

Validación del método de análisis de Diltiazem tabletas 60 mg por espectrofotometría UV-VIS. Estudio de los perfiles de disolución.

Pilar, Soledispa-Cañarte¹; Denisse, Caguana-Baquerizo²;
Viviana, García-Mir³; Migdalia, Miranda-Martínez^{4*}

Resumen

El Diltiazem, benzotiazepina antagonista de los canales del calcio, se emplea para el tratamiento de la hipertensión y la obstrucción parcial de las arterias coronarias, conocida como angina de pecho. En el presente trabajo se realizó el estudio comparativo de los parámetros de calidad y de los perfiles de disolución de las tabletas 60 mg comercializadas en Ecuador, frente al Incoril de los laboratorios Bagó. El método de cuantificación del Diltiazem se validó por espectrofotometría UV-VIS. La validación permitió comprobar que el método era específico, sensible y lineal en una concentración de 60 mg con un coeficiente de correlación $r_2 = 0,990$, éste además fue preciso, exacto y reproducible y de conformidad para el análisis del producto.

Para los tres lotes estudiados no se presentaron diferencias significativas en los parámetros fisicoquímicos evaluados. Los perfiles de disolución permitieron evidenciar marcadas diferencias en cuanto a la liberación del principio activo en el tiempo máximo de la toma de muestra que fue de 180 min. De los tres lotes genéricos, solo uno cumplió con los factores f_1 y f_2 de diferencia y similitud y presentó un mejor comportamiento en la velocidad de disolución y el porcentaje de eficiencia.

Palabras clave: Parámetros de calidad; Perfiles de disolución; Validación.

Validation of the analysis method of Diltiazem tablets 60 mg by UV-VIS spectrophotometry. Study of dissolution profiles.

Abstract

Diltiazem, a calcium channel blocking benzothiazepine, is used to treatment of hypertension and partial obstruction of the coronary arteries, known as angina pectoris. In the present work, a comparative study of the quality parameters and dissolution profiles of the 60 mg tablets marketed in Ecuador against Incoril from Bagó laboratories was carried out. The quantification method Diltiazem was validated by UV-VIS spectrophotometry. The validation made it to verify that the method was specific, sensitive and linear in a concentration of 60 mg with a correlation coefficient of $r_2 = 0,990$. It was also precise, accurate and reproducible and in accordance with the analysis of the product. For the three batches studied there were no significant differences in the physicochemical parameters evaluated. The dissolution profiles showed marked differences in the release of the active ingredient in the maximum time of the sampling, which was 180 min. Of the three generic batches, only one complied with the factors f_1 and f_2 of difference and similarity and presented a better behavior in the dissolution rate and the efficiency percentage.

Keywords: Dissolution profiles; Quality parameters; Validation.

Recibido: 27 de febrero de 2020

Aceptado: 19 de junio de 2020

¹ Máster en Química Farmacéutica; Docente-Investigador. Universidad de Guayaquil, Ecuador; pilar.soledispac@ug.edu.ec; <https://orcid.org/0000-0002-5872-7830>

² Máster en Química Farmacéutica; Docente-Investigador. Universidad de Guayaquil, Ecuador; denisse.caguanab@ug.edu.ec; <https://orcid.org/0000-0002-4477-7749>

³ PhD en Ciencias Farmacéuticas; Docente-Investigador. Universidad Técnica de Machala (UTMACH), Ecuador; vgarcia@utmachala.edu.ec; <https://orcid.org/0000-0002-5288-4771>

⁴ PhD en Ciencias Químicas; Docente-Investigador. Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL; mgmiran@espol.edu.ec; <https://orcid.org/0000-0002-6728-1818>

*Autor para correspondencia: mgmiran@espol.edu.ec

I. INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial clasifica como uno de los principales factores de riesgo cardiovascular en el mundo, y en particular, en los países con ingresos bajos y medios, donde los índices son abrumadores. En opinión de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2013), esta patología constituye un obstáculo para el buen estado de salud de esas poblaciones.

De acuerdo con estudios de este organismo internacional, de cada 100 mil ecuatorianos, 1,373 padecen esta afección, en tanto Freire et al. (2012), refiere que una investigación realizada por el Ministerio de Salud Pública (MSP) y el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC), reveló que más de la tercera parte de las personas mayores de 10 años (3 millones 187, 665) son prehipertensos y 717, 529 ciudadanos entre 10 y 59 años padecen hipertensión arterial.

Para el tratamiento de esta patología, uno de los medicamentos utilizados es el diltiazem, el cual está incluido en el Cuadro Nacional de Medicamentos Básicos y Registro Terapéutico del Ecuador (Torres et al, 2007). Este fármaco se ha probado preclínicamente y ha demostrado un efecto ansiolítico en ratones (Yoshizawa et al., 2010). Clínicamente se emplea, en urgencias, en la fibrilación auricular (Ross et al., 2016; Ward et al., 2019) y solo o en combinación con el enalapril, para el tratamiento de la hipertensión (Cushman et al., 1998).

Otros usos que se le han dado a este fármaco son como tópico en el tratamiento de fisuras anales y en el postoperatorio de hemorroides (Rodríguez-Wong et al., 2016 a y b; Ivanova et al., 2018).

El incremento de los precios de los medicamentos innovadores afecta los presupuestos de los sistemas de salud pública y privada de los países en vías de desarrollo. Ecuador ha estimulado la producción e importación de medicamentos genéricos, con el propósito de limitar el gasto farmacéutico y poder cumplir con su deber de garantizar la salud de la población. En la oferta del mercado farmacéutico a nivel global, se encuentran medicamentos innovadores y genéricos, éstos últimos tienen una presencia cada vez mayor por su bajo costo e intercambiabilidad (Ortiz-Prado et al., 2014).

