinación de propiedades del principio activo, diseño de la formulación, proceso de manufactura, y el ambiente mecánico y químico que se estableció para el ensayo de disolución. La contribución y la influencia de cada uno de estos factores deben ser cuidadosamente evaluadas al momento del desarrollo de un ensayo de este tipo (Brown, 2014).

El desafío para las personas encargadas del desarrollo de este tipo de ensayos es encontrar las condiciones adecuadas del mismo, que permitan utilizarlo no sólo para guiar el proceso de desarrollo, sino también para encontrar desviaciones del proceso de manufactura indetectables por otros ensayos como la valoración, y, más importante aún, demostrar adecuada predictibilidad del comportamiento *in vivo* del producto farmacéutico; de hecho, un ensayo de disolución, al que se le ha demostrado adecuadamente su predictibilidad para desempeño *in vivo* (correlación), puede ser utilizado para requerir exenciones a estudios de bioequivalencia para un producto farmacéutico en desarrollo o al que se le han hecho cambios durante su comercialización (Y. Qiu, 2009).

En un estudio internacional realizado en 1996 (Carrico, 1996), se catalogó a este tipo de ensayos como uno de los que producía mayor variabilidad de resultados, ya que en muchos casos no se detectaban diferencias significativas debidas a la formulación, y en otros casos, se detectaban diferencias no relacionadas a los productos evaluados sino a la misma variabilidad del ensayo. Por eso, el ensayo de disolución debe ser robusto y detectar sólo diferencias significativas debidas al producto analizado.

La relación entre los ensayos de disolución y el desempeño *in vivo*, se debe a que para que el fármaco contenido en una forma oral sea absorbido debe primero liberarse desde el medicamento, luego disolver y por último permear por las barreras del intestino, y, los

dos primeros procesos se pueden evaluar mediante un ensayo de disolución (M. Ansari, 2004). Debido a lo anterior, y a que en la actualidad no se cuenta con otro tipo de ensayo *in vitro* para medir el desempeño de formas sólidas orales con relación a su desempeño *in vivo*, los ensayos de disolución han llegado a ser pieza clave en la documentación exigida por la mayoría de entidades regulatorias, para justificar el desarrollo de formas sólidas orales.

1.2.1 Aparatos de disolución

Tanto en la farmacopea de Estados Unidos como en la de Europa (EP) y de Japón (JP), contemplan aparatos de disolución desde hace varias décadas. Recientemente, a través de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH), estas tres entidades han armonizado sus recomendaciones sobre disolución incluyendo lo relacionado a aparatos, procedimientos y criterios de aceptación, entre otros temas.

Los aparatos de disolución disponibles son en general para formas farmacéuticas sólidas orales, tanto para liberación inmediata como modificada; aunque también están disponibles para formas farmacéuticas líquidas (como las suspensiones), semisólidas e incluso parches. En este último caso, son básicamente modificaciones de los aparatos para formas orales. La [Tabla 1-1](#) muestra los diferentes aparatos aceptados por las farmacopeas cubiertas por ICH, así como su principal aplicación.

Tabla 1-1 Aparatos de disolución para formas farmacéuticas sólidas orales incluidos en las farmacopeas cubiertas por ICH.

Aparato	Nombre	Principal Aplicación	Aceptado por
1	Aparato con canastilla	Tabletas	USP, EP, JP

2	Aparato con paleta	Tabletas y cápsulas de liberación modificada	USP, EP, JP
3	Cilindro Oscilante	Productos de liberación extendida	USP, EP
4	Celda de Flujo	Productos con fármacos de baja solubilidad.	USP, EP, JP

A continuación, se describe la configuración de los aparatos utilizados en formas farmacéuticas orales, de acuerdo a lo aceptado por USP (US Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 38, NF 33, 2016).

Aparato 1: Aparato con canastilla

El aparato consiste de: un vaso, con o sin tapa, de vidrio u otro material inerte y transparente; un motor; un eje propulsor metálico y una canastilla cilíndrica. El vaso está parcialmente sumergido en un baño de agua adecuado de cualquier dimensión conveniente o recibe calor de un dispositivo adecuado, como por ejemplo una camisa de calentamiento. Durante el transcurso de la prueba, el baño de agua o dispositivo de calentamiento mantienen la temperatura en el interior del vaso a $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y garantizan que el fluido del baño se mantenga en movimiento suave y constante. Ninguna parte del equipo, ni el entorno en el cual está colocado, aumenta significativamente el movimiento, agitación o vibración, por encima de los producidos por el elemento de agitación que gira con suavidad (US Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 38, NF 33, 2016).

Es preferible emplear un aparato que permita observar la muestra y el elemento de agitación durante la prueba. El vaso es cilíndrico y de fondo semiesférico con las siguientes dimensiones y capacidades que se muestran en la [Tabla 1-2](#).

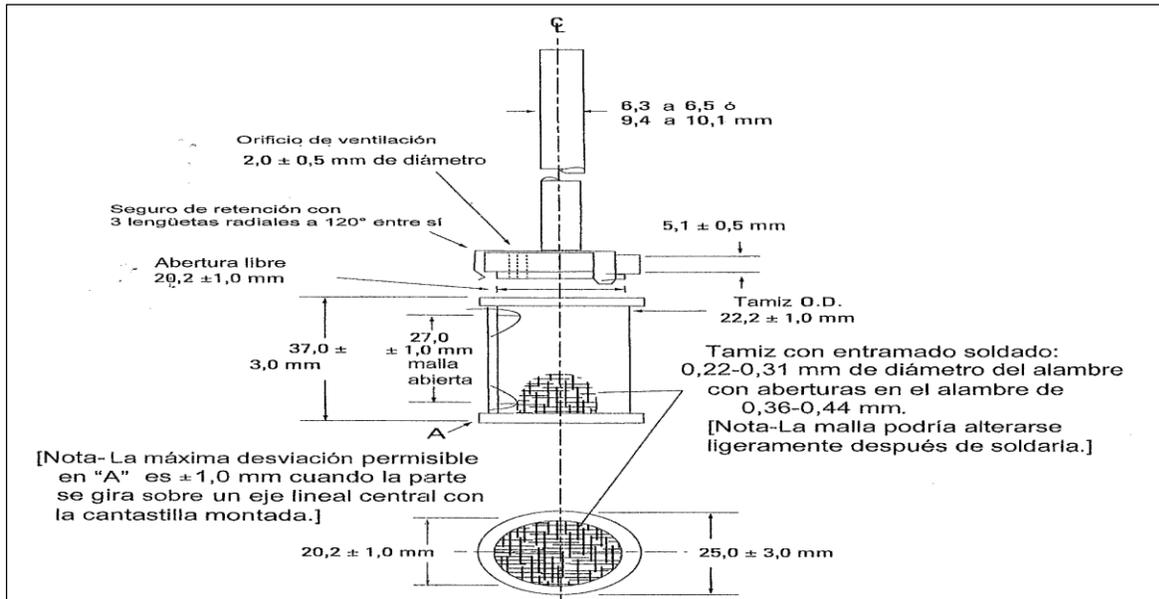
Tabla 1-2 Dimensiones de los vasos utilizados para Aparato I, de acuerdo a USP.

Capacidad Nominal	Altura	Diámetro
1L	Entre 160 y 210 mm	Entre 98 y 106 mm
2L	Entre 280 y 300 mm	Entre 98 y 106 mm
4L	Entre 280 y 300 mm	Entre 145 y 155 mm

Las paredes del vaso cilíndrico tienen un reborde en el extremo superior. Se puede utilizar una tapa de ser necesario para reducir la evaporación. Colocar el eje propulsor de forma tal que su eje central guarde una distancia máxima de 2 mm con respecto a cualquier punto del eje vertical del vaso y rote suavemente sin fluctuaciones significativas que pudieran afectar los resultados. Emplear un dispositivo para regular la velocidad con el objeto de mantener y seleccionar la velocidad de rotación del eje propulsor a la velocidad solicitada en la monografía o método de análisis con una aproximación de $\pm 4\%$ (US Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 38, NF 33, 2007).

Los componentes del eje y de la canastilla del elemento de agitación son de acero inoxidable 316 o de otro material inerte, según las especificaciones de la [Figura 1-2](#).

Figura 1-2 Especificaciones para eje y canastilla del Aparato 1. (Tomado de US Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 38, NF 33, 2016).

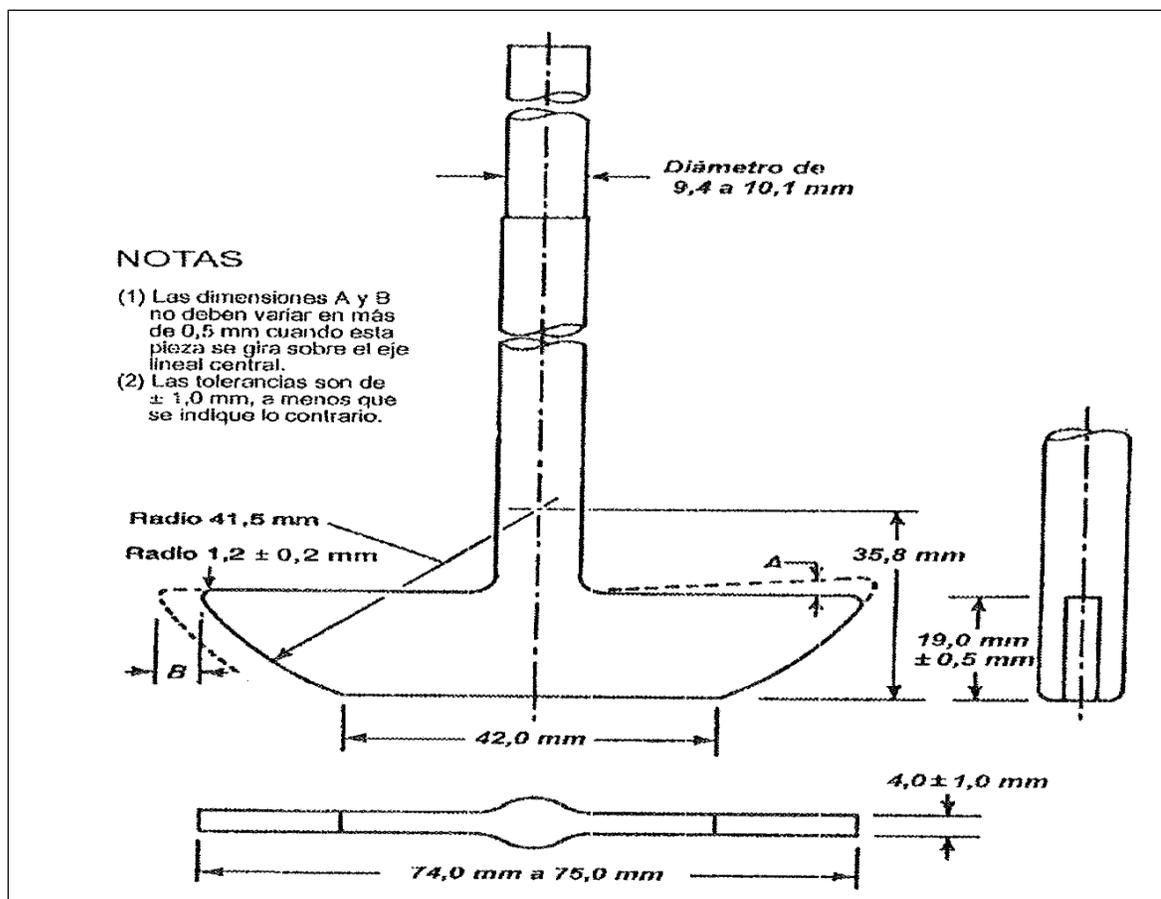


Se puede emplear una canastilla con un recubrimiento de oro de aproximadamente 0.0001 pulgadas (2.5 micras) de espesor. La unidad de dosificación se coloca en una canastilla seca al comienzo de cada prueba. La distancia entre el fondo interno del vaso y el fondo de la canastilla se mantiene a 25 ± 2 mm durante la prueba.

Aparato 2: Aparato con paleta

Este aparato es similar al Aparato I, excepto que se usa una paleta compuesta por un aspa y un eje como elemento de agitación. Se coloca el eje propulsor de forma tal que su eje central guarda una distancia máxima de 2 mm con respecto a cualquier punto del eje vertical del vaso y rota suavemente sin fluctuaciones significativas que pudieran afectar los resultados. La línea central vertical del aspa está alineada con el eje propulsor de forma tal que el extremo inferior del aspa está nivelado con el extremo inferior del eje propulsor. La paleta cumple con las especificaciones que se muestran en la [Figura 1-3](#).

Figura 1-3 Especificaciones para la paleta de Aparato 2. (Tomado de US Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 38, NF 33, 2016).



La distancia entre el fondo interno del vaso y el borde inferior del aspa se mantiene a 25 ± 2 mm durante la prueba.

El aspa metálica o de otro material inerte adecuado y el eje forman una unidad. En algunos casos, se puede usar un dispositivo desmontable de dos partes adecuado, siempre y cuando las partes permanezcan firmemente ajustadas durante la prueba. El eje y el aspa de la paleta pueden estar recubiertos con un material inerte adecuado.

Al momento de la prueba se recomienda dejar que la unidad de dosificación se hunda hasta el fondo del vaso antes de empezar a rotar el aspa. A las unidades de dosificación se les puede agregar una pieza pequeña, suelta, de algún material no reactivo, como por ejemplo un par de vueltas de alambre, (sinkers) para evitar que floten. Es importante que estos sean similares en peso y forma ya que pueden afectar los resultados de disolución (R.A. Soltero, 1989).

Aparato 3: Cilindro oscilante

Este aparato ha tenido una relativamente corta historia desde que fue propuesto por Beckett (I. Borst, 1979) y finalmente fue incorporado a la USP en el año de 1991.

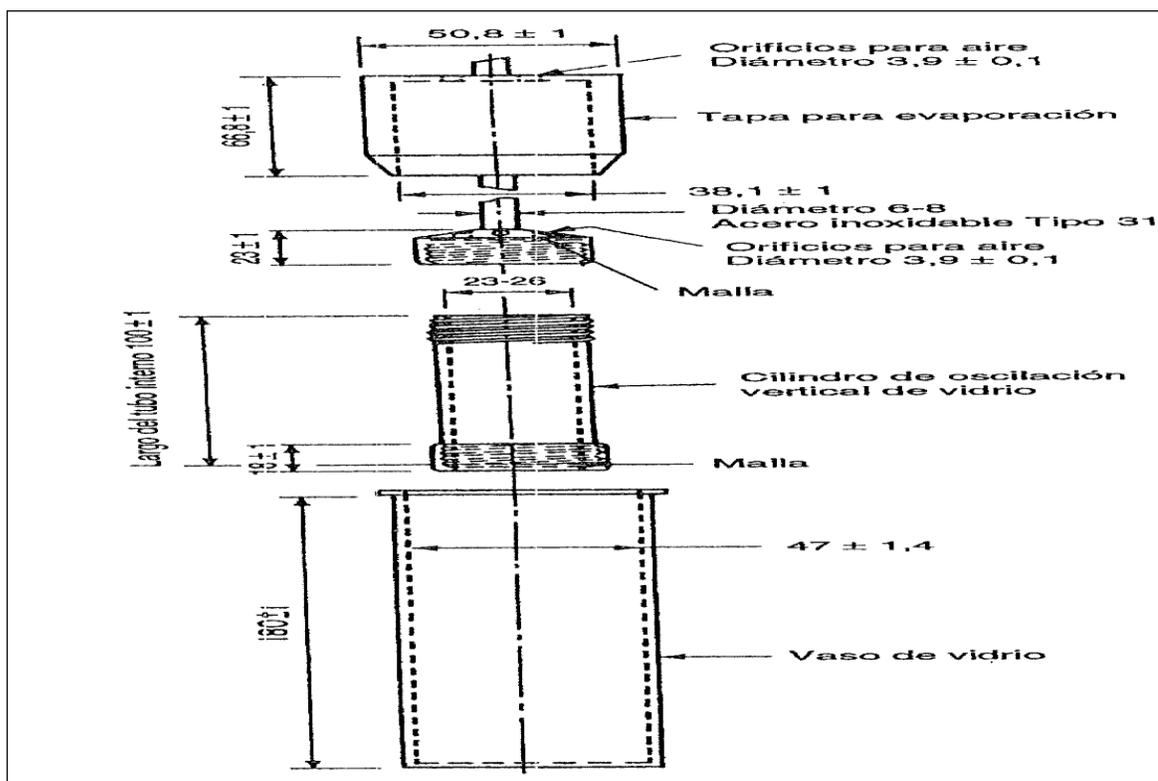
Inicialmente el aparato fue propuesto como alternativa a los aparatos 1 y 2 en la evaluación de disolución en productos con liberación extendida, ya que era necesario establecer correlaciones *in vitro in vivo* (IVIVC) y los datos de disolución que se obtenían con los aparatos 1 y 2 estaban muy afectados por variables propias de esos equipos, como la formación de conos y el efecto de vibraciones externas (Yu, 2002); el aparato 3 ofrece las ventajas de emular los cambios en las condiciones fisicoquímicas y mecánicas experimentados por los medicamentos en el tracto gastrointestinal (I. Borst, 1997).

La mayor parte del uso que se le da a este aparato, está relacionada con formas de liberación extendida; de hecho, existen varios reportes que comparan los perfiles de disolución de varios productos de este tipo, obtenidos con aparatos 1 o 2, versus con aparato 3, y cómo, en muchos casos se obtienen mejores correlaciones IVIVC con el aparato 3 (Borst, 1991), (C. Civiale, 1991). Sin embargo, actualmente se evalúa el uso de este aparato para formas sólidas de liberación inmediata que presentan problemas de disolución en los aparatos 1 y 2, como es el caso de cápsulas blandas con contenido oleoso, tabletas o cápsulas con activos de alta solubilidad como metoprolol y ranitidina, e incluso con activos de baja solubilidad como Aciclovir (Yu, 2002).