Sin embargo, vale apuntar que la introducción de medicamentos genéricos ha revelado problemas

de calidad, por ejemplo, medicamentos con bajas concentraciones o pobres disoluciones, que pueden afectar la efectividad del tratamiento. No obstante, dentro del marco legal se respalda el que cumplan con los análisis de calidad post registro.

Uno de los principales objetivos de las agencias regulatorias es asegurar la calidad de los medicamentos durante todo su ciclo de vida. La calidad se evalúa mediante estudios de laboratorio tales como: identificación, potencia, pureza, disolución, estabilidad del principio activo y la intercambiabilidad entre medicamentos. Con estos estudios se asegura que sean bioequivalentes con el medicamento que ha demostrado ser eficaz y seguro en los estudios clínicos, aceptados por las Agencias Regulatorias (Huayanay-Falconí, 2012; Ortiz-Prado et al., 2014).

De acuerdo con la Guía de la Food and Drug Administration (FDA, 2019 a y b), es preciso realizar estudios de bioequivalencia *in vitro*, constituidos por estudios comparativos de perfiles de disolución, para determinar la cantidad o porcentaje del principio activo disuelto en función del tiempo, bajo condiciones controladas y validadas (Segura, 2017).

En consecuencia, los estudios comparativos de Disolución *in vitro* resultan útiles, dado que la disolución propiamente es un paso limitante de la absorción del medicamento (Ponce D´León y Jaramillo, 2004; Polli et al., 2008; Baena y Ponce de León, 2008, Saavedra et al., 2011; Jung et al, 2012).

Como objetivo de este trabajo se propone: Validar el método de cuantificación de Diltiazem en tabletas de 60 mg genérica por espectrofotometría UV-VIS para la determinación de la bioequivalencia con el medicamento innovador a través de la comparación de sus perfiles de disolución y los parámetros de control de calidad.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de los productos

Se emplearon tres lotes de tabletas de diltiazem 60 mg del laboratorio que comercializa en el Ecuador que se adquirieron en las farmacias distribuidoras de la Ciudad de Guayaquil, así como un lote de Incoril (medicamento innovador), todos de diferentes fechas de elaboración y dentro del período de vida útil. Al Incoril se le asignó la letra A y a los tres lotes del diltiazem genérico las letras B, C

y D, respectivamente.

Control de calidad

Para el establecimiento de los parámetros de calidad se siguieron los métodos descritos en la USP39/NF34 (2016), previa validación de algunos parámetros. Las comparaciones se realizaron frente a un estándar de Diltiazem Clorhidrato (USP). En los ensayos se empleó un espectrofotómetro UV/VIS marca Shimadzu modelo UV 1700.

La evaluación se realizó a los cuatro lotes (A, B, C y D). Las propiedades físico químicas determinadas fueron: dimensiones (n=50, vernier), peso promedio (n=10, balanza analítica Mettler Toledo), dureza (n=20, durómetro DR SCHELEUNIGER), friabilidad (n=6, friabulómetro VANKEL RFQFR-251) y desintegración (n=6, desintegrador VANKEL VK-7).

Validación del método de análisis por espectrofotometría UV, para cuantificar Diltiazem, en tabletas Diltiazem 60 mg,

Se tuvieron en cuenta lo informado por (Pérez-Navarro et al., 2014 y Pérez y Rojas 2015)

Las determinaciones fueron realizadas frente a patrones secundarios de Diltiazem Clorhidrato previamente valorados contra patrones primarios y almacenados bajo condiciones de humedad y temperatura que aseguran su estabilidad (USP39/NF34 (2016).

Linealidad- Se construyeron curvas de calibración de absorbancia a 237 nm (Y) vs concentración del analito expresada en % (X), determinando los coeficientes de correlación (R) y determinación (R²). El coeficiente de variación (CV) de los factores de respuesta (f) (< 5%) se calculó mediante la relación de la respuesta analítica y la cantidad del analito. Igualmente, se evaluó la significación estadística de la pendiente (p<0,05) a través del análisis de varianza (ANOVA I). La proporcionalidad del método se analizó a través de la prueba t student donde t experimental debe ser menor que t tabulada. En los análisis se trabajó con el programa estadístico Statgraphics Centurión versión 18 y con un nivel de significación α=0.05.

Intervalo de trabajo. - Se consideraron 5 concentraciones en el rango de 80%- 120% para tabletas de Diltiazem 60 mg. Cada determinación se realizó por triplicado.

Exactitud. - Se utilizó un diseño empleando 3 niveles de concentraciones (bajo, medio y alto), cada uno por triplicado. Los resultados fueron analizados estadísticamente y se calcularon el porcentaje de recobro R y el coeficiente de variación.

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{concentración medida}}{\text{concentración añadida}} \times 100$$

Precisión. - Se tuvo en cuenta los resultados de repetibilidad y precisión intermedia

Precisión intermedia. - Se llevó a cabo con un nivel de concentración de la muestra equivalente al 100%, los análisis se repitieron cinco veces y se emplearon tres analistas para realizarlos en tres diferentes días. La aplicación de la prueba ANOVA permitió establecer las diferencias estadísticamente significativas entre las medias alcanzadas. Previo se verificó el cumplimiento de homocedistidad y la distribución normal, mediante las pruebas de Levene y Shapiro Wilk respectivamente. Ambas determinaciones deben dar valores de significación p>005. Como criterio se exige que el coeficiente de variación (CV) sea menor del 2%.

Repetibilidad. - Para estos parámetros se realizaron los ensayos en 5 días con intervalos de 48 horas cada análisis y tres concentraciones 90, 100 y 110%. Se realizaron 5 repeticiones entre las horas del día.

A través de una curva de recuperación, se realizó el análisis estadístico de la relación entre las concentraciones medidas y añadidas. No deben existir diferencias significativas entre el valor del recobrado medio y el 100%, además el coeficiente de variación debe ser ≤2%, para considerar que el método es exacto.

Especificidad - se evaluó por triplicado muestras independientes de tres formulaciones: una desarrollada sin el principio activo (placebo), otra de tabletas de diltiazem y una con el estándar de referencia (SR). Se aplicó el método analítico en las mismas condiciones de trabajo. A través de la comparación entre las respuestas obtenidas se determinó la posible interferencia de las sustancias auxiliares.

Criterio de aceptación: Ninguno de los componentes de la formulación debe dar respuesta cuantificable como interferencia en el método en estudio. El método debe ser específico frente a los excipientes, es decir, no deben aparecer señales

analíticas para el placebo a la longitud de onda (237 nm) de interés analítico para el diltiazem clorhidrato.

Preparación de los estándares secundarios de la curva.

La curva de calibración se realizó con el estándar secundario de Diltiazem Clorhidrato (0040073), previamente valorado contra el estándar USP, el cual se elaboró a tres concentraciones diferentes:

Concentración 1: 0.004 mg/ml. Pesar exactamente 20 mg de Diltiazem transferir a un matraz de 100 ml, disolver y llevar a volumen con agua, de esta solución se pipetea 1 ml y se lleva a volumen a un matraz de 50 ml.

Concentración 2: 0.005 mg/ml. Pesar exactamente 25 mg de Diltiazem transferir a un matraz de 100 ml, disolver y llevar a volumen con agua, de esta solución se pipetea 1 ml y se lleva a volumen a un matraz de 50 ml.

Concentración 3: 0.006 mg/ml. Pesar exactamente 30 mg de Diltiazem transfiera a un matraz de 100 ml disuelva y lleve a volumen con agua, de esta solución pipetee 1 mL y lleve a volumen a un matraz de 50 ml.

Se realizaron tres curvas de calibración, cada una con 3 concentraciones. Las cuales se realizaron en 3 días consecutivos cada una y las absorbancias se midieron en un espectrofotómetro UV 1700 a una longitud de onda de 237 nm. Al final, cuando se obtuvieron los resultados, se seleccionó una de las tres, la que tuviera un r^2 , más cercano a 1.

Valoración del Diltiazem.

Diltiazem 60 mg Tabletas. A partir de una tableta triturada de peso aproximado 240 mg, se pesaron 100 mg que contenían aproximadamente 25 mg de Diltiazem y se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 ml con unos 70 ml de agua, se disolvió la muestra agitando y se enrasó con agua, se pipeteó 1 ml a un matraz de 50 ml y se enrasó a volumen final con agua.

Perfiles de disolución con el Aparato 2 USP

A partir de los medicamentos en estudio (3 lotes de diltiazem tabletas liberación inmediata y un lote de Incoril innovador), se determinaron los perfiles de disolución de acuerdo con el ensayo 711 de la USP 39 (USP NF, 2016), empleando un equipo Disolutor marca Sotax tipo AT 7smart, de 7 vasos.

Para el desarrollo de este estudio se utilizó 900 ml de los diferentes buffers los cuales corresponden

a una solución de Ácido Clorhídrico 0.1N a pH 1.2, o jugo gástrico simulado, solución amortiguadora de Acetato pH 4.5, y solución de Mono fosfato Básico de Sodio pH 6.8, o jugo intestinal simulado, con aparato 2 o de paletas (USP NF, 2016).

El ensayo se realizó para cada medio y para cada lote de forma independiente. Los medios se desgasificaron previamente con vacío, y se trabajó a una temperatura de 37 ± 0.5 °C. Las paletas se sumergieron en los medios de disolución y se accionaron a 75 rpm. Inmediatamente después se colocó una tableta en cada vaso (6 vasos), dejando en vaso 7 como blanco.

Una vez comenzado el experimento se toman muestras de 10 mL a los 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 y 180 min, reponiendo el volumen en cada ocasión. Cada muestra es filtrada y de ellas se toman alícuotas de 1 ml, se colocan en matraces de 50 ml y se aforan con el medio de disolución correspondiente. La cantidad disuelta de diltiazem a cada tiempo se determinó en un espectrofotómetro UV/VIS (marca Shimadzu modelo UV 1700) a 237 nm con referencia a una curva de calibración de diltiazem estándar preparada el mismo día del análisis.

Utilizando el modelo independiente de este estudio y las recomendaciones de la FDA y OMS, se comparan los perfiles de disolución por medio de los factores f_1 y f_2 ; donde f_1 está entre 0 y 15 y los valores de f_2 están entre 50 y 100 (WHO, 2005)

Análisis estadístico

Los resultados de los parámetros de calidad, así como los de la validación, fueron procesados estadísticamente, se calcularon la media, desviación estándar y el coeficiente de variación y las medias se compararon por un análisis de varianza de una sola vía. Valores de $P < 0,05$ fueron considerados significativos.

La comparación de los perfiles se realizó con el empleo del método independiente que utiliza el factor de similitud para comparar el comportamiento entre los lotes del producto de referencia con los lotes de los productos prueba, tomando los valores de porcentaje disuelto acumulado (PDA promedio); de los perfiles de disolución de las tabletas de cada lote, en cada intervalo de tiempo y calculando el factor f_1 de diferencia y el factor f_2 de similitud con las ecuaciones siguientes (FDA, 2019).

$$f1 = \{ [\sum_{(1-n)} (T_{ti} - R_{ti}) / \sum_{(1-n)} R_{ti}] \} \times 100$$

$$f2 = 50 \log \{ 1 + (1/n) \sum_{(1-n)} 100^2 \}^{-1/2} \times 100$$

Donde

N = Número de puntos

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

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

III. RESULTADOS

Determinación de los parámetros de control de la calidad.