El diseño del Aparato 3 está basado en el aparato de desintegración. El equipo se compone de un grupo de vasos cilíndricos de vidrio de fondo plano, un grupo de cilindros oscilantes de vidrio, accesorios de un material inerte (de acero inoxidable 316 o de otro material adecuado) y mallas de un material adecuado no absorbente ni reactivo, que se fijan a la parte superior e inferior de los cilindros oscilantes; un motor y una transmisión que hacen oscilar los cilindros en sentido vertical dentro de los vasos y, de ser necesario, traslada los cilindros oscilantes en sentido horizontal hacia otra hilera de vasos. Los vasos están parcialmente sumergidos en un baño de agua adecuado de un tamaño conveniente que permita mantener la temperatura a $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, durante la prueba. Ninguna parte del equipo, ni el entorno en el cual el equipo está instalado, produce una cantidad importante

de movimiento, agitación o vibración, que exceda la oscilación vertical suave del cilindro oscilante. Se usa un dispositivo que permite seleccionar la velocidad de agitación y mantenerla a la velocidad de inmersión especificada en la monografía dentro de $\pm 5\%$. Es preferible emplear un aparato que permita observar las muestras y los cilindros oscilantes. Los vasos cuentan con una tapa de evaporación que permanece colocada durante la prueba. Los componentes se ajustan a las dimensiones que se indican en la [Figura 1-4](#).

Figura 1-4 Especificaciones para celdas y vasos del Aparato 3. (Tomado de US Pharmacopoeial Convention. The United States Pharmacopeia 38, NF 33, 2016).



Aparato 4: Celda de flujo

EL equipo se compone de un depósito y una bomba para el medio de disolución, una celda de flujo y un baño de agua que mantiene el medio de disolución a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, durante la prueba. Cada monografía especifica la celda a utilizar.

Para este aparato existen diferentes tipos de celda dependiendo de la forma de dosificación a evaluar: Existen celdas para tabletas, polvos, supositorios, cápsulas duras y blandas (existe una específica para cápsulas blandas con contenido oleoso), e incluso

formas de depósito como los llamados stents. En el caso de productos orales, las celdas pueden ser de 12 o 22.6 mm de diámetro que corresponden a aproximadamente 8 o 19 mL respectivamente. Pueden adicionarse esferas de vidrio para cambiar el tipo de flujo dentro de la celda de turbulento (sin esferas) a lineal (con celdas) (Fotaki, 2009).

El flujo a través del aparato puede operar de dos modos: (1) Abierto, donde medio fresco del reservorio continuamente pasa a través de la celda que contiene la forma de dosificación, y (2) cerrado, donde un volumen fijo de medio pasa varias veces por la celda. Esto se muestra con mayor claridad en la [Figura 1-5](#) y [Figura 1-6](#), para modo abierto y cerrado, respectivamente.

Figura 1-5 Aparato 4 operado en modo abierto. (Tomado de US Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 38, NF 33, 2016).

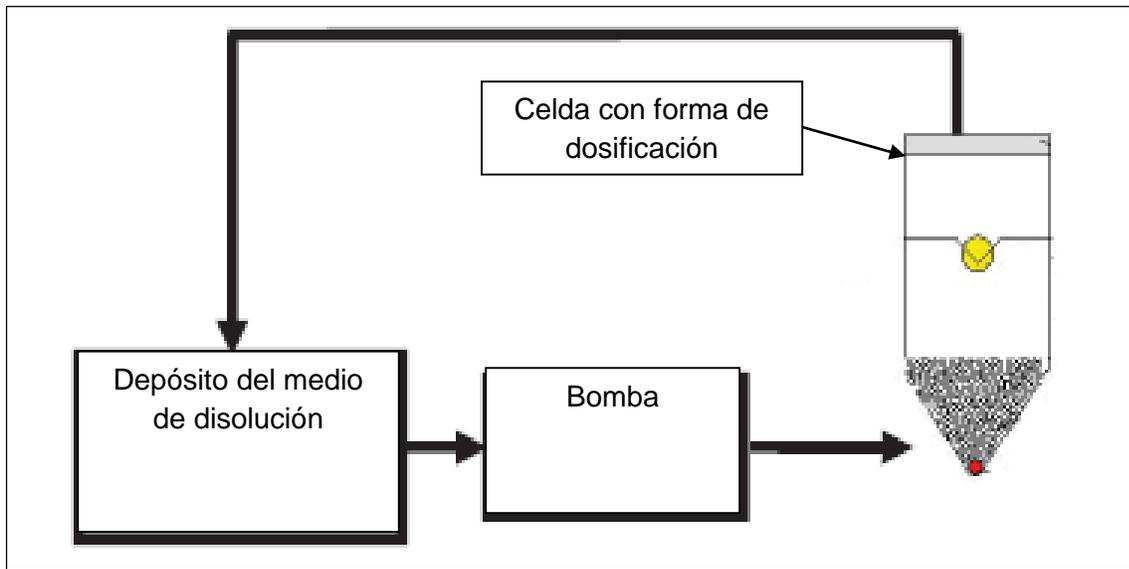
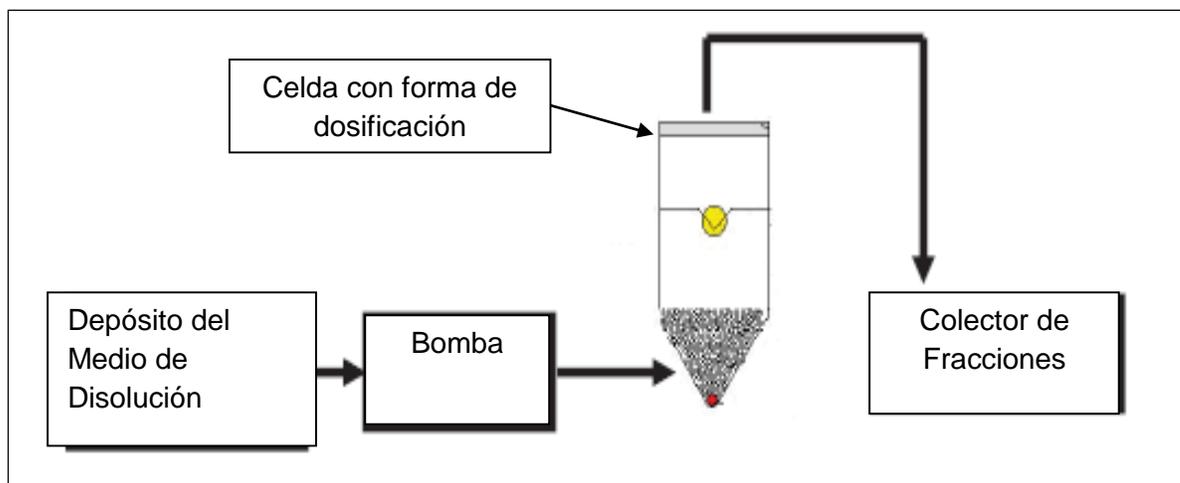


Figura 1-6 Aparato 4 operado en modo cerrado. (Tomado de US Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 38, NF 33, 2016).



Para el desarrollo del presente trabajo se contempló inicialmente la evaluación de los aparatos de disolución 1 y 2, ya que son los más comúnmente utilizados por los laboratorios de análisis y eso garantizaría la aplicación del método de manera rápida. Sin embargo, debido a que basados en la experiencia del laboratorio farmacéutico que colaboró con el presente trabajo, y a algunos reportes de literatura (J. Hu, 2005) que debido al diseño de estos aparatos los resultados de disolución podrían ser muy variables, se contempló también la evaluación del Aparato 3 y si este no funcionaba, se evaluaría el Aparato IV.

2. Objetivos

2.1. General

Desarrollar, estandarizar y validar un método de disolución para progesterona en suspensión oleosa contenida en cápsula blanda de gelatina y evaluar la sensibilidad de dicho método a modificaciones significativas en formulación y/o manufactura, que pudieran relacionarse a cambios en el desempeño *in vivo* del producto.

2.1. Específicos

- Desarrollar, estandarizar y validar una metodología analítica para la cuantificación de las muestras de progesterona procedentes de la prueba de disolución.
- Evaluar en forma comparativa el empleo de diferentes aparatos de disolución incluidos en la USP, en el desarrollo de un método de disolución para formulaciones oleosas de progesterona contenidas en cápsula blanda de gelatina.
- Evaluar la capacidad del método de disolución desarrollado para evidenciar cambios en la liberación del IFA, ocasionados por modificaciones en la formulación y/o manufactura del producto.

3. Parte Experimental

3.1 Materiales

En esta investigación se emplearon los siguientes reactivos y materiales:

- Agua Tipo I para análisis de laboratorio.
- Dodecil sulfato de sodio (DDS o LSS, CAS 151-21-3, pureza >99.0% en fracción másica).
- Polisorbato 80 (Tween 80, mono-oleato de polioxietilen sorbitan, CAS 9005-65-6).
- Ácido clorhídrico (HCl, CAS 7647-01-0, pureza 37% p/v).
- Acetato de sodio (sal sódica del ácido acético, CAS 127-09-3, pureza entre 99.0.101% en base seca, fracción másica).
- Ácido fosfórico (CAS 7664-38-2, pureza >85% fracción másica).
- Fosfato monobásico de sodio, di-hidratado (CAS 13472-35-0, pureza > 99.5% en base seca, fracción másica).
- Fosfato dibásico de sodio anhidro, anhidro (CAS 7558-79-4, pureza >99.95% en fracción másica).
- Ácido acético glacial (CAS 64-19-7, pureza >99.5%).
- Acetato de sodio, anhidro (CAS 127-09-3, pureza >99% en fracción másica).
- Tetraborato de sodio, decahidratado (CAS 1303-96-4, pureza >99.5% en fracción másica).
- Hidróxido de sodio anhidro, escamas (Soda caustica, CAS 1310-73-2, pureza >98% en fracción másica).

3.2 Equipos

En esta investigación se emplearon los siguientes equipos:

- Aparato de disolución (1 y 2) de la Farmacopea de Estados Unidos (USP). Marca Distek, modelo 6100.
- Aparato de disolución (1 y 2) de la Farmacopea de Estados Unidos (USP). Marca Distek, modelo 7100.
- Aparato de disolución (3) de la Farmacopea de Estados Unidos (USP). Marca Varian, modelo BIO-DIS.
- Baño termostático con agitación. Marca Julabo, modelo SW23.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiencia. Marca Agilent, modelo 1200.

3.3 Metodología

3.3.1 Desarrollo y validación de la metodología analítica

Se comenzó evaluando la elución de una solución de progesterona de aproximadamente 0.05 mg/mL en metanol. Como fase móvil se utilizó agua con diferentes proporciones de metanol o acetonitrilo; no se esperaba efecto del pH en la separación, debido a que la progesterona no posee grupos ionizables, al menos en el rango de pHs en los que se trabaja la fase reversa.

Para la búsqueda de las condiciones cromatográficas, se definieron los siguientes parámetros en el software:

- a) Dos columnas: C18 y C8.
- b) Dos opciones de fase móvil: Metanol:agua o Acetonitrilo:agua.
- c) Volumen de inyección de 10 microlitros.
- d) Temperatura del horno: entre 30°C y 40°C.
- e) Parámetros de pico: no menos de 1500 platos teóricos y no más de 1.5 de factor de cola, ambos medios por método USP.
- f) Entregar el método más corto posible y nunca mayor a 12 minutos; este tiempo máximo se considera adecuado en el laboratorio para métodos de un sólo activo.
- g) Longitud de onda: 241 nanómetros.

Una vez se seleccionaron las condiciones cromatográficas, a partir de la información entregada por el software ChromsWord Auto, se procedió a la estandarización de la metodología analítica, iniciando con la evaluación del parámetro de selectividad. Para ello, se inyectaron varios medios de disolución con la máxima cantidad estimada a ser usada de lauril sulfato de sodio (LSS) y Polisorbato 80 (Tween 80). Esta cantidad máxima se definió luego de una búsqueda en la USP para el uso de esos tensioactivos en medios de disolución para compuestos con baja solubilidad; si el método era selectivo con la máxima cantidad, lo sería, por ende, para cantidades menores de cada tensioactivo evaluado.

La selectividad se evaluó examinando si alguno de los medios generaba señales que interfirieran con la cuantificación del pico de progesterona; si alguno de los medios

interfería con la cuantificación del pico, el método entonces, debía ser modificado para evitar dicha interferencia, ya que en este punto cualquiera de los medios utilizados podría ser el que finalmente se escogiera. Los medios evaluados se resumen en la [Tabla 3-1](#).

Tabla 3-1: Medios de disolución utilizados para la evaluación de selectividad en las condiciones cromatográficas iniciales.

Solvente	% (p/v) de LSS en el Solvente	% (p/v) de Tween 80 en el Solvente
Agua	0	0
	4	0
	0	2
Jugo Gástrico Simulado, USP	0	2
	4	0
	0	2
Ácido Clorhídrico 0.1N	0	0
	4	0
	0	2
Tampón de Acetato, pH 4.5	0	0
	4	0
	0	2
Tampón de Fosfato, pH 6.8	0	0
	4	0
	0	2

Una vez finalizada la estandarización de la metodología, se inició la validación de la misma; para mayor detalle de la metodología empleada para la validación, por favor revisar el **Anexo A**.

3.3.2 Determinación de condiciones sumidero (condiciones sink).

Se determinó la solubilidad en equilibrio para la progesterona en varios medios acuosos (diferentes pHs), y con cantidades crecientes de LSS o Tween 80: máximo 4 y 2% (p/v), respectivamente. Las Tablas [3-2](#); [3-3](#); [3-4](#) y [3-5](#), resumen los medios utilizados.

En cada uno de los medios, se adicionó (por duplicado) una cantidad en exceso de progesterona y se agitó durante 8 horas en un agitador mecánico; luego se colocaron los recipientes en un baño a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por una hora, y finalmente se dejaron las muestras en reposo por no menos de 12 horas (ensayos previos mostraron que luego de 8 horas se alcanzaba el equilibrio), con el objetivo de que precipitara la progesterona en exceso. Al final, en todos los casos se observó progesterona sin disolver y una fase en solución que debe estar saturada del activo.

Las muestras se diluyeron a volumen con cada uno de los medios evaluados, se filtraron y se inyectaron en el cromatógrafo; se hicieron las diluciones correspondientes cuando así se requería con cada uno de los medios. Las muestras se analizaron con la metodología HPLC y se determinó la cantidad disuelta en la dilución inicial, expresada como mg de progesterona por mL de cada medio.

Tabla 3-2: Medios evaluados para condiciones de sumidero, cuando el solvente utilizado fue agua.

Solvente	Código del Medio	% (p/v) de LSS en el Solvente	% (p/v) de Tween 80 en el Solvente
Agua	A-0.0	0.0	0.0
	A-LSS-0.5	0.5	0.0
	A-LSS-1.0	1.0	0.0
	A-LSS-1.5	1.5	0.0
	A-LSS-2.0	2.0	0.0
	A-LSS-2.5	2.5	0.0
	A-LSS-3.0	3.0	0.0
	A-LSS-3.5	3.5	0.0
Agua	A-LSS-4.0	4.0	0.0
	A-T80-0.1	0.0	0.1
	A-T80-0.3	0.0	0.3
	A-T80-0.5	0.0	0.5
	A-T80-1.0	0.0	1.0
	A-T80-1.5	0.0	1.5
	A-T80-2.0	0.0	2.0

Tabla 3-3: Medios evaluados para condiciones de sumidero, cuando el solvente utilizado fue jugo gástrico simulado, sin enzimas (JGS).

Solvente	Código del Medio	% (p/v) de LSS en el Solvente	% (p/v) de Tween 80 en el Solvente
Jugo Gástrico Simulado	JGS-0.0	0.0	0.0
	JGS-LSS-0.5	0.5	0.0
	JGS-LSS-1.0	1.0	0.0
	JGS-LSS-1.5	1.5	0.0
	JGS-LSS-2.0	2.0	0.0
	JGS-LSS-2.5	2.5	0.0
	JGS-LSS-3.0	3.0	0.0
	JGS-LSS-3.5	3.5	0.0
	JGS-LSS-4.0	4.0	0.0
Jugo Gástrico Simulado	JGS-T80-0.1	0.0	0.1
	JGS-T80-0.3	0.0	0.3
	JGS-T80-0.5	0.0	0.5
	JGS-T80-1.0	0.0	1.0
	JGS-T80-1.5	0.0	1.5
	JGS-T80-2.0	0.0	2.0

Tabla 3-4: Medios evaluados para condiciones de sumidero, cuando el solvente utilizado fue tampón de acetato de pH 4.5 (ACE).

Solvente	Código del Medio	% (p/v) de LSS en el Solvente	% (p/v) de Tween 80 en el Solvente
Tampón Acetato de pH 4.5	ACE-0.0	0.0	0.0
	ACE-LSS-0.5	0.5	0.0
	ACE-LSS-1.0	1.0	0.0
	ACE-LSS-1.5	1.5	0.0
	ACE-LSS-2.0	2.0	0.0
	ACE-LSS-2.5	2.5	0.0
	ACE-LSS-3.0	3.0	0.0
	ACE-LSS-3.5	3.5	0.0
	ACE-LSS-4.0	4.0	0.0
Tampón Acetato de pH 4.5	ACE-T80-0.1	0.0	0.1
	ACE-T80-0.3	0.0	0.3
	ACE-T80-0.5	0.0	0.5
	ACE-T80-1.0	0.0	1.0
	ACE-T80-1.5	0.0	1.5
	ACE-T80-2.0	0.0	2.0

Tabla 3-5: Medios evaluados para condiciones de sumidero, cuando el solvente utilizado fue tampón fosfato de pH 6.8 (FOS).

Solvente	Código del Medio	% (p/v) de LSS en el Solvente	% (p/v) de Tween 80 en el Solvente
Tampón Fosfato de pH 6.8	FOS-0.0	0.0	0.0
	FOS -LSS-0.5	0.5	0.0
	FOS -LSS-1.0	1.0	0.0
	FOS-LSS-1.5	1.5	0.0
	FOS-LSS-2.0	2.0	0.0
	FOS-LSS-2.5	2.5	0.0
	FOS-LSS-3.0	3.0	0.0
	FOS-LSS-3.5	3.5	0.0
	FOS-LSS-4.0	4.0	0.0
Tampón Fosfato de pH 6.8	FOS-T80-0.1	0.0	0.1
	FOS-T80-0.3	0.0	0.3
	FOS-T80-0.5	0.0	0.5
	FOS-T80-1.0	0.0	1.0
	FOS-T80-1.5	0.0	1.5
	FOS-T80-2.0	0.0	2.0

3.3.3 Selección del Aparato de Disolución.

Se analizó la disolución de un lote del producto terminado (uno de 100 mg/cápsula y uno de 200 mg/cápsula), en los aparatos 1 (canastillas), 2 (paletas) y 3 (cilindro oscilante) de la USP. Cada uno de estos aparatos se utilizó a las velocidades máximas recomendadas de acuerdo a la USP <711>:

- Aparato 1: 900 mL de buffer fosfato pH 6.8 con 4%(P/V) de LSS, a 150 revoluciones por minuto (rpm). Sin sinkers.
- Aparato 2: 900 mL de buffer fosfato pH 6.8 con 4%(P/V) de LSS, a 100 revoluciones por minutos (rpm). Con sinkers.
- Aparato 3: 250 mL de buffer fosfato pH 6.8 con 4%(P/V) de LSS, a 40 inmersiones (dips) por minuto. Con sinkers.

NOTA: en todos los casos se utilizaron “sinkers” para evitar la flotación de la cápsula durante la prueba.

Como medio de disolución se utilizó la combinación de solvente y tensioactivo, que de acuerdo a los datos de la Sección 3.3.3, mostró la mayor solubilidad en equilibrio para progesterona.

El objetivo de combinar las condiciones de medio y velocidad más favorables para la disolución, fue el de encontrar una o más combinaciones en donde al analizar una muestra del producto terminado, se obtuviese un porcentaje disuelto de al menos 85% a un tiempo de no más de 60 minutos. Se consideró que, con esta limitación se evitaría el desarrollar una metodología de disolución poco práctica para uso rutinario en el control de calidad del producto terminado.

Las condiciones seleccionadas fueron sólo el punto de partida para seleccionar las condiciones finales de disolución, que garantizaran discriminación entre lotes con diferencias significativas que pudieran afectar su velocidad de disolución, pero en un tiempo de prueba razonable para ser aplicado como método de control de calidad lote a lote (no más de 60 minutos).

3.3.4 Selección de condiciones de disolución.

En este punto, ya se había seleccionado el aparato de disolución y a través de un diseño Plackett-Burman se realizó un tamizaje (screening) de las variables que podían afectar el poder discriminatorio del método de disolución.

Se seleccionaron dos lotes del producto con diferencias en su distribución de tamaño de partícula, y se analizaron en las condiciones de disolución de acuerdo al diseño propuesto (ver [Figura 3-1](#)). Seis unidades de cada lote se utilizaron para realizar un perfil de disolución comparativo y se calculó el valor de similitud (f_2) entre los perfiles de cada producto, en cada una de las condiciones de disolución de acuerdo al diseño.

Figura 3-1 Diseño experimental utilizado para la selección de las condiciones de disolución en el aparato 3.

No.	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7
1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
2	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1
3	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
5	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1
6	-1	+1	-1	+1	+1	-1	-1
7	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1

Para este cálculo se utilizó el método del modelo independiente. Este modelo calcula un factor de diferencia (f_1) y un factor de similitud (f_2) para la comparación de dos perfiles de disolución (J.W. Moore, 1996).

El factor de diferencia (f_1) calcula el porcentaje de diferencia entre los dos perfiles a cada tiempo de muestreo y es una medida del error relativo entre las dos curvas; f_1 se calcula mediante la [Ecuación 3-1](#). Por otro lado, el factor de similitud (f_2) es una transformación de raíz cuadrada recíproca logarítmica de la suma de error al cuadrado y es una medida de la similitud en el porcentaje disuelto de cada producto comparado; se calcula mediante la Ecuación 3-2.

Ecuación 3-1 Fórmula para el cálculo del factor de diferencia (f_1) por el método del modelo independiente.

$$f_1 = \left\{ \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \right\} \times 100$$

Ecuación 3-2 Fórmula para el cálculo del factor de similitud (f_2) por el método del modelo independiente.

$$f_2 = 50 \times \text{Log} \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{0.5} \times 100 \right\}$$

Donde:

n , es el número de puntos de muestreo.

R_t , es el porcentaje promedio de disolución de uno de los productos (el que se usa como referencia) al tiempo " t ".

T_t , es el porcentaje promedio de disolución del otro producto (del que se desea comparar contra la referencia) al tiempo " t ".

Con los valores de f_2 , se calculó el porcentaje de similitud entre los perfiles y esa fue la respuesta utilizada para establecer el efecto de cada variable. Con base en estos resultados se definieron valores fijos para algunos parámetros y los de mayor efecto sobre la respuesta, se evaluaron separadamente para encontrar un valor que nos mostrará la mayor diferencia entre los dos productos que se sabía diferían significativamente en su distribución de tamaño de partícula.

Lo que se buscaba era escoger el valor de cada variable que maximizara el porcentaje de diferencia entre los dos productos que se sabía tenían diferencias significativas en su tamaño de partícula; en otras palabras, escoger los valores de cada variable que hicieran que el método pudiera discriminar estos dos productos. Los experimentos se corrieron en orden aleatorio.

3.3.5 Evaluación del poder discriminatorio del método

En este punto ya se habían seleccionado todas las condiciones del método de disolución y el propósito de esta sección era el de evaluar qué tanto el método de disolución diferenciaba, mediante la comparación de perfiles de disolución (f_2), entre dos productos que se consideraban significativamente diferentes. Esta sección se dividió en dos partes:

Evaluación de perfiles de disolución de dos productos para los cuales se había determinado que no cumplían los criterios de bioequivalencia; se realizaron los perfiles de disolución de esos dos productos con la metodología propuesta y se esperaba que estos perfiles arrojaran un valor de f_2 menor a 50.

La segunda parte de esta evaluación consistió en evaluar los perfiles de disolución a aquellos productos que a propósito se le realizaron cambios en la formulación y/o parámetros de procesos, que se identificaron como potenciales factores influyentes en la velocidad de disolución del producto, como el espesor de la película de gelatina y el tamaño de partícula de la formulación.

4. Resultados y discusión

4.1 Desarrollo y validación de la metodología analítica

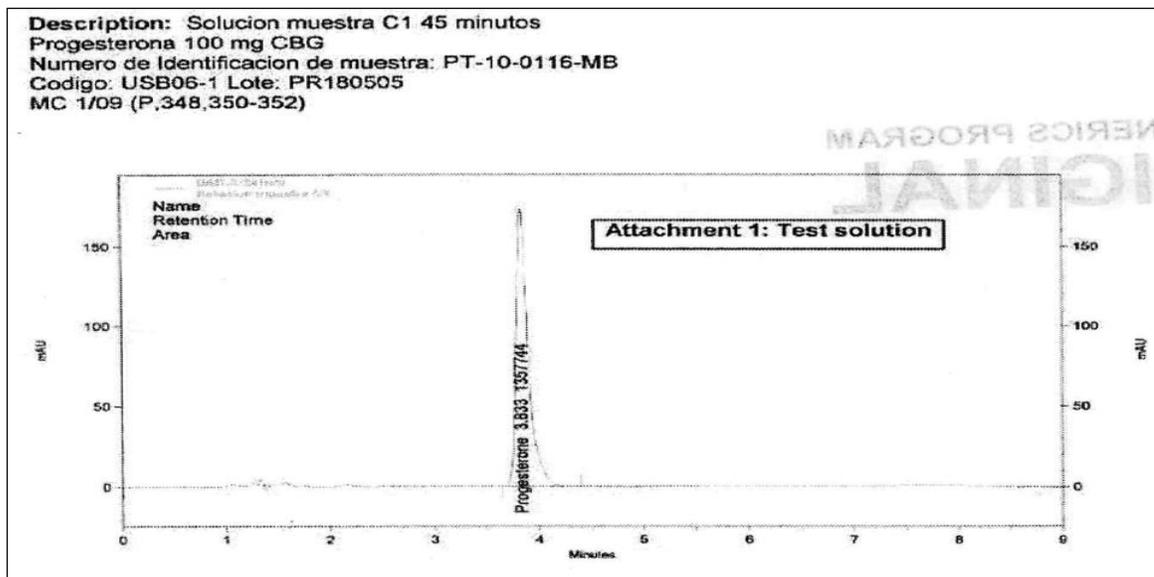
El análisis del software, luego de la combinación de todas las opciones de los parámetros mencionados anteriormente, arrojó las siguientes condiciones cromatográficas, ver [Tabla 4-1](#).

Tabla 4-1 Condiciones cromatográficas HPLC para el análisis de muestras de disolución.

Parámetro	Valor
Columna	Zorbax XDB C18 (150 X 4.6)mm, 5 micras (Agilent: 993967-902)
Fase Móvil	Metanol : Agua (80 : 20)
Volumen de Inyección	10 microlitros
Temperatura del Horno	40°C
Flujo	1.0 mL/minuto
Detector	Ultravioleta, 241 nanómetros
Tiempo de corrida	9 minutos
Concentración de la solución	0.05 mg/mL

La [Figura 4-1](#) muestra un cromatograma típico obtenido para una solución de 0.05 mg/mL con las condiciones cromatográficas mostradas arriba.

Figura 4-1 Cromatograma típico con las condiciones cromatográficas seleccionadas.



Los platos teóricos obtenidos, por el método USP, fueron superiores a 4500 y el factor de cola de 1.05, cumpliendo con lo establecido para cada uno de estos parámetros: no menos de 1500 y no más de 1.5, respectivamente.

Cabe anotar que la concentración de 0.05 mg/mL, el volumen de inyección de 10 microlitros y la longitud de onda de 241 nanómetros, fueron fijadas con base en la experiencia del laboratorio con este activo; en un método para cuantificación de progesterona que ya se había validado en el laboratorio se usaban estas condiciones y se sabía que arrojaban picos con un área dentro del rango lineal. Sin embargo, no se utilizó aquel método, sino que se decidió desarrollar uno nuevo usando ChromsWord Auto, con el fin de disminuir los tiempos de corrida que eran de 25 minutos para el método de valoración a no más de 12 minutos, que era el tiempo deseado para las corridas de las muestras de disolución. Adicionalmente, la concentración de 0.05 mg/mL podría ser obtenida en cualquier muestra potencial de disolución ya que el producto terminado tiene dos concentraciones (100 y 200 mg/cápsula) y el volumen de medio más alto posible en los aparatos es de USP 900 mL, por lo que la concentración más baja posible era de 0.11 mg/mL (100 mg/ 900 mL) la cual podría ser diluida con el medio adecuado a aproximadamente 0.05 mg/mL.

Las condiciones obtenidas, están en acuerdo con lo que se espera para un método HPLC de un activo altamente hidrofóbico como la progesterona; ya que se utiliza una columna C18, por la cual se espera tenga alta afinidad, y para su elución se requiere una concentración alta de solvente, ya que se trata de fase reversa (la polaridad de la fase móvil es mayor que la polaridad de la fase estacionaria) (Y. Kazakevich, 2007). El tiempo final de corrida de 9 minutos es adecuado para aplicar el método.

La validación del método cromatográfico se realizó de acuerdo a las recomendaciones de USP para la validación de métodos de disolución en el Capítulo General <1092>: “*The Dissolution Procedure: Development and Validation*” (Brown, 2016). El resumen de los resultados de la validación se muestra en la [Tabla 4-2](#), para mayor detalle sobre la validación del método de análisis favor revisar el **Anexo 1**.

Tabla 4-2 Resumen de resultados de la validación del método de análisis por HPLC.

Parámetro	Criterio de Aceptación	Resultado	¿Cumple ?
Selectividad	No interferencia de cualquier pico de excipientes con el pico de progesterona	No hay interferencia	Sí
Linealidad	$r^2 \geq 0.980$	0.999	Sí
	En el diagrama de residuales los puntos son aleatorios y no muestran ninguna tendencia.	distribución aleatoria y sin tendencia	
	Pendiente significativamente diferente de cero: $F1_{exp} > F1_{tab}$ (gl: 1, 13; α : 0.05)	$F1_{exp}$ (1.84e+05) > $F1_{tab}$ (4.670)	
	Linealidad entre los resultados: $F2_{exp} < F2_{tab}$ (gl: 3, 10; α : 0.05)	$F2_{exp}$ (1.990) < $F2_{tab}$ (3.710)	
El intercepto no es significativamente diferente de cero: $t_{exp} < t_{tab}$ (gl: 3; $\alpha=0.05$).	t_{exp} (0.895) < t_{tab} (1.771)		

Parámetro	Criterio de Aceptación	Resultado	¿Cumple ?
Exactitud (recuperación)	El porcentaje de recuperación promedio en cada nivel evaluado, está entre 95% y 105%	100% a 101%	Cumple
Exactitud (efecto del filtro)	La muestra filtrada versus la no filtrada (para estándar y muestra) debe estar entre 98.0% y 102.0%	Para estándar: 100.0% Para muestra: 99.8%	Cumple
Precisión Instrumental	El RSD obtenido debe ser menor al 1.5%	0.2%	Cumple
Precisión del Método (Repetibilidad)	El RSD obtenido debe ser menor al 3.0%	1.0%	Cumple
Precisión Intermedia	La diferencia entre el valor menor y el mayor obtenido, no es mayor del 5%	2%	Cumple
Estabilidad de Muestra Analítica	La diferencia entre el valor inicial y luego del tiempo "t", es menor al 2.0%	t = 7 días Diferencia: 1.6%	Cumple
Robustez	Modificaciones en los parámetros de disolución: la mayor diferencia no es mayor al 5%	Cumple	Cumple
	Modificaciones en los parámetros de cromatografía: la mayor diferencia no es mayor al 2%	Cumple	

Los resultados nos muestran un método adecuado para el propósito que se requería, ya que cumplió los parámetros de validación necesarios. El rango en el que se evaluó la validación fue entre 24 a 144 microgramos por mililitro; este rango cubre hasta un 25% de la concentración más baja esperada (una cápsula de 100 mg en un volumen de 900 mL) y mediante diluciones podía llevarse la concentración más alta esperada (una cápsula de

200 mg en un volumen de 230 mL, para el caso de Aparato 3), hasta un valor de concentración que estuviese dentro del rango evaluado.

4.2 Determinación de condiciones sumidero.

Los resultado del estudio de solubilidad y la influencia en las condiciones sumidero se resumen en la [Tabla 4-3](#). En esta tabla sólo se incluyen los resultados de los medios evaluados con el tensioactivo Lauril sulfato de sodio (LSS), ya que los experimentos realizados con polisorbato 80, no arrojaron valores de solubilidad que justificaran condiciones sumidero, en el rango evaluado.

Se encontró que la solubilidad de la progesterona en agua es muy baja y no se incrementa con cambios de pH entre 1.2 y 6.8; esto es lo esperado teniendo en cuenta que este compuesto es altamente hidrofóbico y no presenta grupos fácilmente ionizables (ver [Figura 1-1](#) del marco teórico). Lo que sí se observó fue un aumento significativo de la progesterona en solución, en presencia de cada uno de los tensioactivos utilizados, especialmente en el caso de LSS; este efecto fue independiente del pH del medio al que se adicionó el tensioactivo. Este efecto está de acuerdo con lo que reporta la literatura para medios de disolución de este tipo de principios activos, donde la solubilidad acuosa es baja e independiente del pH del medio (Hohrs, 2001), (E. Galia, 1998), (G. P. Martin, 2011).

Tabla 4-3 Datos de solubilidad en equilibrio para progesterona y establecimiento de condiciones sumidero, para 250 mL y 900 mL de varios medios con cantidades crecientes de LSS a 37°C (n=2).