En la tabla 1 se exponen los resultados obtenidos

para los diferentes parámetros evaluados del control de calidad de las tabletas de diltizem genéricas y el producto innovador.

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de los lotes de Diltiazem 60 mg y del producto innovador Incoril.

Parámetros	Lotes (X +SD)			
	A	B	C	D
Peso mg	239,67 ± 2,13 a	239,09 ± 1,14 a	239,07 ± 2,40 a	238,99 ± 2,24 a
Diámetro en mm	8,14 ± 0,01 b	8,14 ± 0,01 b	8,14 ± 0,01 b	8,14 ± 0,01 b
Espesor en mm	3,75 ± 0,01c	3,75 ± 0,01c	3,75 ± 0,00 c	3,75 ± 0,00 c
Dureza Kg F	11,25 ± 0,38 a	10,93 ± 0,55 a	11,0 ± 0,53 a	11,1 ± 0,45 a
Friabilidad (%)	0,23 ± 0,00 b	0,29 ± 0,00 b	0,17 ± 0,00 b	0,22 ± 0,00 b
Tiempo de desintegración (min).	3,83 ± 0,75 c	4,66 ± 0,51 c	3,66 ± 0,51 c	4,00 ± 0,52 c
Uniformidad de contenido (%)	99,88 ± 0,66 d	100,23 ± 0,59 d	100,00 ± 0,41d	100,22 ± 0,60d
Perfil de disolución (%)	100,24 ± 0,28 e	100,28 ± 0,37 e	100,18 ± 0,34e	100,23 ± 0,63e

Leyenda: Letras iguales para un mismo parámetro indican que no hay diferencias significativas para p<0,05; X +SD = valor medio ± desviación estándar

Validación del método de análisis

La recta de mejor ajuste, con la ecuación y= 42,533x + 0,0195, coeficiente de correlación R=0,9999, por encima del rango de especificación,

que es mayor a 0,980; se obtuvo en el análisis de linealidad. La figura 1, expone el gráfico de absorbancia & concentración para definir la linealidad del método

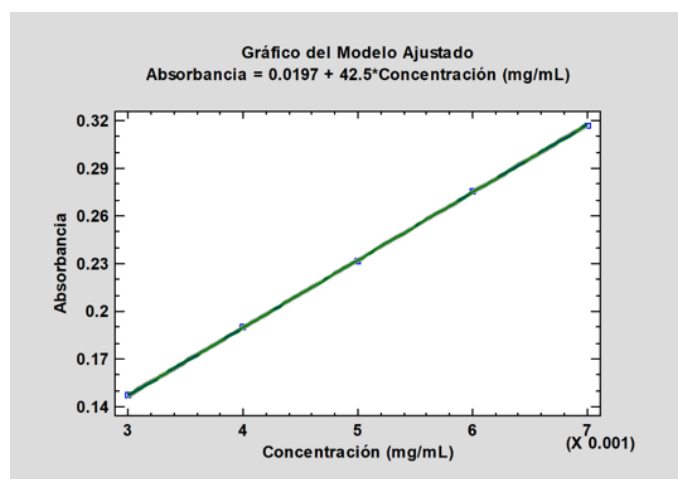


Figura 1. Gráfica de linealidad de las tabletas de Diltiazem 60 mg

En las figuras 2 A, B y C se exponen los resultados obtenidos para la evaluación de la linealidad en tres días consecutivos para la curva de calibración.