LSS (Lauril sulfato de sodio); JGS (Jugo gástrico simulado); ACE (buffer acetato pH 4.5); FOS (buffer fosfato pH 6.8)

Medio	Cs: Solubilidad (promedio \pm SD) $\mu\text{g/mL}$	Condiciones Sumidero	Condiciones Sumidero
		(para un volumen de 250mL)	(para un volumen de 900mL)
Agua (A-0.0)	99.105 \pm 10.063	0.1	0.4
A-LSS-0.5	853.046 \pm 46.685	1	4

Medio	Cs: Solubilidad (promedio \pm SD) $\mu\text{g/mL}$	Condiciones Sumidero	Condiciones Sumidero
		(para un volumen de 250mL)	(para un volumen de 900mL)
A-LSS-1.0	1899.999 \pm 8.414	2	9
A-LSS-1.5	2974.622 \pm 4.463	4	13
A-LSS-2.0	3121.464 \pm 4.64	4	14
A-LSS-2.5	4594.491 \pm 4.039	6	21
A-LSS-3.0	6267.080 \pm 0.742	8	28
A-LSS-3.5	6455.277 \pm 9.234	8	29
A-LSS-4.0	7663.843 \pm 12.162	10	34
JGS-0.0	84.945 \pm 18.816	0.1	0.4
JGS-LSS-0.5	832.808 \pm 4.325	1	4
JGS-LSS-1.0	1668.191 \pm 20.739	2	8
JGS-LSS-1.5	2675.481 \pm 64.311	3	12
JGS-LSS-2.0	2896.837 \pm 12.304	4	13
JGS-LSS-2.5	4406.465 \pm 22.519	6	20
JGS-LSS-3.0	6535.800 \pm 55.696	8	29
JGS-LSS-3.5	6678.117 \pm 90.604	8	30
JGS-LSS-4.0	7862.133 \pm 9.027	10	35
ACE-0.0	86.564 \pm 5.618	0.1	0.4
ACE-LSS-0.5	897.550 \pm 15.130	1	4
ACE-LSS-1.0	1869.892 \pm 55.143	2	8
ACE-LSS-1.5	2873.192 \pm 22.568	4	13
ACE-LSS-2.0	2753.972 \pm 16.516	3	12
ACE-LSS-2.5	4756.475 \pm 24.596	6	21

Medio	Cs: Solubilidad (promedio \pm SD) $\mu\text{g/mL}$	Condiciones Sumidero	Condiciones Sumidero
		(para un volumen de 250mL)	(para un volumen de 900mL)
ACE-LSS-3.0	6240.733 \pm 2.098	8	28
ACE-LSS-3.5	6325.583 \pm 110.332	8	28
ACE-LSS-4.0	7628.833 \pm 129.401	10	34
FOS-0.0	84.495 \pm 18.816	0.1	0.4
FOS-LSS-0.5	832.808 \pm 4.325	1	4
FOS-LSS-1.0	1668.191 \pm 20.739	2	8
FOS-LSS-1.5	2675.481 \pm 34.311	3	12
FOS-LSS-2.0	2896.837 \pm 12.304	4	13
FOS-LSS-2.5	4406.465 \pm 22.519	6	20
FOS-LSS-3.0	6535.800 \pm 90604	8	30
FOS-LSS-3.5	6678.117 \pm 90.604	8	30
FOS-LSS-4.0	7862.133 \pm 9.027	10	35

Para el cálculo de las condiciones sumidero se asumieron dos volúmenes: 250 mL, que es el máximo volumen para aparato 3; y 900 mL que es el máximo volumen para aparato 1 y 2. Para establecer si existen condiciones sumidero, se divide la solubilidad encontrada por la unidad de dosis máxima de Progesterona cápsulas (200 mg) y se multiplica por el volumen de medio (corrigiendo unidades a mg). El factor obtenido, es el número de veces en que la unidad de dosis máxima se disuelve en el volumen de medio evaluado. En términos generales se acepta que existen condiciones sumidero, cuando el factor es 3 o mayor (FDA Guidance for Industry: Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms, 1997), (G. P. Martin, 2011); es decir que en el volumen de medio seleccionado se pueden disolver al menos tres cápsulas de 200 mg.

La importancia de garantizar condiciones sumidero, es que bajo dichas condiciones la velocidad de disolución del fármaco que permanece en la forma de dosificación, es independiente de la cantidad de fármaco que ya se ha disuelto en el medio, lo que permite que la velocidad de disolución que se mida sea dependiente netamente del medicamento (Brown, 2014).

La [Figura 4-2](#) y la [Figura 4-3](#) muestran la relación entre el factor para condiciones de sumidero y el porcentaje de LSS en cada uno de los medios evaluados.

Figura 4-2 Relación entre concentración de LSS y condiciones sumidero para 250 mL de medio.

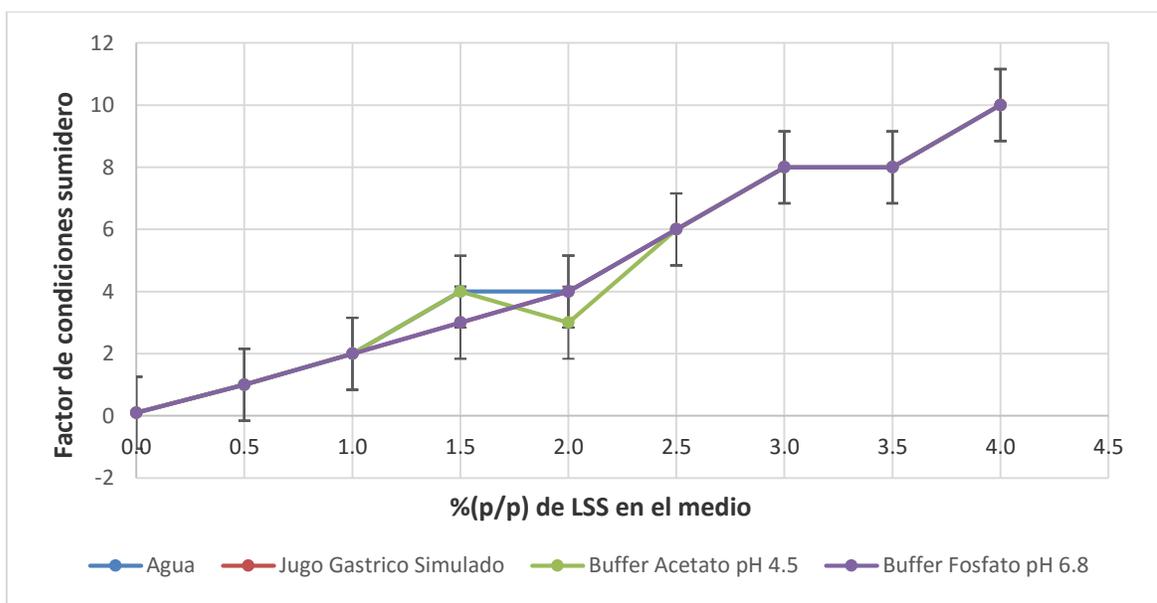
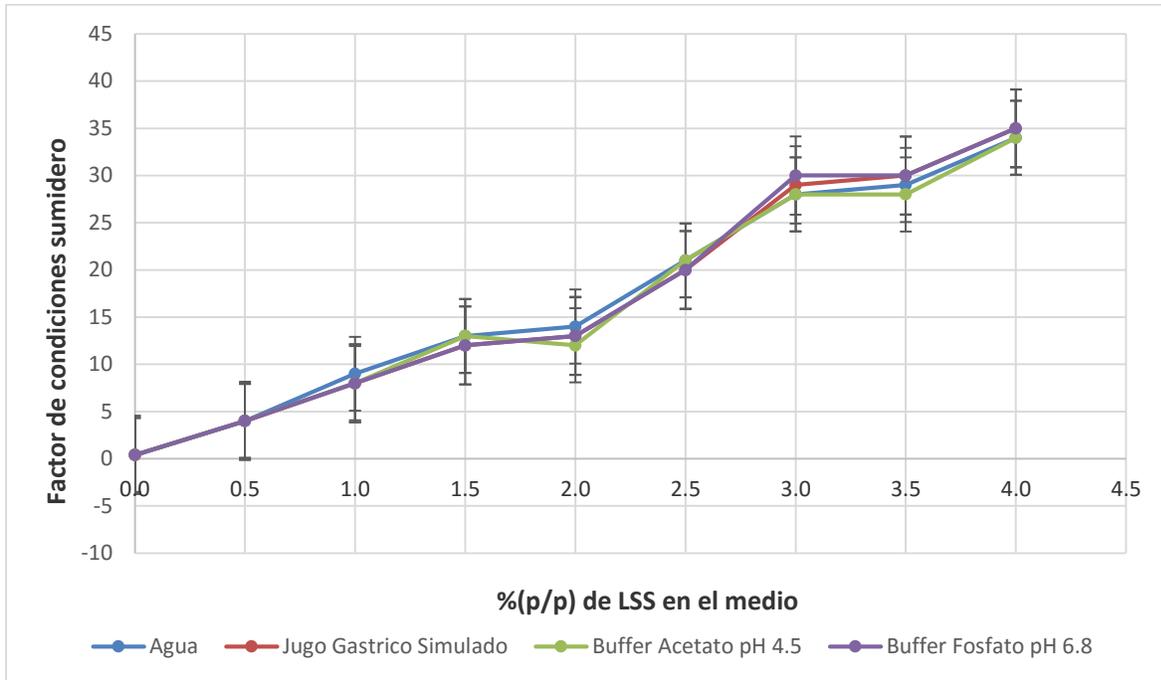


Figura 4-3 Relación entre concentración de LSS y condiciones sumidero para 900 mL de medio.



Se puede observar como de acuerdo a la solubilidad obtenida para progesterona, se garantizan las condiciones sumidero (factor mayor o igual a 3) con una concentración de al menos 1.5% de LSS, en cada uno de los medios, si se asume un volumen de disolución de 250 mL o mayor. Si se considera un volumen de medio de 900 mL, se alcanzan condiciones sumidero con al menos 0.5% de LSS.

Cabe aclarar que el hecho de alcanzar condiciones sumidero, no garantiza que se disuelva toda la cantidad deseada en un tiempo determinado, ya que las condiciones sumidero están principalmente relacionadas con la solubilidad en el equilibrio, es decir, que el medio es capaz de disolver una cantidad determinada pero la velocidad con que lo hace va a ser dependiente del medicamento y de las condiciones de disolución.

Por lo explicado anteriormente, se hace necesario evaluar el medicamento con la cantidad de LSS que garantiza las condiciones sumidero, pero en cada uno de las aparatos de disolución disponibles, buscando disolver al menos un 85% de la dosis de una cápsula de 200 mg, pero en un tiempo no mayor a 60 minutos; esto entregaría una metodología de

disolución con un tiempo adecuado para ser utilizada de manera rutinaria en el laboratorio para el control de calidad de progesterona cápsula, en lo relacionado a su disolución.

Al evaluar la máxima dosis del producto (200 mg) en cada uno de los aparatos, se podrían seleccionar aquellos en los cuales se garantiza al menos el 85% de disolución en no más de 60 minutos, para posteriormente establecer las variables de operación que permitirían que el método de análisis discriminara el perfil de disolución de productos con diferencias significativas.

Como no se observaron diferencias respecto al pH del medio de disolución, en este punto se decidió continuar con buffer fosfato pH 6.8, y a menos que se especifique otra cosa, los resultados que se muestran de aquí en adelante, son utilizando buffer fosfato pH 6.8 con la cantidad de LSS que se indique en cada caso. No se utilizaron ni los otros medios (por no haber diferencias respecto a buffer fosfato pH 6.8), ni el tensioactivo polisorbato 80, ya que este no garantizaba condiciones sumidero en el rango evaluado.

La razón por la que seleccionó tampón de fosfato 6.8 sobre los otros medios, es que se trató de seleccionar un medio con pH similar al sitio de absorción de la progesterona, la cual ocurre principalmente al nivel del duodeno: 6.8 (J.T. Hargrove, 1989), (F.A. Kind, 1987).

4.3 Selección del aparato de disolución.

Los resultados para los aparatos 1, 2 y 3 se resumen en la [Tabla 4-4](#), [Tabla 4-5](#) y [Tabla 4-6](#), respectivamente.

Tabla 4-4 Perfil de disolución de progesterona 200 mg, en Aparato 1, con 900 mL de buffer fosfato pH 6.8 con 4% de LSS, operado a 150 rpm.

Cápsula No.	% disuelto (sobre lo rotulado: 200 mg) a los siguientes tiempos:					
	1 hora	3 horas	5 horas	7 horas	9 horas	11 horas
1	17.4	73.5	95.8	98.2	99.5	100.2
2	21.5	78.5	92.0	101.1	100.2	101.2
3	19.9	74.8	90.1	99.5	99.9	100.3
4	21.4	80.9	93.1	98.5	101.2	101.2
5	20.1	76.3	86.2	100.6	102.0	101.2
6	20.5	73.4	90.6	101.4	99.9	100.8

Cápsula No.	% disuelto (sobre lo rotulado: 200 mg) a los siguientes tiempos:					
	1 hora	3 horas	5 horas	7 horas	9 horas	11 horas
Promedio	20	76	91	100	101	101
SD	1.5	3.0	3.2	1.3	1.0	0.5
RSD	8	4	4	1	1	0

Tabla 4-5 Perfil de disolución de progesterona 200 mg, en Aparato 2, con 900 mL de buffer fosfato pH 6.8 con 4% de LSS, operado a 100 rpm.

Cápsula No.	% disuelto (sobre lo rotulado: 200 mg) a los siguientes tiempos:					
	1 hora	3 horas	5 horas	7 horas	9 horas	11 horas
1	15.2	41.9	62.7	78.9	89.6	95.9
2	16.9	42.3	67.1	83.4	92.5	98.4
3	15.5	38.4	63.6	81.4	94.1	100.0
4	18.1	42.4	63.6	81.0	93.1	99.0
5	17.5	41.3	61.4	76.7	88.3	95.5
6	13.9	35.2	54.3	68.7	81.2	90.2
Promedio	16	40	62	78	90	96
SD	1.6	2.9	4.3	5.3	4.7	3.5
RSD	10	7	7	7	5	4

Tabla 4-6 Perfil de disolución de progesterona 200 mg, en Aparato 3, con 250 mL de buffer fosfato pH 6.8 con 4% de LSS, operado a 40 inmersiones por minuto.

Cápsula No.	% disuelto (sobre lo rotulado: 200 mg) a los siguientes tiempos:			
	15 minutos	30 minutos	45 minutos	60 minutos
1	91.6	99.1	98.0	99.9
2	93.9	100.0	99.0	100.2
3	97.4	100.9	101.0	101.0
4	97.6	101.0	99.0	99.0
5	95.5	98.2	99.0	101.0
6	97.1	99.7	102.0	101.0
Promedio	96	100	100	100
SD	2.4	1.1	1.5	0.8
RSD	3	1	2	1

La [Figura 4-4](#) y la [Figura 4-5](#) muestran los perfiles de disolución para aparato 1 y 2 comparados, y aparato 3, respectivamente.

Figura 4-4 Perfil de disolución de progesterona 200 mg, en Aparato 1 (150 rpm) y Aparato 2 (100 rpm); utilizando 900 mL de buffer fosfato pH 6.8 con 4% de LSS.

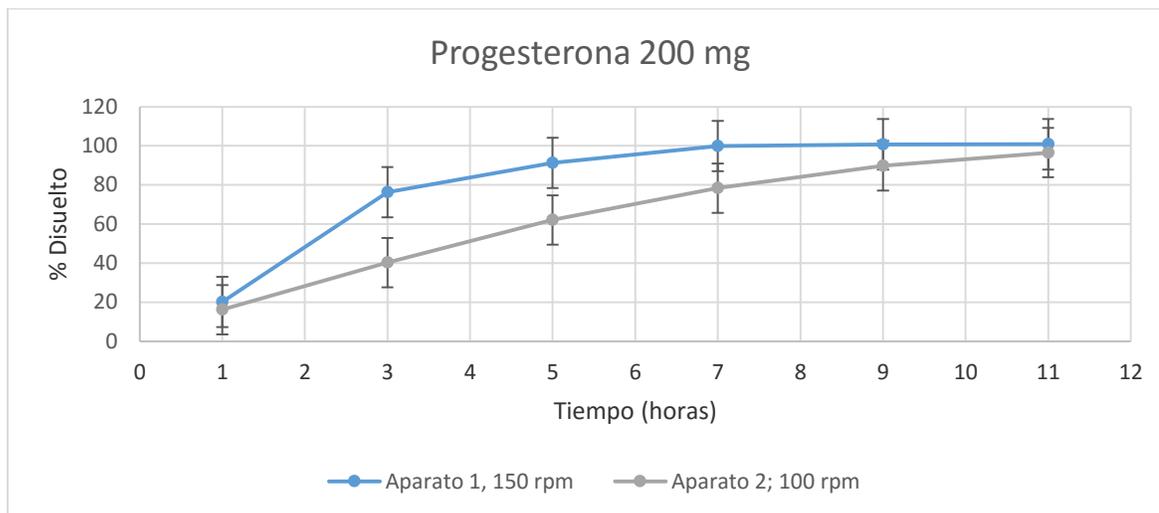
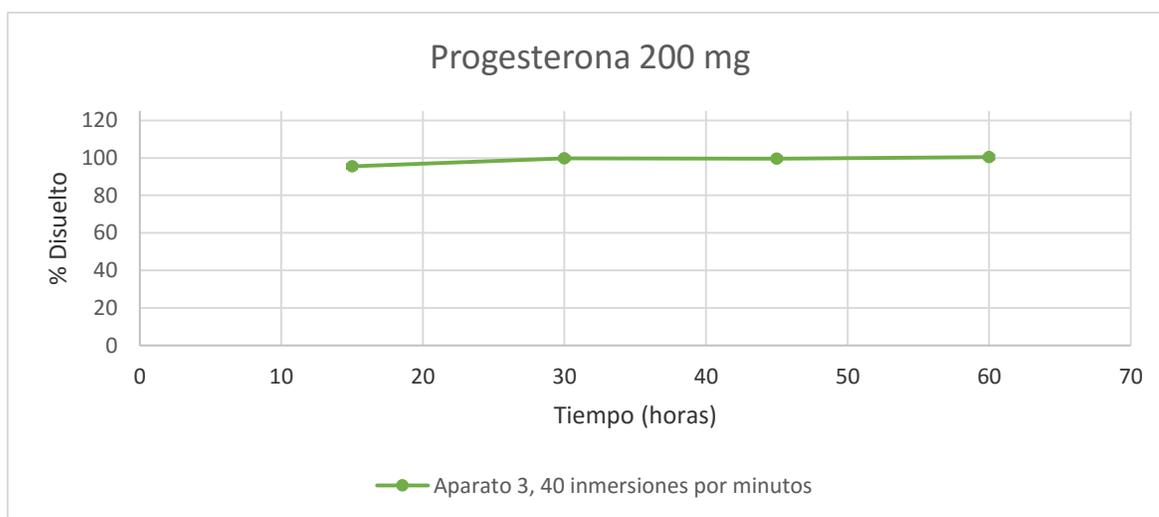


Figura 4-5 Perfil de disolución de progesterona 200 mg, en Aparato 3, 40 inmersiones por minuto); utilizando 250 mL de buffer fosfato pH 6.8 con 4% de LSS.



Los resultados encontrados mostraron una marcada diferencia para la misma muestra cuando se usaban los aparatos 1 ó 2; pero aún más marcada fue la diferencia entre cualquiera de esos aparatos y el aparato 3.

En el aparato 1 o 2 en las condiciones más drásticas de operación de estos equipos y aún con el porcentaje máximo de LSS evaluado (4%), el tiempo necesario para alcanzar al menos 85% disuelto era de más de dos horas por lo que se descartó el uso de estos aparatos para el método deseado. Al observar el comportamiento de la disolución de la

cápsula oleosa, se observó que, aunque la película de gelatina se disolvía en menos de 30 minutos, en el fondo del vaso permanecía el contenido oleoso el cual se disolvía muy lentamente y que en ningún momento se disgregó para incorporarse con el medio: esto puede explicar la baja velocidad de disolución observada. Los tiempos que se encontraron en los aparatos 1 y 2 coinciden con los reportados para un método de disolución para el mismo producto, pero en el que se usaban ciclodextrinas para disolverlo (A. Besisns, 2008). Aunque no se puede comparar el efecto de las ciclodextrinas con el del LSS, lo que cabe resaltar es que quizás el mismo modo de disolución (debido a la poca incorporación de la muestra en el medio), puede ser la causa de tiempos tan altos en ambas condiciones.

Por otro lado, cuando se analizó las mismas muestras con 900 mL de buffer fosfato con 4% de LSS pero en el Aparato 3, el porcentaje disuelto fue casi que total a los 15 minutos. En este caso, se observó que el movimiento hacia arriba y abajo de la celda, entrando y saliendo del vaso de disolución, ayudaban a disgregar el contenido oleoso, lo que ayudó a la incorporación con el medio y por ende a su disolución en un medio que de antemano se sabía que podía disolver hasta 10 veces (ver [Tabla 4-2](#)) la cantidad contenida en el vaso (200 mg).

En este punto se seleccionó el aparato 3 para las siguientes etapas del presente trabajo, y a menos que se especifique otra cosa, los datos que se presenten de aquí en adelante serán utilizando dicho aparato.

Cabe anotar que, a este punto, habiendo seleccionado el aparato y medio con no más de 4% de LSS, no estaba aún definido el método de disolución, sino que se tenían unas condiciones en las que se obtendría no menos de 85% disuelto en no más de 60 minutos, el cual era uno de los objetivos en el desarrollo del método. Lo que seguía ahora era el seleccionar los valores para cada una de las condiciones de disolución en el aparato 3, para lograr que el método propuesto fuera capaz de discriminar el comportamiento de disolución de dos productos con diferencias significativas que pudieran impactar su velocidad de disolución y por consiguiente su biodisponibilidad, pero idealmente con un tiempo para la prueba de disolución de no más de 60 minutos.

4.4 Selección de condiciones de disolución.

Para la selección de las condiciones de disolución, se inició con un diseño de Plackett-Burman para evaluar los efectos de las diversas variables relacionadas del aparato 3, sobre la velocidad de disolución y especialmente sobre la capacidad del método para diferenciar el perfil de disolución de dos productos con diferencias en su manufactura que pudieran afectar la velocidad de disolución y por ende su biodisponibilidad. La [Tabla 4-7](#) resume las variables estudiadas y los valores escogidos para evaluación.

Tabla 4-7 Variables seleccionadas para el diseño experimental.

Variable	Niveles	
	-1	+1
Medio de Disolución	Agua	Buffer Fosfato pH 6.8 (FOS)
% de LSS en el medio	3	4
Volumen de Medio (mL)	220	250
Malla Superior	30	40
Inmersiones por Minuto	30	40
Sinkers	NO	SI
Desgasificación del Medio	NO	SI

A continuación se presenta la justificación para cada uno de los parámetros seleccionados así como los valores propuestos:

- a) **Medio de Disolución:** aunque hasta este punto se había seleccionado el medio buffer fosfato pH 6.8, se quiso comprobar que el efecto del pH del medio sobre la velocidad de disolución no era relevante. Como se mencionó anteriormente, el medio seleccionado sería buffer fosfato pH 6.8 ya que tenía el pH más cercano al sitio de absorción de la progesterona (duodeno).
- b) **Porcentaje de LSS en el medio:** esta era quizás la variable más importante ya que la solubilidad y la velocidad de disolución de la progesterona eran dependientes de la concentración de LSS en el medio. Para el propósito del diseño experimental, se decidió iniciar con un rango de concentración de LSS entre 3% y 4%, con el fin de

garantizar una rápida disolución (85% o más en no más de 60 minutos). Aunque el estudio de condiciones de sumidero mostró que dichas condiciones se alcanzaban con una menor concentración de LSS, se decidió usar mínimo 3%, y en caso de que el método no mostrará adecuada discriminación entre lotes con diferencias significativas, se contempló reducir la concentración de LSS; esto disminuiría la velocidad de disolución pero muy probablemente aumentaba el poder discriminatorio, de ser necesario.

- c) **Volumen de medio (mL):** los vasos que se utilizan en el aparato 3 pueden contener entre 220 y 250 mL de medio, y, basados en los datos obtenidos para condiciones sumidero, en el rango de concentraciones de LSS a evaluar (3% a 4%), se mantendrían las condiciones sumidero independiente del volumen utilizado (220 o 250 mL).
- d) **Malla superior:** la celda donde se coloca la muestra a ser evaluada en este aparato, debe ser sellada con unas mallas, las cuales pueden tener diferentes diametro de luz (mesh) y que pueden afectar la velocidad de disolución; la recomendación de la USP es que la malla inferior sea de un número mayor (mayor número de agujeros por área) que la superior, es por eso que se dejó fija la malla inferior como malla 40, y se varió la superior entre malla 30 y malla 40.
- e) **Inmersiones por minuto:** este parámetro es el número de veces que en un minuto, la celda conteniendo la muestra entra y sale del vaso que almacena el medio. Es equivalente a las rpm de los aparatos 1 y 2 y los valores recomendados son hasta 40 inmersiones por minuto. Al igual que con el LSS, se decidió utilizar valores relativamente altos de esta variable (30 y 40 inmersiones por minuto), con el fin de garantizar un método rápido. Sin embargo, se contempló disminuir este valor si fuese necesario para lograr mayor poder discriminatorio del método propuesto.
- f) **Sinkers:** en todos los aparatos evaluados, pero especialmente en el aparato 3, se observó que de no usarse un sinker, la cápsula flotaría durante la prueba, y, teniendo e cuenta que es una de las fuentes más seguras de variación de los resultados de disolución, se decidió evaluar el efecto de su presencia o ausencia

durante la disolución (R. A. Soltero, 1989). El sinker seleccionado corresponde al 8-mesh Basket, recomendado por USP, y que por su tamaño se encontró adecuado para contener la cápsula evaluada (100 o 200 mg). Este sinker está disponible en QLA Lab. Accessories bajo el número de parte: BSK008-JP, y se muestra en la [Figura 4-6](#).

Figura 4-6 Sinker utilizado durante el diseño experimental.



- g) **Desgasificación del medio:** se deseaba evaluar el efecto de la desgasificación del medio, previa a la adición del LSS. En términos generales se recomendaría siempre desgasificar el medio, pero se quería ver si este podía ser uno de los métodos en los que la presencia de gases disueltos afectaría significativamente los resultados de disolución (Z. Gao, 2006).

El diseño experimental seleccionado fue un Plackett-Burmann de 8 experimentos, tal y como se muestra en la [Figura 3-1](#). Los perfiles se corrieron hasta 90 minutos, y con muestreos de 15 minutos. Se encontró que de esa forma se lograba al menos un 85% disuelto en todos los experimentos.

NOTA: en todos los ensayos se adicionaron entre 3 a 5 gotas de silicona líquida a cada vaso con el fin de evitar la excesiva formación de espuma. Esta práctica es una

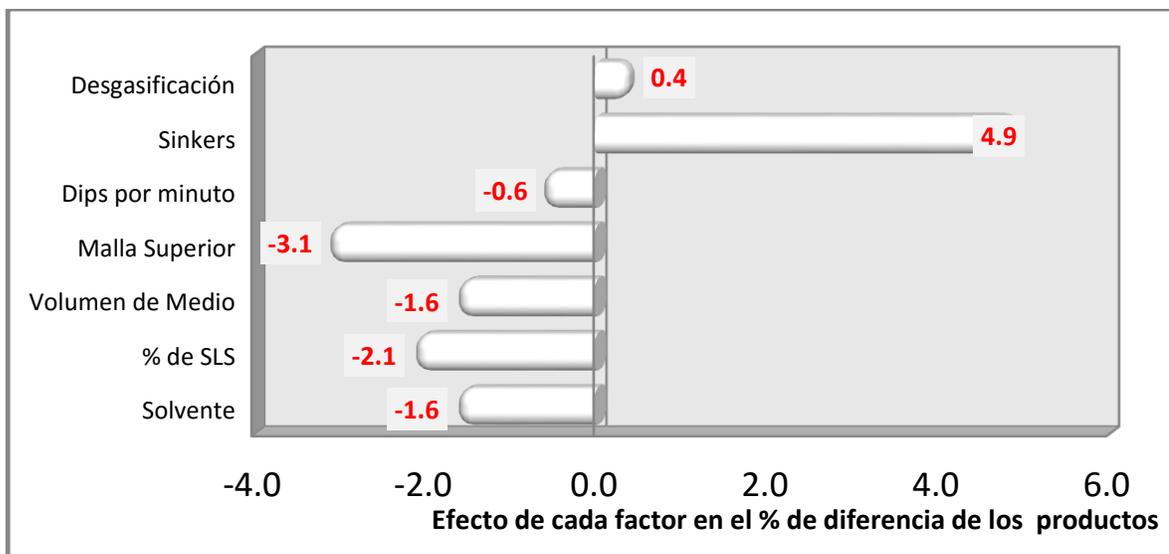
recomendación encontrada en la misma USP para varios ensayos con aparato 3 cuyo medio de disolución contenía LSS por ejemplo tabletas de carbamazepina de liberación modificada.

En cada uno de los experimentos se realizó la disolución de dos productos de progesterona 200 mg, que se habían fabricado con diferencias en su tamaño de partícula. Por temas de confidencialidad de la formulación, no es posible entregar los datos completos de la distribución de tamaño de partícula, pero se puede mencionar que uno de los productos presentaba una distribución de tamaño de partícula donde el 90% de sus partículas era menor de 120 micras, mientras que en el segundo producto el 90% de sus partículas era menor de 250 micras. El primero de ellos se usó como producto de referencia para el cálculo de f_2 , los resultados se resumen en la Tabla 4-8. Con los datos obtenidos, se construyó un diagrama de Gantt que muestra la magnitud y signo de cada efecto sobre la respuesta seleccionada. Ver [Figura 4-7](#).

Tabla 4-8 Resultados obtenidos para el diseño experimental.

Experimento No.	Medio de Disolución	% de SLS	Volumen de Medio	Malla Superior	Dips por minuto	Sinkers	Desgasificación	% Diferencia entre los perfiles	f_2
1	Agua	3	220	40	30	SI	SI	23	33
2	Buffer pH 6.8	3	220	30	40	NO	SI	15	41
3	Buffer pH 6.8	4	220	30	30	SI	NO	21	34
4	Agua	4	250	30	30	NO	SI	12	47
5	Buffer pH 6.8	3	250	40	30	NO	NO	6	63
6	Agua	4	220	40	40	NO	NO	7	56
7	Agua	3	250	30	40	SI	NO	24	31
8	Buffer pH 6.8	4	250	40	40	SI	SI	11	48

Figura 4-7 Diagrama que muestra la magnitud y signo del efecto de cada variable sobre la respuesta.



Se puede observar que variables como la desgasificación o las inmersiones por minuto, en los rangos evaluados, tuvieron poco efecto en la respuesta, es decir, no influyeron significativamente en el poder discriminatorio del método de disolución. Sin embargo, se recomendará siempre desgasificar el medio ya que es una buena práctica en la búsqueda de reproducibilidad de resultados entre laboratorio y en el caso de las inmersiones por minuto, se recomendará un valor de 30 inmersiones por minuto para disminuir la posibilidad de formación de espuma.

Por otro lado, la presencia de sinkers aumenta el porcentaje de diferencia encontrado entre dos productos diferentes; se cree que esto se debe al hecho de que el sinker aseguró que la cápsula estuviese siempre en el fondo del vaso durante la prueba, por lo que se disminuyó la variabilidad de los datos y se pudo asegurar que la disolución obtenida dependiera en buena parte del desempeño de la forma de dosificación. Por esto, se decidió incluir el uso del sinker anteriormente especificado, en el método de disolución.

También se observó que el aumentar el número de la malla superior, de 30 a 40, tiene un efecto negativo en el poder discriminatorio del método. Esta observación coincide con la recomendación de USP de usar una malla superior de un número menor al de la malla inferior, y que lo que busca es que los agregados y material disuelto al interior de la celda, puedan salir de la celda por la parte superior e incorporarse en el medio de disolución (US Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 38, NF 33, 2016). Se decidió especificar la malla inferior como 40 y la superior como 30.

Con relación al porcentaje de LSS, aunque se encontró que había un ligero efecto negativo sobre la respuesta al aumentar la concentración de LSS, con el fin de mantener un tiempo corto para la prueba, se decidió seguir trabajando con 4% y si durante la fase de evaluación del poder discriminatorio del método, se observaba que era necesario disminuir ese porcentaje, se contempló hacerlo.

Por último, con relación al medio de disolución se fijó en 250 mL de buffer fosfato pH 6.8. La razón es que esos dos parámetros no se observaron significativos sobre la respuesta y con el volumen de 220 mL se observó que la celda no quedaba 100% inmersa en el vaso, al momento en el que bajaba durante las inmersiones.

La [Tabla 4-9](#) resume las condiciones seleccionadas para el método de disolución. Con estas condiciones, se estableció un tiempo de prueba de 45 minutos, en el cual se garantizaba al menos un 85% disuelto del producto de prueba: Progesterona 200 mg cápsula blanda de gelatina.

Tabla 4-9 Condiciones seleccionadas para el método de disolución.

Parámetro	Condiciones
Aparato	3, cilindro oscilante
Sinker	QLA Lab. Accesorios bajo el número de parte: BSK008-JP
Medio	250 mL de Tampón de fosfato de pH 6.8, con 4% (p/v) de LSS
Velocidad	30 inmersiones por minuto
Malla Inferior	40
Malla Superior	30

Parámetro	Condiciones
Temperatura	37°C ± 0.5°C
NOTA	Adicionar 3 a 5 gotas de silicona líquida a cada vaso, para evitar la formación de excesiva espuma

4.5 Evaluación del poder discriminatorio del método.

Esta evaluación se realizó utilizando el método desarrollado para analizar lotes de progesterona 100 y 200 mg, los cuales fueron utilizados en estudios de bioequivalencia; entre estos lotes se tenían unos que mostraron ser bioequivalentes y otros que fallaron ese estudio.

4.5.1 Descripción de los lotes utilizados.

Por razones de confidencialidad del producto desarrollado, algunos detalles de las formulaciones evaluadas serán omitidos. Sin embargo, la información que se dará a conocer se cree es suficiente para la interpretación de los resultados y la evaluación del poder discriminatorio del método de disolución propuesto.

Como se mencionó anteriormente, para el producto progesterona cápsulas, uno de los factores más influyentes en su biodisponibilidad, es el tamaño de partícula del principio activo de la suspensión contenida en ellas (F.A. Kind, 1987). Por ello, durante el desarrollo de este producto, se fabricaron fórmulas que variaban en la distribución de tamaño de partícula (los otros parámetros de formulación se definieron previamente y se dejaron constantes); dichos lotes se sometieron a estudios *in vivo* (bioequivalencia) con el fin de establecer una relación entre el tamaño de partícula del principio activo y su biodisponibilidad.

La [Tabla 4-10](#) resume la información de los lotes utilizados para el presente trabajo. Los lotes denominados de prueba, se compararon contra un mismo lote de referencia.

La columna denominada “código”, describe la forma como referirse a cada lote en particular, de aquí en adelante.

La columna de resultados de tamaño de partícula, muestra sólo el valor de d(0.9), que corresponde al valor de tamaño de partícula por debajo del cual está el 90% de todas las partículas de la muestra. Generalmente, junto a este valor se muestran los de d(0-1) y d(0-5), (similares al anterior pero reemplazando 90% por 10 y 50%, respectivamente), pero por razones de confidencialidad, sólo se mostrará el valor señalado. A mayor d(0.9), se puede decir que es mayor el tamaño de partícula de la muestra.

Tabla 4-10 Datos de los lotes de referencia y prueba utilizados en la evaluación del poder discriminatorio del método.

Código	Producto	Lote	Tamaño de Partícula
Referencia	Prometrium® 100 mg	1PXKC06	d(0.9) = 28 µm
Prueba 1	Progesterona 100 mg	PR190910	d(0.9) = 30 µm
Prueba 2	Progesterona 100 mg	PR110903	d(0.9) = 12 µm

4.5.2 Resultados de Bioequivalencia.

Los estudios de bioequivalencia fueron llevados a cabo en Canadá. Por razones de confidencialidad, no es posible divulgar el instituto donde se realizaron, pero se puede garantizar que se trató de un centro aprobado por FDA (Food and Drug Administration, de los Estados Unidos), para este tipo de estudios.

El estudio se realizó en condiciones de ayuno y utilizando aproximadamente 50 mujeres post-menopáusicas.

Cada producto de ensayo (Prueba 1 y Prueba 2) se comparó bajo las mismas condiciones, contra el lote denominado Referencia. El resumen de los resultados para cada estudio se muestra en la [Tabla 4-11](#). No se incluye el tiempo para alcanzar la concentración máxima (T_{max}) debido a que no fue este un parámetro utilizado para evaluar bioequivalencia de acuerdo a las regulaciones del mercado donde se comercializaría el producto desarrollado.

Tabla 4-11. Resumen de resultados para los estudios de bioequivalencia de los lotes Prueba 1 y Prueba 2 contra el lote Referencia.