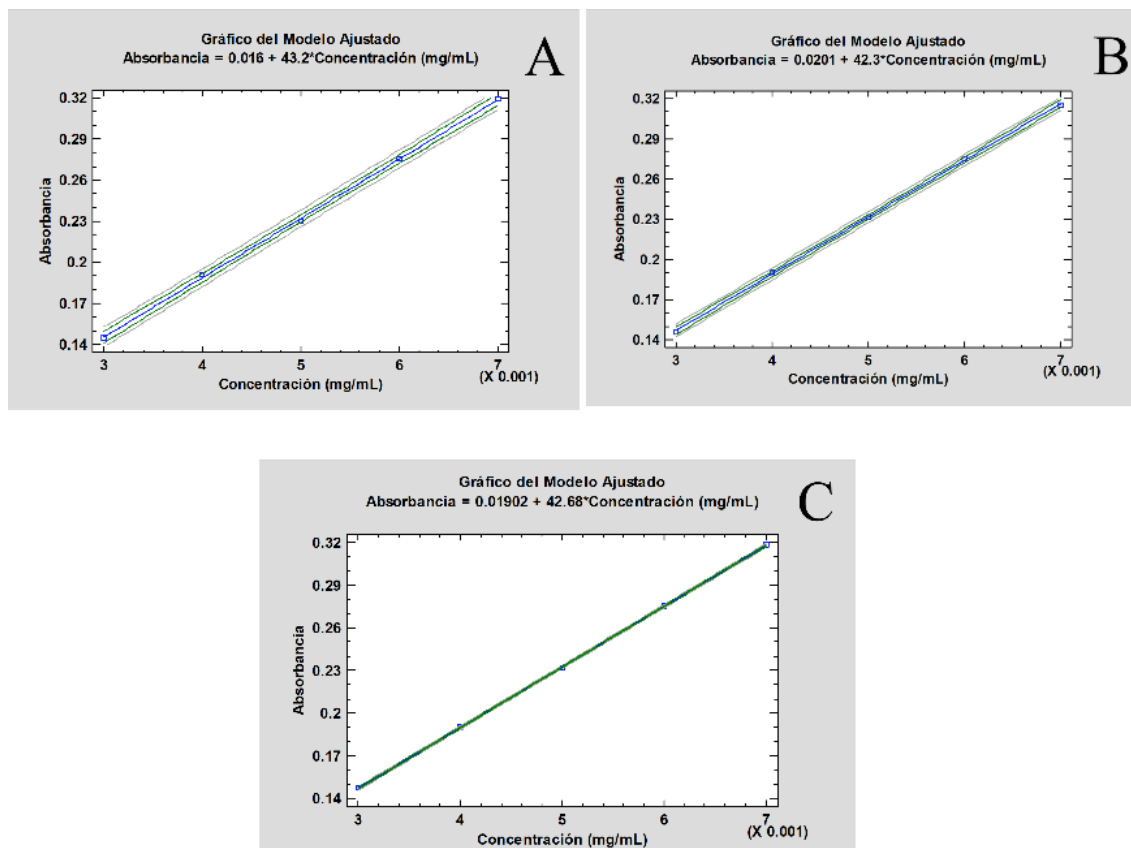


Figura 2. Curvas de calibración de la linealidad del método analítico por espectrofotometría UV. (A), (B), (C)

Precisión intermedia

precisión intermedia se presentan en la tabla 2

Los resultados para la determinación de la

Tabla 2. Datos de Precisión intermedia (n=5)

Días	Porcentaje de concentración Analistas			Parámetros estadísticos	
	1	2	3	X±SD	CV (%)
1	99,477	99,533	99,548	99,519±0,037	0,038
2	99,340	99,476	99,589	99,468±0,124	0,127
3	99,557	99,766	100,032	99,785±0,238	0,238
X±SD	99,457±0,110	99,592±0,126	99,724±0,220	X _{total} =99,590±0,024	
CV	0,110	0,126	0,220	CV _{total} =0,143	

Repetibilidad entre concentraciones

determinación de la repetibilidad entre

Los coeficientes de variación para la concentraciones se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Repetibilidad entre concentraciones

Nivel de concentración (%)	X %	S ²	SD	CV
90	90,1973	0,09174	0,3029	3,4E-05
100	99,388	0,04168	0,2042	2,1E-05
110	110,687	0,79609	0,8922	8,1E-05

En la especificidad se obtuvieron resultados similares para blancos y placebos (Tabla 4), lo cual demostró que no existían interferencias en la respuesta analítica debido a la presencia

de los excipientes empleados en la formulación de las tabletas. Estos resultados demuestran la especificidad del método frente a los restantes componentes de la formulación.

Tabla 4. Especificidad para el método

Réplicas	Resultados de la absorbancia a 237 nm			
	Blanco	Placebo	SR	Placebo + 100% principio activo
1	0,000	0,002	0,850	0,860
2	0,000	0,003	0,855	0,859
3	0,000	0,002	0,856	0,858
Media	0,000	0,002	0,854	0,859

Resumen de los parámetros de validación determinados

En la tabla 5, se resumen los parámetros de

validación establecidos para la técnica analítica por espectrofotometría UV para las tabletas del Diltiazem 60 mg.

Tabla 5. Parámetros de validación para Diltiazem.

Parámetros	Diltiazem 60 mg tabletas
% CV Repetibilidad	0,073771082
% CV Reproducibilidad	0,080242205
Exactitud %	1,8
Incertidumbre	0,00531
Linealidad	0,990

Perfiles de disolución

Los perfiles de disolución de los tres lotes

ensayados y del medicamento innovador Incoril a los diferentes pH y tiempos, se exponen en la figura 3.

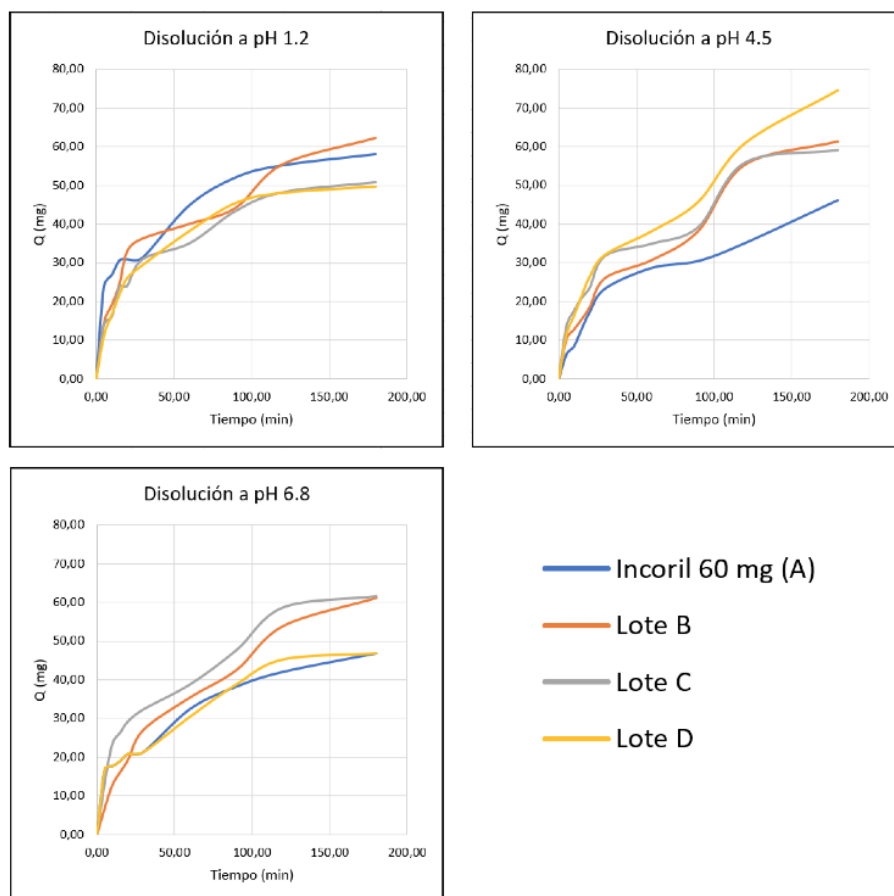


Figura 3. Comportamiento de los tres lotes de producto y del innovador a los diferentes valores de pH. (Equipo 2 paletas)

En la tabla 6, se exponen los resultados obtenidos.