Productos Evaluados	Área Bajo la Curva de 0 a t (ABC_t)		Área Bajo la Curva de 0 a infinito (ABC_{inf}) en ng x hr/mL		Concentración Plasmática Máxima (C_{max}) en ng/mL	
	Promedio	90% IC	Promedio	90% IC	Promedio	90% IC
Prueba 1 versus Referencia	101.67	87.66 - 115.67	109.01	94.65 - 123.36	101.67	87.66 - 115.67
Prueba 2 versus Referencia	88.80	82.56 - 95.03	97.00	90.55 - 103.45	71.50	61.24 - 81.76

De acuerdo a los resultados, el lote denominado Prueba 1 mostró ser bioequivalente comparado contra el lote Referencia, ya que los parámetros farmacocinéticos (ABC y C_{max}) estuvieron dentro de los límites de 80 a 125%. Por otro lado, el lote denominado Prueba 2, no mostró ser bioequivalente al lote de Referencia, en términos de su C_{max} .

El tener lotes que cumplen y que no cumplen el criterio de bioequivalencia, permite evaluar el poder discriminatorio del método de disolución; se busca que los datos *in vitro* muestren comportamiento similar que los datos *in vivo*: esto es, que el producto Prueba 1 sea bioequivalente contra el de Referencia, pero no lo sea el producto Prueba 2.

4.5.3 Resultados *in vitro*: perfiles de disolución.

Se procedió a realizar los perfiles de disolución de los lotes mostrados en la [Tabla 4-10](#), utilizando el método de disolución desarrollado, cuyas condiciones se resumen en la [Tabla 4-9](#).

De cada uno de los lotes se analizaron 12 unidades, y los intervalos de muestreo se seleccionaron de acuerdo a ensayos preliminares realizados con cada uno de los lotes: 5, 15, 30, 45 y 60 minutos, garantizando que en todos los casos se disolviera al menos el 85% de lo rotulado. Los resultados se presentan de manera individual en la [Tabla 4-12](#),

[Tabla 4-13](#) y [Tabla 4-14](#), para los lotes de Referencia, Prueba 1 y Prueba 2, respectivamente. Los mismos datos se muestran de manera gráfica, para los tres productos, en la [Figura 4-8](#).

Tabla 4-12 Resultados individuales de 12 cápsulas del lote **Referencia** usando la metodología de disolución propuesta.

Lote de Referencia: 1PXKC06					
% Disuelto (sobre lo rotulado)					
Cápsula No.	Intervalo de muestreo (minutos)				
	5	15	30	45	60
1	5	29	94	99	100
2	3	23	95	98	99
3	5	35	92	96	98
4	8	32	92	96	99
5	5	33	96	98	101
6	6	30	90	96	99
7	5	33	92	94	95
8	6	40	93	95	101
9	5	39	96	98	100
10	4	56	94	96	99
11	4	33	95	97	100
12	7	35	92	95	99
Promedio	5	35	93	97	99
SD	1.3	8.1	1.9	1.5	1.6
CV%	25	23	2	2	2
MIN	3	23	90	94	95
MAX	8	56	96	99	101

Tabla 4-13 Resultados individuales de 12 cápsulas del lote **Prueba 1** usando la metodología de disolución propuesta.

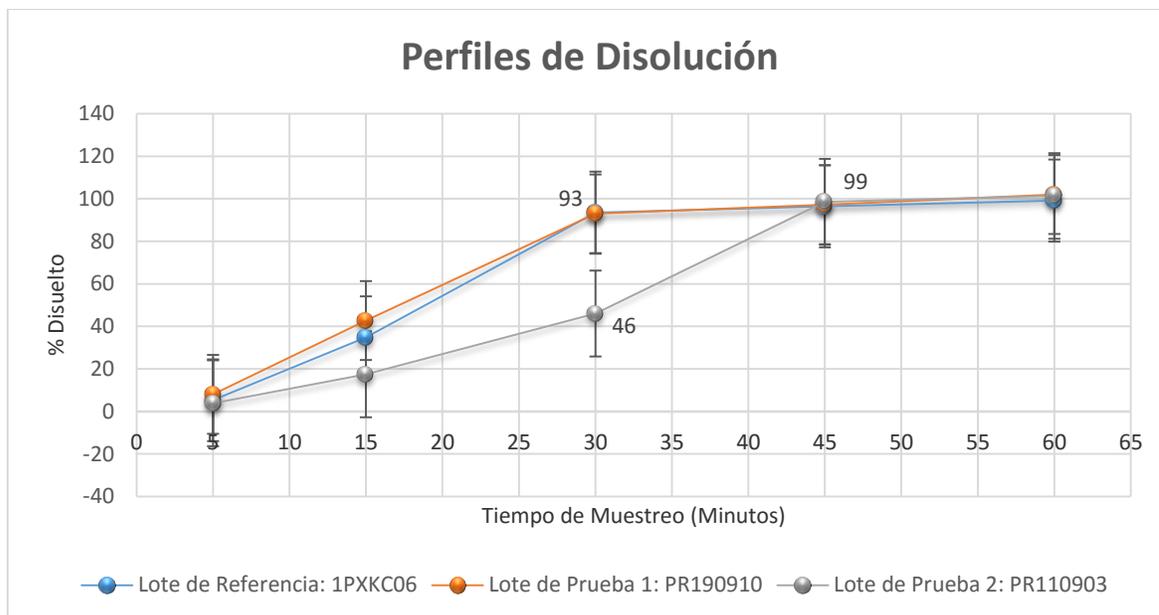
Lote de Prueba 1: PR190910					
% Disuelto (sobre lo rotulado)					
Cápsula No.	Intervalo de muestreo (minutos)				
	5	15	30	45	60
1	8	42	90	96	101
2	9	33	97	98	104
3	6	46	87	95	102
4	7	43	91	94	101
5	5	55	90	96	99
6	5	35	91	95	100
7	7	38	96	97	101
8	10	82	98	101	104
9	9	38	98	100	104
10	12	33	95	100	104
11	8	34	88	96	100
12	9	34	96	99	104
Promedio	8	43	93	97	102
SD	2.2	13.9	4.1	2.2	2.0
CV%	27	32	4	2	2
MIN	5	33	87	94	99
MAX	12	82	98	101	104

Tabla 4-14 Resultados individuales de 12 cápsulas del lote **Prueba 2** usando la metodología de disolución propuesta.

Lote de Prueba 2: PR110903

% Disuelto (sobre lo rotulado)					
Cápsula No.	Intervalo de muestreo (minutos)				
	5	15	30	45	60
1	5	18	45	102	104
2	2	19	48	100	101
3	6	17	43	101	104
4	2	23	54	97	100
5	4	21	52	99	102
6	6	18	50	98	100
7	2	11	38	94	101
8	3	16	41	99	101
9	5	20	62	98	100
10	3	15	41	100	101
11	2	17	42	99	101
12	6	15	36	96	101
Promedio	4	18	46	99	101
SD	1.7	3.1	7.5	2.2	1.4
CV%	44	18	16	2	1
MIN	2	11	36	94	100
MAX	6	23	62	102	104

Figura 4-8 Perfil de disolución obtenido para cada uno de los lotes evaluados, utilizando la metodología de disolución propuesta.



En todos los perfiles obtenidos, tanto para los productos de prueba como para el referente, los valores de CV% son altos (mayores a 20%) en los muestreos de 5 y 15 minutos. La razón de estos valores de CV%, es que antes de los 10 a 12 minutos, la desintegración de la cápsula blanda no es completa y es especialmente variable; esto es algo común para la cápsulas blandas en comparación con una tableta o cápsula dura de liberación inmediata donde luego de unos 6 a 8 minutos, se han desintegrado en su totalidad y la velocidad de disolución en los primeros tiempos (a menos que se muestree antes de los 5 minutos aproximadamente), no se afecta significativamente por el efecto de material atrapado por la cubierta o recubrimiento externo.

Utilizando el método del factor independiente, se calculó el factor de similitud y el factor de diferencia para cada una de las posibles comparaciones entre los tres lotes evaluados. Los resultados se resumen en la [Tabla 4-15](#) tomando sólo un punto por encima del 85% para los cálculos correspondientes.

Tabla 4-15 Resultados de factor de similitud (f2) y diferencia (f1) para cada una de las posible comparaciones entre los tres lotes evaluados.

Comparación	Factor de Similitud (f2) (50-100)	Factor de Diferencia (f1) (0-10)	Puntos de Muestreo Utilizados (minutos)
Prueba 1 versus Referencia	64	10	5, 15 y 30
Prueba 2 versus Referencia	30	29	5, 15, 30 y 45
Prueba 2 versus Prueba 1	29	32	5,15, 30 y 45

4.5.4 Interpretación de los resultados

Los resultados de los perfiles de disolución muestran la misma tendencia que los datos de bioequivalencia. Si se observan los perfiles de Referencia y Prueba 1 (que fueron bioequivalentes), prácticamente existe una superposición de las dos curvas, lo que se verifica con el resultado de f2 entre estos dos perfiles que es mayor a 50 (64). Por otro lado, los perfiles de disolución de Prueba 2 versus Referencia, presentan diferencia en la cantidad disuelta en los primeros tiempos evaluados, aunque luego de 45 minutos está prácticamente disuelto en un 100%, pero en general, los perfiles son diferentes, es decir, f2 menor de 50 (30).

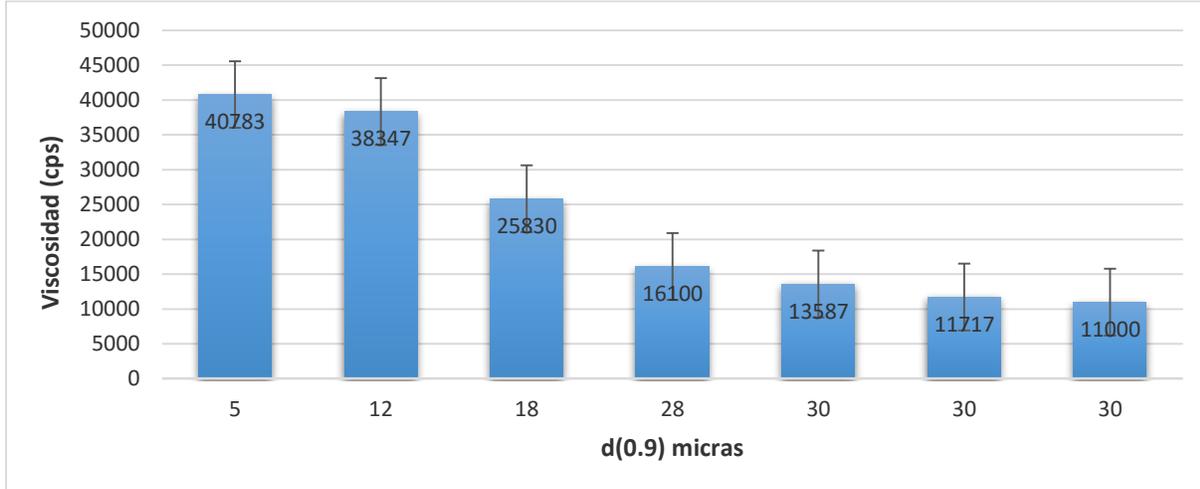
Algo que llama la atención, tanto de los datos *in vivo* como de los datos de perfiles de disolución, es que se nota una disminución en la velocidad de disolución y los parámetros farmacocinéticos evaluados (Cmax y ABC), cuando se disminuye el tamaño de partícula, lo que es contradictorio a lo que se esperaría en general para activos de baja solubilidad (N. Singh, 2013) e incluso lo reportado para la progesterona (F.A. Kind, 1987). En términos generales, cuando se trata de activos de baja solubilidad como de la progesterona, la disminución del tamaño de partícula debería aumentar la velocidad de disolución, y por ende los parámetros biofarmacéuticos mencionados. Con el fin de tratar de entender la razón de este comportamiento en el producto, se realizaron nuevamente las disoluciones de Prueba 1 y Prueba 2 para observar el comportamiento durante la prueba de disolución.

De los resultados de este nuevo ensayo se observó que, para ambos lotes, la gelatina se desintegra antes de los 15 minutos, pero para Prueba 2, la dispersión de la suspensión oleosa en el medio de disolución, era mucho más difícil que lo que era para el de Prueba 1 o el de Referencia. Este comportamiento parece estar relacionado con el tamaño de partícula del activo usado; al parecer las partículas más finas del activo usado para el lote Prueba 2, adsorben mucho más de la fase oleosa de la suspensión y por ende ésta es mucho más viscosa que las suspensiones correspondientes a los productos Prueba 1 y Referencia, los cuales como se puede observar en la [Tabla 4-10](#), utilizaron un activo con mayor tamaño de partícula. Para verificar esto, se desarrolló una metodología para medir la viscosidad de las suspensiones de ambos productos (Prueba 1 y Prueba 2) y se compararon además con la viscosidad obtenida para formulaciones iguales, pero con diferentes tamaños de partícula. La determinación de viscosidad se realizó utilizando un equipo Brookfield DVIII, con un accesorio para manejo de pequeña cantidad de muestras. La determinación se realizó por triplicado, a temperatura de 25°C. Los resultados se resumen en la [Tabla 4-16](#) y se muestran de manera gráfica en la [Figura 4-9](#).

Tabla 4-16 Resultados de viscosidad promedio para las suspensiones de los productos.

Muestra	Tamaño de Partícula	Viscosidad (CV%) (n=3) (a 25°C; spindle 6, 10 rpm)
Referencia	d(0.9) = 28 µm	16100 cps (4.3%)
Prueba 1	d(0.9) = 30 µm	13587 cps (3.0%)
Prueba 2	d(0.9) = 12 µm	38347 cps (1.8%)
Formulación 234-A	d(0.9) = 37 µm	11000 cps (4.3%)
Formulación 234-B	d(0.9) = 32 µm	11717 cps (3.2%)
Formulación 234-C	d(0.9) = 18 µm	25830 cps (3.3%)
Formulación 234-D	d(0.9) = 5 µm	40783 cps (1.9%)

Figura 4-9 Efecto del tamaño de partícula en la viscosidad.



De acuerdo a los resultados, se observa que, en el rango evaluado, la viscosidad de la suspensión aumenta en la medida que disminuye el tamaño de partícula, y este aumento en la viscosidad puede explicar por qué la disolución del producto disminuye en consecuencia.

Se cree que los hallazgos anteriores no contradicen lo reportado en la literatura respecto a que la micronización de la progesterona aumenta su biodisponibilidad (F.A. Kind, 1987), como es esperado para un fármaco de baja solubilidad; lo que se sugiere es que al disminuir el tamaño de partícula se favorece la biodisponibilidad y la velocidad de disolución de un fármaco de baja solubilidad como la progesterona en un intervalo de tamaño de partícula adecuado pero que la excesiva micronización puede tener un efecto contrario cuando el activo es incorporado en una suspensión ya que estas partículas más finas pueden adsorber mayor cantidad de la fase oleosa, creando una suspensión más viscosa, que sería más difícil de dispersar en el medio acuoso. Este comportamiento traería como consecuencia una disminución en la velocidad de disolución que conllevaría a una menor velocidad de absorción y por consiguiente valores más bajos en los parámetros biofarmacéuticos.

Los resultados obtenidos utilizando el método de disolución propuesto en muestras de productos con diferencias significativas en el tamaño de partícula de la fase dispersa, mostraron adecuado poder discriminatorio para diferenciar lotes diferentes y similitud cuando se aplica la metodología a lotes considerados similares con base en su

comparación *in vivo*. Basados en los perfiles obtenidos para los productos analizados (ver [Figura 4-8](#)), es posible proponer una especificación que diferencie los productos diferentes (Prueba 2 versus Referencia o Prueba 1) pero que muestre similitud entre productos similares (Referencia versus Prueba 1). Se puede observar en la [Figura 4-8](#) que no se podría escoger tiempos de 5 o 15 minutos porque a esos tiempos, el porcentaje disuelto está muy por debajo del 85% ya que, como se mencionó anteriormente, a esos tiempos no ha ocurrido la desintegración completa de la cápsula blanda. Además, a esos tiempos no se encontrarían diferencias significativas entre los productos que fallaron la bioequivalencia.

Tampoco se obtendría adecuada discriminación entre productos no bioequivalentes, si se toman los últimos tiempos del perfil (45 o 60 minutos), ya que, aunque se garantiza un porcentaje disuelto mayor al 85% (casi 100% de lo rotulado), no se observan diferencias significativas en el porcentaje disuelto de pro ejemplo el lote Prueba 2, que se había establecido como bio-inequivalente.

Basados en el perfil obtenido, el mejor tiempo para establecer una potencial especificación es a los 30 minutos, ya que a ese tiempo se diferencian significativamente los porcentajes disueltos de los productos que fallaron la bioequivalencia; así, lotes bioequivalentes como el de Referencia y Prueba 1 alcanzan un porcentaje disueltos de aproximadamente 90% para 12 unidades de cada lote, mientras que el lote que no fue bioequivalente, el Prueba 2, solo alcanza aproximadamente un 40%, siendo consistente con sus parámetros biofarmacéuticos que se encontraron durante la comparación *in vivo* de estos lotes. Adicionalmente, a los 30 minutos la variabilidad de los resultados es menor al 10% para el lote de Referencia y el Lote Prueba 1, que fueron bioequivalentes.

Habiendo seleccionado el tiempo de especificación en 30 minutos, lo siguiente era definir un posible valor de Q a este tiempo, y para ello es necesario ver los valores individuales mínimos de cada producto. Se observa que la cápsula con el valor mínimo de disolución, entre el lote Referencia y el lote Prueba 1, es de 87%, lo que permitiría proponer un valor de Q del 80%, con lo que la especificación sería la siguiente: $Q = 80\%$ en un tiempo de 30 minutos. Esto significa que si las seis unidades analizadas de un lote, durante el ensayo de disolución como parte de control de calidad, deberían arrojar porcentajes de disolución sobre lo rotulado, de mínimo 85% ($Q+5\%$) (Brown, 2014).