Tabla 6. Porcentajes de disolución a los 30 minutos para los tres lotes del producto genérico y el Innovador a los diferentes valores de pH.

Productos	% de disolución alcanzado a los 30 minutos		
	Valores de pH		
	1,2	4,5	6,8
Incoril (A)	52,28	38,98	35,63
Lote B	60,56	43,18	45,11
Lote C	57,71	53,30	54,06
Lote D	49,11	53,55	35,61

Legenda: Equipo 2 paleta.

En la tabla 7, se exponen los resultados obtenidos valores de pH. para los factores f_1 y f_2 calculados a los diferentes

Tabla 7. Valores de f1 y f2 para el diltiazem por el equipo de paleta.

Productos	Valores de pH					
	1,2		4,5		6,8	
	f1	f2	f1	f2	f1	f2
Lote B	14,58	49,42	28,52	40,86	37,25	40,60
Lote C	20,20	43,48	41,82	37,54	19,98	52,22
Lote D	19,94	43,67	59,36	29,01	20,25	52,31

Los resultados alcanzados en la determinación del área debajo de la curva (ABC), la eficiencia de disolución (EF) y el tiempo medio de disolución (TMD) para el producto innovador y los tres lotes estudiados se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Valores obtenidos para el área debajo de la curva (ABC), la eficiencia de disolución (EF) y el tiempo medio de disolución (TMD) para el producto innovador y los tres lotes estudiados

Productos	pH	ABC	EF	TMD
Innovador (A)	1,2	8401,88	77,80	34,27
Lote B		8165,28	75,60	51,34
Lote C		7130,33	66,02	33,92
Lote D		7200,63	66,67	29,24
Innovador (A)	4,5	5479,60	50,74	47,33
Lote B		7249,80	67,13	63,16
Lote C		7579,90	70,18	50,79
Lote D		8588,60	79,52	80,27
Innovador (A)	6,8	6277,48	58,12	36,08
Lote B		7456,05	69,04	58,94
Lote C		8285,00	76,71	47,05
Lote D		6379,05	59,07	34,35

Leyenda: Equipo 2 paleta.

IV. DISCUSIÓN

Determinación de los parámetros de control de la calidad.

Teniendo en cuenta los métodos referenciados en la USP para Diltiazem tabletas, se evaluaron los parámetros fisicoquímicos a los tres lotes y al producto innovador, para verificar si cumplían con las especificaciones de calidad establecidas para el producto.

En el análisis fisicoquímico realizado a los tres lotes de las tabletas de Diltiazem y del producto innovador (Incoril), se observó que todos los parámetros cumplían con lo establecido en la Farmacopea (USP 39, 2016) y que no existían diferencias significativas para $p < 0,05$ entre los lotes estudiados, para ninguno de los parámetros analizados. Estos resultados se expusieron en la tabla 1.

Validación del método de análisis

El método de HPLC ha sido informado por diferentes autores para la determinación de diltiazem en diferentes formulaciones y en estudios farmacocinéticos (Molden et al., 2003; Sultana et al., 2007; Vivekanand et al., 2012). En este trabajo validó el método por espectrofotometría UV/VIS, para la determinación de Diltiazem, el cual no había sido informado anteriormente para este medicamento, pero si para otros como propranolol (Alva et al., 2013), ciprofloxacino (Pérez-Navarro et al., 2014) y acetaminofén (Pérez y Rojas, 2016), entre otros.

En la linealidad se obtuvo un coeficiente de correlación $R=0,9999$ y de determinación $0,9998$, valores superiores al rango de establecido para este parámetro ($0,980$), En el análisis de varianza (ANOVA) la significación fue $0,000$, por lo que existe una relación significativa entre absorbancia y

concentración (mg/mL). El estimado t resultó 425.0 (0.0000).

De acuerdo con los parámetros de desviación estándar para repetibilidad y reproducibilidad, estos no deben ser mayor del 2%, del cual su desviación estándar relativa (SR) para la repetibilidad es 0,08% y el SR para la reproducibilidad es 0,073%, lo cual indica que, en 5 días alternos, 5 veces al día, el método analítico que ha sido desarrollado se puede ejecutar sin complicación alguna.

Los resultados obtenidos por los tres días consecutivos para la curva de calibración en este caso del estándar secundario se reflejan en la figura 2 A, B, C en el que por medio de herramientas estadísticas se pudo reflejar el coeficiente de variación antes mencionado.

Precisión intermedia

Como consecuencia del cotejo de las varianzas entre los días y entre los analistas utilizando la prueba de Levene para el contraste de homogeneidad, reflejó valores estadísticos de 2,66 ($p=0.149$) para los analistas y 2,03 ($p=0.212$) para los días, lo cual indica que no existen diferencias significativas en las dispersiones. La prueba de Anova con la comparación entre las medias resultó $p>0,05$ (analistas $p=0.303$ y 0,907 para los días). Todos los test se trabajaron con un grado de significación del 95 %. El coeficiente de variación total calculado fue de 0,14 %, inferior al 2 % establecido como límite de este ensayo (tabla 2).

Repetibilidad entre concentraciones

Los coeficientes de variación por concentración estuvieron muy por debajo del 2% especificado, pudiendo decir que el método es repetible a concentraciones de 90 al 110 % (tabla 3).

Se realizó el ensayo, en cinco días, cinco veces cada día, con la fórmula de la tableta sin el principio activo, en tal caso, no existió ningún tipo de interferencia por parte del placebo en ninguno de los cinco días, existió una repetibilidad y reproducibilidad por debajo del 2% de especificación. Estadísticamente no se apreció diferencias significativas con una $p=0,375$.

Resumen de los parámetros de validación determinados

Los resultados obtenidos permiten demostrar

que el método de cuantificación es capaz de producir resultados confiables y reproducibles dentro de un intervalo determinado, por lo tanto, se considera validado.

Perfiles de disolución

De acuerdo con lo establecido por la WHO (2005) y la FDA (2019 a y b), el producto evaluado debe tener una rápida disolución, mínimo el 85% del fármaco debe disolverse a los 30 minutos utilizando el disolutor aparato 1 o 2, recomendados por la USP y en tres medios de disolución de pH 1,2; 4,5 y 6,8.

El diltiazem está en el grupo I del sistema de clasificación biofarmacéutica (BSC), por lo que debe presentar rápida disolución y absorción (Dahan et al., 2009; Yasir et al., 2010).

En la figura 3 se mostraron los perfiles de disolución de los tres lotes ensayados y del medicamento innovador Incoril a los diferentes pH y tiempos, donde se observan diferencias entre los tres lotes del producto genérico con respecto al innovador.

Si se tiene en cuenta el criterio de disolución de la FDA, ninguno de los productos, incluyendo el innovador, cumplen con este criterio, por lo que no pueden ser considerados de rápida disolución (Alkhalidi et al, 2010).

Como se pudo evidenciar en la tabla 5, ninguno de los lotes, ni el producto innovador alcanzó el 85% de disolución a los 30 min. Pudo apreciarse que el mayor valor lo alcanzó el lote B con un porcentaje de disolución de 60,56% en la solución de pH 1,2. Todos los productos exceptuando el lote C, disminuyeron sus concentraciones a medida que aumentaban los valores de pH.

Cuando un medicamento cumple con la condición de disolverse más de un 85% en 15 minutos o menos en los tres medios de disolución, no es necesario la aplicación del factor de similitud f_2 (Chen et al., 2011). Al no cumplir ninguno de los productos con esta condición se hace necesario comparar los perfiles de disolución por el método del modelo independiente en los tres medios de disolución.

Para garantizar la bioequivalencia entre un producto de referencia y el de comparación, se requiere que f_1 sea menor a 15 (0-15) y f_2 mayor a 50 (50-100). En caso de presentarse contradicción entre los resultados de f_1 y f_2 , prima la decisión por

el factor f_2 de similitud (Anand et al., 2011).

Como se puede apreciar en la tabla 6, sólo el Lote B en la disolución con pH 1,2 cumplió con el criterio del factor f_1 mientras que los lotes C y D a un valor de pH de 6,8, cumplen con el factor f_2 .

La aplicación del método del modelo independiente incluye también el cálculo de la eficiencia de la disolución (EF) y el tiempo medio de disolución (TMD). La eficiencia de la disolución permite la comparación de varias formulaciones y/o lotes de una misma formulación y se puede relacionar con la curva de concentración plasmática vs tiempo (Anand et al., 2011). El tiempo medio de disolución por su parte permite conocer el tiempo promedio requerido para la disolución del fármaco. En la tabla 7 se puede observar los valores calculados para el área debajo de la curva (ABC), la eficiencia de disolución (EF) y el tiempo medio de disolución (TMD) para el producto innovador y los tres lotes estudiados

Como se observa en la tabla a pH 1,2 que fue la disolución donde se obtuvo la mayor disolución, el producto innovador presentó los mayores valores en dos de los tres parámetros analizados, pero el TMD fue superior para el lote B; sin embargo a valor de pH de 4,5 el lote D presentó los mayores valores y a valor de pH 6,8 el lote C presentó los mayores valores del ABC y EF, empero, el TMD fue superior para el lote B.

V. CONCLUSIONES

El método de validación del principio activo por espectroscopia UV, resultó ser lineal y exacto, y es capaz de producir resultados confiables y reproducibles dentro de un intervalo determinado

Los parámetros de calidad de los tres lotes de las tabletas genéricas analizadas, así como el producto innovador cumplen con lo establecido en la USP.

Teniendo en cuenta los resultados alcanzados en los estudios de disolución se puede concluir que existen considerables diferencias en los perfiles de disolución entre lotes y entre estos y el medicamento innovador, por lo que no pueden ser considerados equivalentes.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alkhalidi B.A., Alkhatib H.S., Khadair A.A. (2010). Comparative dissolution of diltiazem immediate and

extended release products using conventional usp and innovative dissolution paddles. *The Open Drug Delivery Journal*, 4: 48-54.

Alva P, Ruidías D, Quiliche J, Sánchez Y. (2013). Bioequivalencia in vitro de tabletas de propranolol 40 mg multifuente e innovador. *Revista Farmaciencia* 1(2): 28-34.

Anand O.M., Yu L.X., Conner D.P., Davit B.M. (2011). Dissolution testing for generic drugs: An FDA perspective, *The AAPS Journal*, 13(3), 328-335. DOI: 10.1208/s12248-011-9272-y

Baena Y, Ponce D'León LF. (2008). Importancia y fundamentación del sistema de clasificación biofarmacéutico, como base de la exención de estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia in vivo. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 37(1):18-32.