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Se implementó y validó la metodología cromatográfica (HPLC) para la cuantificación de la progesterona procedente de las muestras de disolución, obteniéndose resultados que

garantizan la idoneidad del método propuesto para la cuantificación exacta y precisa de progesterona en el medio de disolución.

Mediante el estudio de solubilidad realizado para la progesterona en diversos medios acuosos conteniendo cantidades crecientes de laurilsulfato de sodio (LSS) y polisorbato 80 a diferentes pHs; se encontró que la solubilidad en equilibrio de la progesterona no se afecta significativamente por el pH en el rango evaluado, pero aumenta significativamente con la concentración de los tensioactivos estudiados, especialmente con el LSS.

La evaluación del comportamiento de disolución de las cápsulas de progesterona en los aparatos 1, 2 y 3 operados a las máximas condiciones de agitación posibles y empleando el mismo medio de disolución, permitió establecer el aparato 3 como idóneo, puesto que se obtuvo una disolución de al menos el 85% en ni más de 60 minutos, condición que se quería para el método propuesto, con el fin de que pudiera ser aplicado de manera rutinaria para el control de calidad del producto.

La aplicación de un diseño estadístico experimental permitió establecer las condiciones del método de disolución que garantizaría el mayor poder discriminatorio (menor valor de f_2) entre dos lotes de producto con diferencias significativas en su tamaño de partícula. Las condiciones de disolución establecidas para el aparato 3 fueron las siguientes: 250 mL de Buffer fosfato pH 6.8 conteniendo 4% (p/v) de LSS; malla superior No. 30 y malla inferior No. 40; operando el aparato a 30 inmersiones por minuto; utilizando un sinker para cada cápsula (QLA Lab. Accessories bajo el número de parte: BSK008-JP.). Se recomienda la adición de 3 a 5 gotas de simeticona líquida en cada vaso, con el fin de evitar la formación de excesiva espuma.

Se demostró la capacidad del método de disolución para discriminar entre perfiles provenientes de los productos (Prueba 1 y Prueba 2) que presentaron diferente comportamiento *in vivo* (uno demostró bioequivalencia con el producto Referencia y el otro no); estos lotes tenían la misma formulación y fueron fabricados con las mismas instrucciones de manufactura, pero variaban en la distribución de tamaño de partícula de la progesterona utilizada en cada lote. La capacidad de diferenciar los perfiles se evidenció mediante el cálculo del factor de similitud (f_2). Se encontró que el método era capaz de diferenciar los dos lotes que fallaron el estudio de bioequivalencia (Prueba 2 versus

referencia), obteniéndose un valor de f_2 menor a 50 ($f_2 = 30$) y en el caso de los dos lotes que cumplieron bioequivalencia, el método de disolución mostró perfiles que al compararlos mostraron un valor de f_2 mayor a 50 ($f_2 = 64$). Estos resultados permitieron establecer que el método de disolución propuesto, efectivamente puede discriminar lotes con diferencias en tamaño de partícula que afectan la biodisponibilidad de la progesterona. Se sugiere una especificación de (Q) 80% a los 30 minutos, como posible especificación para control de calidad del producto.

Se encontró que partículas muy finas (como las utilizadas en el lote Prueba 2), pueden afectar negativamente la velocidad de disolución, y por ende la biodisponibilidad, de la progesterona en la formulación evaluada, ya que este tipo de partículas, debido a su elevada área superficial, al parecer absorben en mayor proporción la fase oleosa en la que se encuentra suspendida la progesterona, produciendo una suspensión más viscosa y que por ende es más difícil de dispersar en un medio acuoso, *in vitro* o *in vivo*.

5.2 Recomendaciones

Para fines del laboratorio farmacéutico, se recomienda el establecimiento de la correlación *in vitro in vivo* entre los datos de disolución, expresados como fracción disuelta y los resultados *in vivo* obtenidos, a partir de los cuales sería necesario calcular la fracción absorbida. Considerando que la progesterona es un fármaco de baja solubilidad (Clase II en el SCB), para el que se espera que la absorción se afecte significativamente por la velocidad de disolución, puede esperarse una aceptable correlación (Nivel A). EL establecimiento de esta correlación permitiría a la empresa no tener la necesidad de

demostrar *in vivo* el comportamiento del medicamento ante posibles cambios en excipientes o proceso de manufactura que se pudieran dar a futuro.

Se recomienda estandarizar y validar una metodología para la medida de la viscosidad de la suspensión, ya que es una medida rápida y que podría establecerse como una prueba de control en proceso de la suspensión antes de ser encapsulada. Los datos obtenidos en el presente trabajo, muestran que la viscosidad se relaciona con la distribución de tamaño de partícula y la velocidad de disolución de la suspensión, en las condiciones del método de disolución propuesto

Sería importante evaluar el aparato 4 de disolución, ya que para éste se ha desarrollado una celda para la evaluación de cápsulas blandas con contenido oleoso y comparar estos resultados con los obtenidos en el presente trabajo y así demostrar si el aparato 4 presenta alguna ventaja frente al método evaluado.

Anexo A: Reporte de Validación

A. SELECTIVIDAD

Procedimiento:

La selectividad fue evaluada preparando soluciones o extracciones con metanol (teniendo en cuenta la solubilidad de cada material) de los ingredientes de la formulación (contenido

y gelatina - placebo). Además, se inyectaron la fase móvil, el metanol y el medio de disolución. Una solución estándar de progesterona también fue inyectada.

Las soluciones obtenidas (o la fase metanólica cuando el material fue insoluble) se filtraron de acuerdo a la metodología de análisis y se inyectaron en el cromatógrafo líquido.

Los cromatogramas de placebo y estándar se muestran en la [Figura 5-1](#) y [Figura 5-2](#), respectivamente

Figura 5-1 Cromatograma del Placebo.

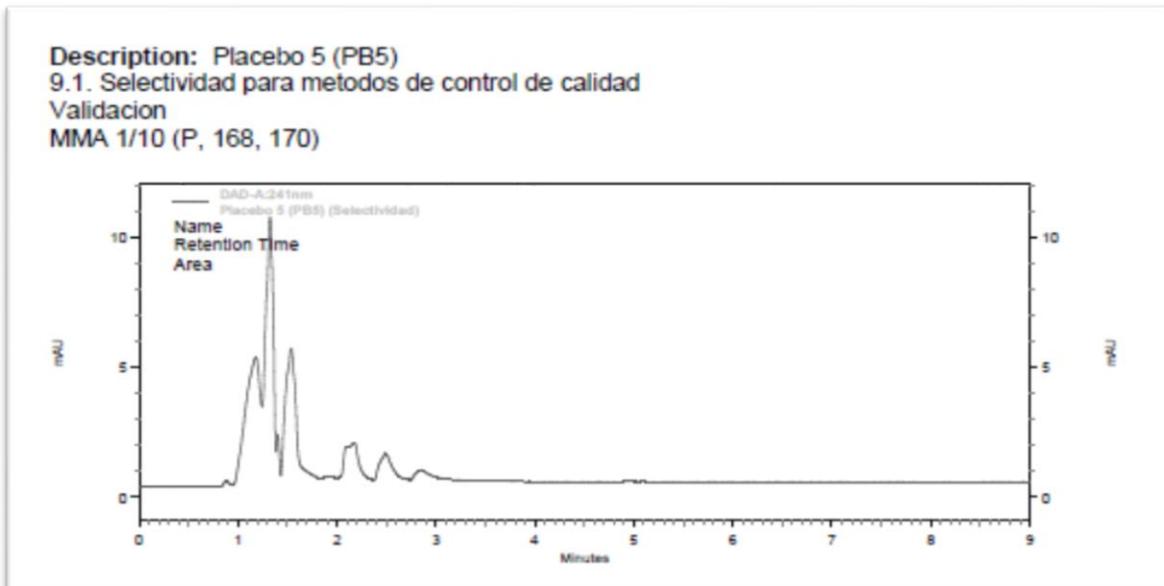
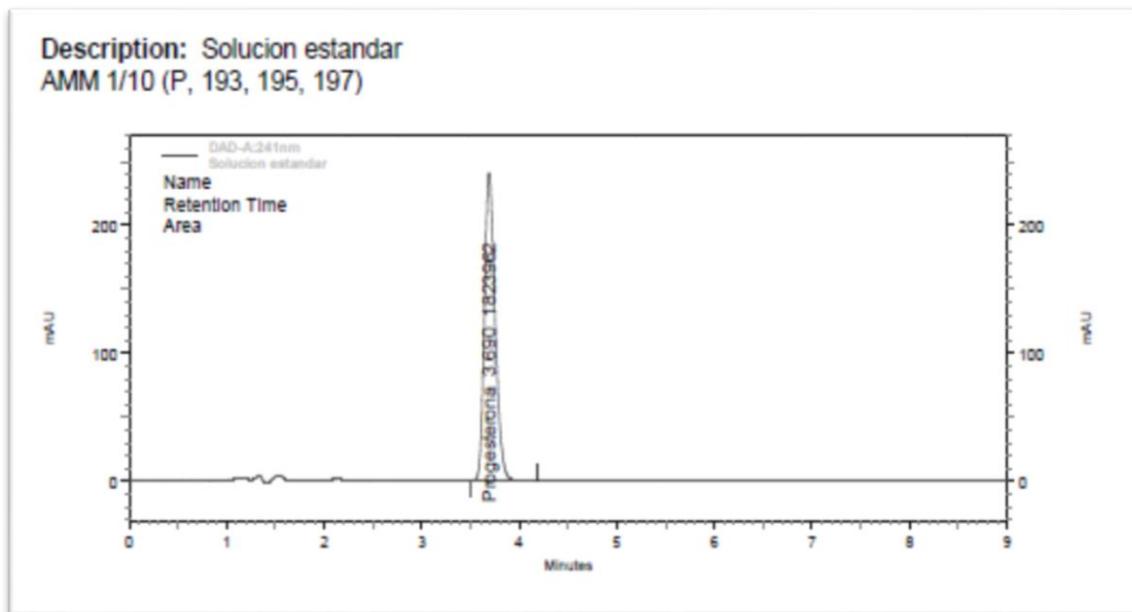


Figura 5-2 Cromatograma de la Solución Estándar.



Resultados:

No se observaron picos en ninguno de los cromatogramas que interfirieran con el pico de progesterona.

B. LINEALIDAD DEL MÉTODO

Procedimiento:

La linealidad fue evaluada en 5 niveles: 25%, 50%, 75%, 100% y 150% de la concentración nominal (0.096 mg/mL). Tres réplicas de cada concentración (nivel) fueron preparadas. A cada preparación se adicionaron soluciones o extracciones (cuando el material fue insoluble) metanólicas de cada uno de los ingredientes de la formulación del producto terminado (contenido y gelatina).

Cada réplica de cada nivel se inyectó en el cromatógrafo líquido y se calcularon las áreas para el pico de progesterona.

Resultados:

En la [Tabla 5-1](#) se resumen las áreas obtenidas para cada solución inyectada, así como los resultados de cada parámetro evaluado para linealidad. Se aplicó el método de los mínimos cuadrados para obtener la recta de regresión y su ecuación, así como el coeficiente de correlación.

Tabla 5-1 Resultados de linealidad del método.

X Concentración	Y Área	XY	X²	Y²
25.00	363.591	9089.7750	625	132198.4153
25.00	362.351	9058.7750	625	131298.2472
25.00	361.727	9043.1750	625	130846.4225
50.00	734.254	36712.7000	2500	539128.9365
50.00	733.071	36653.5500	2500	537393.091
50.00	736.356	36817.8000	2500	542220.1587
75.01	1093.714	82039.4871	5626.5001	1196210.314
75.01	1097.625	82332.8513	5626.5001	1204780.641
75.01	1096.288	82232.5629	5626.5001	1201847.379
100.01	1447.528	144767.2753	10002.0001	2095337.311
100.01	1459.479	145962.4948	10002.0001	2130078.951
100.01	1467.375	146752.1738	10002.0001	2153189.391
150.02	2198.757	329857.5251	22506.0004	4834532.345
150.02	2203.358	330547.7672	22506.0004	4854786.476
150.02	2193.502	329069.1700	22506.0004	4811451.024
Coeficiente de Correlación (r)			0.999965	
Coeficiente de Determinación (r²)			0.999929	
Pendiente (b)			14657.37961	
Intercepto (a)			-2775.894504	
Ecuación			y = 14657.37961X - 2775.894504	
Valor nominal de la ecuación			1462962.066	
[(a) / Valor Nominal] X 100			0.10%	

La comprobación estadística de linealidad se realizó mediante los siguientes parámetros:

a) Coeficiente de Determinación (r²).

Mediante el método de mínimos cuadrados se calculó el coeficiente de correlación (r) el cual nos indica el grado de relación entre la concentración y el área obtenida; el

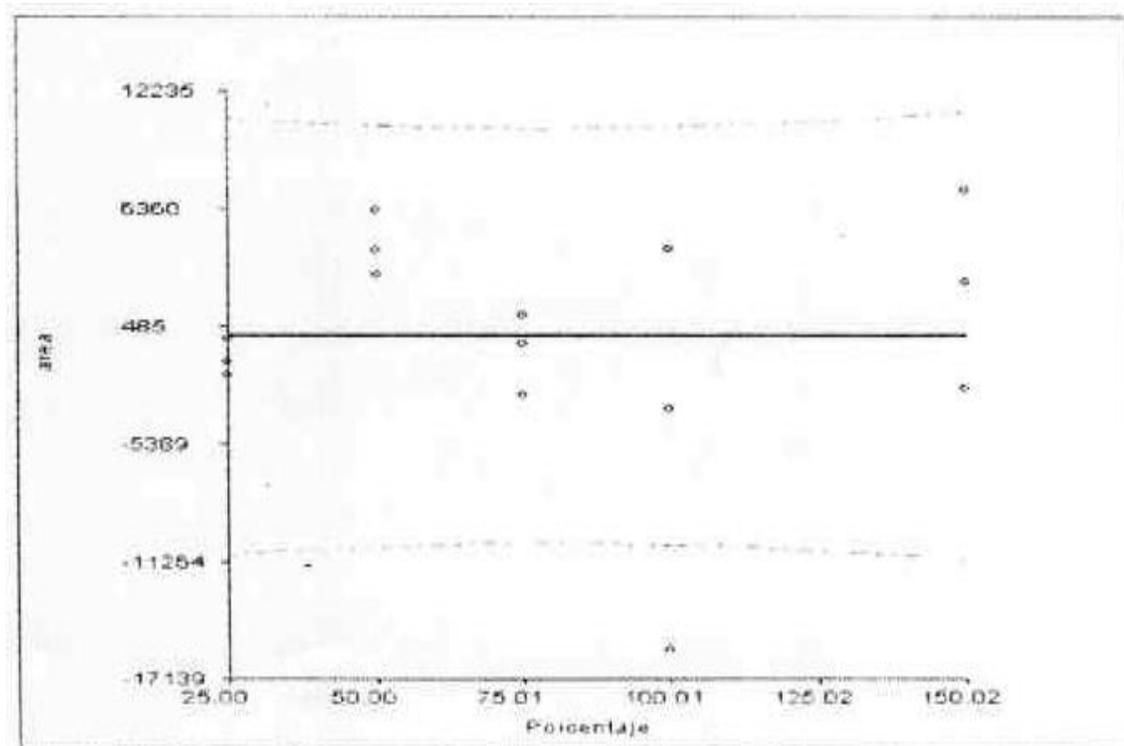
valor obtenido (0.999965) es cercano a 1, lo que evidencia que existe correlación con una probabilidad elevada.

A partir del valor de “r” se calculó el coeficiente de determinación (r^2), el cual al ser mayor a 0.980 (0.999929) indica que el modelo explica la variación en la respuesta a medida que se varía la concentración.

b) Homoscedasticidad: variación residual constante.

Se graficaron los residuales obtenidos (eje de las Y) versus los valores estimados (eje de las X) a partir de la ecuación de la recta de regresión, ver [Figura 5-3](#). Se puede observar una distribución aleatoria, es decir no hay tendencia de los valores en el gráfico, lo que da validez al modelo de regresión obtenido.

Figura 5-3 Diagrama de residuales para la linealidad del método



c) Análisis de Varianza (ANOVA) para evaluar pendiente y ajuste.

Se realizó un análisis de varianza con los datos de linealidad, y el resultado se resume en la [Tabla 5-2](#).

“k” es el número de niveles evaluados = 5.

“n” es el número de datos = 15 (tres datos por nivel).

“V_{REG}” es la varianza debida a la regresión.

“V_{RES}” es la varianza residual.

“V_{FA}” es la varianza por la falta de ajuste.

“V_{EXP}” es la varianza experimental.

Tabla 5-2 Análisis de varianza de la linealidad del método

	GRADOS DE LIBERTAD (GL)	VARIANZA (V)	ESTADÍSTICO CALCULADO (F)	ESTADÍSTICO TABULADO (F)
REGRESIÓN	1	V _{REG} = 5.96377E+12	F _{1-calc.} = 1.84183E+05	F _{1-tab(1;13;0.05)} = 4.670
RESIDUAL	13	V _{RES} = 3.23796e+07		
FALTA DE AJUSTE	k-2 = 3	V _{FA} = 5.24536E+07	F _{2-calc.} = 1.990	F _{2-tab(3;10;0.05)} = 3.710
ERROR EXPERIMENTAL	∑n _i - k = 10	V _{EXP} = 2.63574E+07		

De acuerdo a los resultados del ANOVA:

- **F_{1EXP}** es mayor que **F_{1TAB}** lo que demuestra la existencia de una pendiente significativamente diferente de cero; y
- **F_{2EXP}** es menor que **F_{2TAB}** lo que demuestra linealidad entre los resultados obtenidos.

d) Test del intercepto.

Este test se llevó a cabo mediante una prueba de significancia de t de Student, con n-2 (13) grados de libertad y un de α de 0.05.

A partir del valor de varianza residual (V_{RES}) se calculó la varianza del intercepto (S_a) y el valor de t_{calc} , así:

$$t_{calc} = |a| / S_a = |-2775.9| / 3101.564 = 0.895$$

El valor obtenido para t_{calc} (0.895) es menor que el valor de t_{tab} para 13 grados de libertad y un α de 0.05 (1.771), lo que permite establecer que el valor del intercepto no es estadísticamente significativamente diferente de cero.

Los intervalos de confianza para el intercepto se calcularon a partir de la fórmula ($a \pm t_{tab} * S_a$), obteniendo el siguiente intervalo: de -8268.8 a 2717.0. Debido a que este intervalo incluye el valor de cero, puede afirmarse nuevamente que el valor del intercepto no es estadísticamente significativamente diferente de cero.

C. EXACTITUD (recuperación)

Procedimiento:

Este parámetro fue evaluado cuantificando las tres réplicas de los niveles de 25%, 100% y 150%, del ensayo de linealidad; este análisis se realizó contra una solución estándar de progesterona.

Resultados:

Los resultados se resumen en la [Tabla 5-3](#).

Tabla 5-3 Resultados de exactitud (recuperación)

Nivel (%)	Réplica No.	Recuperación (%)	Criterio de Aceptación
25%	1	100.0	El porcentaje promedio de recuperación en cada nivel está entre 95 a 105%
	2	99.6	
	3	99.4	
	Promedio	100	
100%	1	99.5	
	2	100.3	
	3	100.8	
	Promedio	100	

Nivel (%)	Réplica No.	Recuperación (%)	Criterio de Aceptación
150%	1	100.7	
	2	101.0	
	3	100.5	
	Promedio	101	

D. EXACTITUD (efecto del filtro)

Procedimiento:

Se compararon las respuestas obtenidas (por triplicado) para la solución muestra y estándar, filtradas por:

- Papel Whatman®-541 (solución estándar).
- El mismo papel filtro y posteriormente por filtro jeringa PVDF (solución muestra).

La respuesta promedio de las tres réplicas, de solución estándar y muestra, centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos (A_{std} y A_{mta} , respectivamente), se asumieron como 100% y con las áreas obtenidas para las soluciones filtradas, se calculó el porcentaje de recuperación.

Resultados:

Los resultados se resumen en la [Tabla 5-4](#).

Tabla 5-4 Resultados del ensayo de exactitud (efecto del filtro)

Solución Evaluada	Replica No.	Área	% Recuperación	
		Centrifugación a 3000 rpm por 15 minutos	Filtración por Whatman 541	Filtración por Whatman 541 y luego filtro jeringa PVDF
Solución Estándar	1	1454.765	99.99	
	2	1456.084	98.86	
	3	1456.789	100.69	
	Promedio (A_{std}):	1455.879	99.8	
Solución Muestra	1	1460.322		99.56
	2	1458.989		101.00
	3	1460.124		99.24
	Promedio (A_{mta}):	1459.8117		99.9

Los porcentajes de recuperación para la solución estándar y muestra, respecto a las respuestas de las mismas soluciones cuando no se filtraron (centrifugación), estuvieron entre 98.0% y 102.0%, por lo que se concluye que los filtros utilizados no afectan significativamente la respuesta.

E. PRECISIÓN INSTRUMENTAL

Procedimiento:

Una solución estándar de progesterona, al nivel del 100% de la linealidad, fue inyectada 10 veces y se calculó el coeficiente de variación (CV%) entre las 10 inyecciones.

Resultados:

Los resultados se resumen en la [Tabla 5-5](#).

Tabla 5-5 Resultados de Precisión Instrumental

Inyección No.	Área	Promedio	Desviación Estándar	Coficiente de Variación (CV%)
1	1817.438	1814.36	4.06	0.2
2	1817.746			
3	1816.393			
4	1811.395			
5	1815.097			
6	1817.406			
7	1814.260			
8	1816.210			
9	1813.329			
10	1804.351			

El coeficiente de variación obtenido (0.2%) es menor a 1.5%, por lo que el parámetro se consideró validado.

F. PRECISIÓN DEL MÉTODO (repetibilidad)

Procedimiento:

Se prepararon seis réplicas al nivel del 100%, conteniendo todos los ingredientes de la formulación, y se calcularon contra una solución de referencia conocida. Los resultados se expresaron como porcentaje de recuperación y a partir de estos resultados se calculó el coeficiente de variación porcentual entre los seis datos obtenidos.

Resultados: los resultados se resumen en la [Tabla 5-6](#).

Tabla 5-6 Resultados de precisión del método (repetibilidad)

Solución Muestra No.	% Obtenido	Promedio	Desviación Estándar	CV(%)
1	99.5	100.5	0.6	1
2	100.3			
3	100.8			
4	100.7			
5	101.1			
6	100.7			

El coeficiente de variación porcentual obtenido fue menor del 3%, por lo que el parámetro se consideró validado.

G. PRECISIÓN INTERMEDIA

Procedimiento:

Dos analistas (1 y 2), utilizando un mismo aparato de disolución y dos cromatógrafos líquidos (A y B), en dos días diferentes (primer y segundo), realizaron la disolución de seis cápsulas de progesterona 200 mg, utilizando el método a validar.

Resultados:

Los resultados se resumen en la [Tabla 5-7](#).

Tabla 5-7 Resultados de precisión intermedia

Analista	Día	Equipo	Promedio (n=6)
1	Primer	A	98
		B	98
	Segundo	A	99
		B	99
2	Primer	A	100
		B	100
	Segundo	A	99
		B	98
Mínimo promedio obtenido:			98
Máximo promedio obtenido:			100
Diferencia:			2

La diferencia mayor obtenida, entre los promedios de seis cápsulas de cada combinación de analistas-día-equipo, es menor a 3%, por lo que el parámetro se consideró validado.

H. ESTABILIDAD DE MUESTRA ANALÍTICA

Procedimiento:

Se realizó la disolución de seis cápsulas de progesterona 200 mg y se cuantificaron de manera inmediata (no más de una hora entre su filtración y posterior inyección en el HPLC). Estos resultados se asumieron como los valores iniciales contra los que se calculó la variación en los análisis del activo en los siguientes tiempos.

La estabilidad analítica se evaluó en la solución muestra (filtrada y diluida con metanol), bajo las siguientes condiciones:

Condición 1: volumétricas transparentes almacenadas a temperatura ambiente.

Condición 2: viales en el auto-muestreador del HPLC.

Resultados:

Los resultados se resumen en la [Tabla 5-8](#).

EL porcentaje de diferencia obtenido para cada una de las dos condiciones fue menor al 2% por lo que se considera que la muestra puede ser analizada hasta luego de 7 días en las condiciones de almacenamiento indicadas.

Tabla 5-8 Resultados de estabilidad de la muestra analítica

Condición	Resultados Promedio en % disuelto (n=6)			
	Cápsula No.	Inicio	2 Días	7 Días
Condición 1	1	99.76	100.03	98.87
	2	100.01	99.18	99.51
	3	99.76	99.23	98.22
	4	98.56	99.23	98.45
	5	100.45	99.23	98.91
	6	100.23	99.56	98.56
	Promedio	99.8	99.4	98.8
% Diferencia Respecto a Inicio:			0.4	1.0
Condición 2	1	99.76	100.01	99.56
	2	100.01	99.54	98.87
	3	99.76	99.45	99.45
	4	98.56	99.32	99.22
	5	100.45	100.81	98.45
	6	100.23	98.56	99.45
	Promedio	99.8	99.6	99.2
% Diferencia Respecto a Inicio:			0.2	0.6

I. ROBUSTEZ

Procedimiento:

La robustez del método cromatográfico fue evaluada al comparar el resultado promedio de la disolución de seis cápsulas de progesterona 200 mg, realizada con los parámetros indicados en el método de análisis y con metodologías resultantes al realizar variaciones en cada uno de esos parámetros.

Resultados:

Los resultados se resumen en la [Tabla 5-9](#).

Tabla 5-9 Resultados de Robustez

Parámetro	Valor	% Disuelto (n=6)	Valor Nominal ¹	Diferencia Respecto al Nominal (%)
Volumen de Inyección	4 µL	97	98	1
Volumen de Inyección	6 µL	98		0
Flujo	0.9mL/minuto	98		0
Flujo	1.1mL/minuto	98		0
Temperatura del Horno	39°C	98		0
Temperatura del Horno	41°C	98		0
Inmersiones por minuto	25	99		1
Inmersiones por minuto	35	99		1
Concentración de LSS	3%	98		0
Concentración de LSS	5%	100		2
pH del medio de disolución	6.7	99		1
pH del medio de disolución	6.9	98		0
Tiempo de preparación del medio de disolución	0 días	100		2
Tiempo de preparación del medio de disolución	10 días	99		1
¹ Obtenido con los parámetros nominales del método (ver Tabla 4-1)				

Las variaciones realizadas en el método de análisis no produjeron variaciones significativas respecto al porcentaje disuelto cuando se utilizaron los valores nominales del método de análisis.

6. Bibliografía

- A. Besisns, J. B. (27 de February de 2008). Pharmaceutical composition on micronized progesterone, preparation method and uses thereof. *US Patent No. 7829115 B2*, págs. 1-18.
- A. Dahan, A. H. (September de 2006). Use of a Dynamic *in vitro* Lipolysis to Rationalize Oral Formulation Development For Poor Water Soluble Drugs: Correlation With In Vivo Data And The Relationship to Intra-enterocyte in Rats. *Pharm. Res.*, 23(9), 2176-2174.
- A. Dahan, J. M. (2010). The Solubility-Permeability Interplay in Using Cyclodextrins as Pharmaceutical Solubilizers: Mechanistic Modeling and Application to Progesterone. *J. Pharm. Sci.*, 99(6), 2739-2749.
- S. I. Borst, (1991). Comparative pH-Gradient Dissolution of Several Dosage Forms of Iron. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 17(17), 2333-2339.
- W. Brown. (2014). USP General Chapter 1092: The dissolution Procedure: Development and Validation. In *United States Pharmacopeia* (pp. 1-28). Rockville.
- C. Civile, (1991). *In vivo-In vitro* Correlation of Salbutamol Release From A Controlled Release Osmotic Pump Delivery System. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 13, 491-498.
- C. K. Carrico. (1996). Workshop Report AAPS: USP Workshop on Dissolution Calibration and Testing. *Pharm. Res.*, 13, 6-9.
- D. Siya, S. B. (2015). Biopharmaceutical Classification System: A Brief Account. *International Journal Of Research Methodology*, 1(1), 20-46.
- D. Steele, G. D. (1993). *Softgel Manufacturing Process - US Patent 5,200,191*.
- E. Galia, E. N. (1998). *Pharm. Res. Evaluation of Various Dissolution Media for Predicting in vivo Performance of Class I and II drugs.*, 15, 698-705.
- E.W. Freeman, K. R. (1995). *J. Am. Med. Assoc.*, 274, 51-57.
- F. Podczec, B.E. Jones. (2004). *Pharmaceutical Capsules* (Segunda ed.). Londres, UK: Pharmaceutical Press.

- F.A. Kind, L. C. (1987). Increasing oral bioavailability of progesterone by formulation. *J. Steroid Biochem*, 9, 443-448.
- F.S. Hom, S. V. (1975). Soft Gelatin Capsules II: Oxygen Permeability Study of Capsule Shells. *J. Pharm. Sci.*, 64, 851-857.
- FDA Guidance for Industry: Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms* (1997).
- Federation International of Pharmaceutique. FIP Guidelines for dissolution testing of solid oral products. (2001). *Drug information journal*, 30, 1071-1084.
- Food and Drug Administration. (2015). FDA Guidance for Industry: Waiver of *In Vivo* Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. (págs. 1-14). Maryland.
- Fotaki, N. (November de 2009). Flow-Through Cell Apparatus (USP Apparatus 4): Operation and Features. *Dissolution Technologies*, 16(4), 46-47.
- G. A. Lewis, D. M.-T.-L. (s.f.). *Pharmaceutical Experimental Design*. New York: Marcel Dekker Inc.
- G. Amidon, H. L. (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.
- G. P. Martin, V. G. (2011). Selection of Dissolution Medium for QC Testing of Drug Products. *Journal of Validation Technology*, 7-11.
- R. P. Gullapalli. (2010). Soft Gelatin Capsules (Softgels). *J. Pharm. Sci.*, 99(10), 4107-4148.
- B. R. Hohrs. (August de 2001). Dissolution Method Development for Poorly Soluble Compounds. *Dissolution Technologies*, 8(3), 1-5.
- I. Borst, S. U. (1997). New and Extended Application For USP Drug Release Apparatus 3. *Dissolution Technologies*, 1-6.
- ICH: International Conference of Harmonization. (2006). *Guidance ICH Q8: Pharmaceutical Development*.
- J. Hu, A. K. (May de 2005). A comparison of dissolution testing on lipid soft gelatin capsules using apparatus 2 and 4. *Dissolution technologies*, 6-9.

- J.A. Simon, M. R. (1993). The Absorption of Oral Micronized Progesterone: The Effect of Food, Dose Proportionality, and Comparison with Intramuscular Progesterone. *Fertil Steril*, 60, 2633.
- J.T. Hargrove, W. M. (1989). Absorption of oral progesterone is influenced by vehicle and particle size. *Am.J. Obstet. Gynecol.*, 161, 948-951.
- J.W. Moore, H. F. (1996). Mathematical Comparison of Dissolution Profiles. *Pharmaceutical Technology*, 20(6), 64-74.
- L.J. Roberts II, J. M. (2001). *Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Decima Edición ed.). New York: McGraw-Hill.
- L.X. Yu, G. A.-C. (2002). Biopharmaceutics Classification System: The Scientific Basis for Biowaiver Extensions. *Pharm. Res.*, 19(7), 921-925.
- B.D. Lignieres. (1999). Oral Micronized Progesterone. *Clinical Therapeutics*, 21(1), 41-60.
- Ling, W. (1978). Thermal Degradation of Gelatin as Applied to Processing of Gel Mass. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67, 218-223.
- M. Ansari, M. K. (2004). The Development and Validation of a Dissolution Method for Clomipramine Solid Dosage Forms. *Dissolution Technologies*, 11(3), 16-24.
- M. Iagace, L. G. (2004). Developing a Discriminating Dissolution Procedure for a Dual Active Pharmaceutical Product With Unique Solubility Characteristics. *Dissolution Technologies*, 11(1), 13-17.
- M. Luconi, L. B. (1998). Identification and Characterization of functional non-genomic Progesterone Receptors on Human Sperm Membrane. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83(3), 877-885.
- M.Cheema, K. P. (1987). Lipid vehicles for intestinal lymphatic drug absorption. *J. Pharm. Pharmacol.*, 39, 55-56.
- M.I. Whitehead, P. T. (1980). Absorption and Metabolism of Oral Progesterone. *Br. Med. J.*(22), 825-827.
- N. Singh, D. A. (Apr-Jun de 2013). Techniques for Bioavailability Enhancement of BCS Class II Drugs: A Review. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 2(2), 1092-1101.
- M. O'Neil. (2006). *The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals.* New Jersey.

- P. Khadka, J. R. (2014). Pharmaceutical Particle Technologies: An Approach to Improve Drug Solubility, Dissolution and Bioavailability. *Asian Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 9, 304-316.
- R. A. Soltero, J. M. (1989). Effects of Sinker Shapes on Dissolution Profiles. *Journal of Pharmaceutical Scientists*, 78(1), 35-39.
- R. Duclos, J. S. (1991). Polymorphism of Progesterone: Influence of the carrier of the solid dispersion manufacturing processes. *J. Therm. Anal.*, 37, 1867-1875.
- R. Krishna, L. Y. (2008). *Biopharmaceutics Applications in Drug Development*. Rockville: Springer.
- R. Rupprecht, J. R. (1993). Pharmacological and Functional Characterization of Human Mineralocorticoid Receptor Ligands. *Eur. J. Pharmacol.*, 247(2), 145-154.
- R.A. Soltero, J. H. (Enero de 1989). Effects of sinker shapes on dissolution profiles. *J. Pharm. Sci.*, 78(1), 35-39.
- S. Jang, L. Y. (2005). Identification of a 71 KDa Protein as a Putative non-genomic Membrane Progesterone Receptor in Boar Spermatozoa. *J. Endocrinol.*, 184(2), 417-425.
- R.P Scherer (1958). *Method for Drying Capsules - US Patent 2,851,786*.
- Series, W. T. (2006). *Annex 7 - Multisource (generic) Pharmaceutical Products: Guidelines on Registration Requirements To Establish Interchangeability*.
- Solvay Pharmaceuticals, Inc. (02 de 12 de 2013). *Food and Drug Administration, FDA*.
Obtenido de http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/019781s013lbl.pdf
- T. Soni, C. N. (May de 2008). Development of Discriminating Method for Dissolution of Aceclofenac Marketed Formulations. *Dissolution Technologies*, 15(2), 31-35.
- U.B. Ottosom, K. c. (1984). Serum Levels of progesterone and Some of Its Metabolites Including Deosicorticosterone After Oral and Parenteral Administration. *Br. J. Obstet. Hynaecol.*, 91, 1111-1119.
- US Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 38 (2015).*, NF 33. Rockville, MD.
- V. Pucci, F. B. (2003). Determination of Progesterone in Commercial Formulations and in non-conventional Micellar Systems. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30, 1459-1559.

- Y. Kazakevich, R. L. (2007). *HPLC for Pharmaceutical Scientist*. New York: Wiley.
- Y. Qiu, Y. C. (2009). *Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice*. Maryland, MA: Elsevier.
- Yu, X. (2002). Evaluation of USP Apparatus 3 for Dissolution Testing of Immediate-Release Products. *AAPS PharmSci*, 4(1).
- Z. Chakmakjian, N. Z. (1987). Bioavailability of Progesterone With Different Modes of Administration. *J. Reprod. Med.*, 443-448.
- Z. Gao, T. W. (2006). Effects of deaeration methods on dissolution testing in aqueous media: study using a total dissolved gas pressure meter. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95(7), -1606-1613.