Chen L., Shah V.P., Crommelin D.J., Shargel L., Bashaw D., Bhatti M., et al., (2011). Harmonization of regulatory approaches for evaluating therapeutic equivalence and interchangeability of multisource drug products: Workshop summary report, *The AAPS Journal*, 44(4): 506-513. DOI: 10.1016 / j.ejps.2011.09.010

Cushman WC, Cohen JD, Jones RP, Marbury TC, Rhoades RB, Smith LK. (1998). Comparison of the Fixed Combination of Enalapril/Diltiazem ER and Their Monotherapies in Stage 1 to 3 Essential Hypertension. *Am J Hypertens* 11:23-30. DOI: 10.1016 / s0895-7061 (97) 00372-5

Dahan A., Miller J.M., Amidon G. (2009). Prediction of solubility and permeability class membership: Provisional BCS classification of the world's top oral drugs, *The AAPS Journal*, 11(4): 740-6. DOI: 10.1208 / s12248-009-9144-x

FDA (2019 a). Guidance for Industry. Bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products-general considerations. USA, Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Disponible en <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>. Consultado: 28 de abril de 2019.

FDA (2019 b). Guidance for Industry. Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutic Classification System. usa, Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Disponible en www.fda.gov/cder/guidance/3618fnl.htm. Consultado: 8 de mayo de 2019.

Freire WB, Ramírez-Luzuriaga MJ, Belmont Ph, Mendieta MJ, et al. (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. ENSANUT. Tomo I. ISBN-978-9942-07-659-5. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/87679/1/WHO_DCO_WHD_2013.2_spa.pdf [https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/ Estadisticas_ Sociales/ ENSANUT/MSP_ENSANUT-ECU_06-10-2014.pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_Sociales/ENSANUT/MSP_ENSANUT-ECU_06-10-2014.pdf) 1-20. Consultado: 8 de octubre 2019.

Huayanay-Falconí, Leandro. (2012). Bioequivalencia en medicamentos. Revista Médica Herediana, 23(4): 221-222. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v23n4/v23n4e1.pdf>. Consultado: 8 de octubre 2019.

Ivanova NA, Trapani A, Franco CD, Mandracchia D, Trapani G, Franchini C, Corbo F, Tripodo G, Kolev IN, Stoyanov GS, Bratoeva KZ. (2018) In vitro and ex vivo studies on Diltiazem hydrochloride-loaded microsponges in rectal gels for chronic anal fissures treatment, International Journal of Pharmaceutics doi: DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.12.039

Jung CH, De Anda JG, Rubio K., Cruz M L. (2012). Comparación de perfiles de disolución. Impacto de los criterios de diferentes agencias regulatorias en el cálculo de f2. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 43 (3): 67-71.

Molden E, Boe G.H, Christensen H. (2003). High-performance liquid chromatography–mass spectrometry analysis of diltiazem and 11 of its phases I metabolites in human plasma. J. Pharm. Biomed. Anal. 33:275-285. DOI: 10.1023 / a: 1011941002546

OMS. (2013). Información general sobre la hipertensión en el mundo Una enfermedad que mata en silencio, una crisis de salud pública mundial.

Obtenido de: https://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/global_brief_hypertension/es/. Consultado: 8 de octubre 2019.

Ortiz-Prado E, Galarza C, Cornejo León F y Ponce J. (2014). Acceso a medicamentos y situación del mercado farmacéutico en Ecuador. Rev Panam Salud Publica 36(1): 57-62. Obtenido de: <https://scielosp.org/article/rpsp/2014.v36n1/57-62/>. Consultado: 8 de mayo 2019.

Pérez E, Rojas A. (2016). Validación de un método para cuantificación de acetaminofén en tabletas de 500 mg por espectrofotometría ultravioleta para la prueba de uniformidad de contenido. InterSedes 17(35):1-15. DOI 10.15517/ISUCR.V17I35.25563

Pérez-Navarro M, Rodríguez Y, Suárez Y. (2014). Validación del método por espectrofotometría ultravioleta para control de calidad de clorhidrato de ciprofloxacina en tabletas Ciprecu. Revista Cubana de Farmacia. 48(2):199-212

Polli J.E., Abrahamsson B., Yu L.X., Amidon G.L., Baldoni J.M., Cook J.A., et al. (2008). Summary workshop report: Bioequivalence, Biopharmaceutics Classification System, and beyond, The AAPS Journal, 10(2), 373-379. DOI: 10.1208 / s12248-008-9040-9

Ponce D´León LF, Jaramillo AM (2004). Estudio de bioequivalencia in vitro de cuatro productos de amoxicilina del mercado colombiano. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm., Volumen 33(1):70-76.

Rodríguez-Wong U, Ocharán ME, Toscano J. (2016a). Diltiazem tópico en el dolor postoperatorio de hemorroidectomía con técnica cerrada. Revista de Gastroenterología de México. 81(2):74-79. DOI: 10.1016/j.rgmx.2016.02.001

Rodríguez-Wong U, Ocharán ME, Toscano J. (2016b). Topical diltiazem for pain after closed Hemorrhoidectomy. Revista de Gastroenterología de México. 81(2):74-79. DOI: 10.1016 /j.rgmx.2016.02.001

Ross AL, O'Sullivan DM, Drescher MJ, Krawczynski MA. (2016). Comparison of weight-based dose vs. standard dose diltiazem in patients with atrial fibrillation presenting to the emergency department.

The Journal of Emergency Medicine. DOI: 10.1016/j.jemermed.2016.05.036

Saavedra I, Iturriaga V, Ávila L, Quiñones L. (2011). Estudios de bioexención (in vitro) para establecer equivalencia de medicamentos. Cuad Méd Soc (Chile). 51(2): 66-79

Segura Campos LA. (2017). Medicamentos genéricos: su importancia económica en los sistemas públicos de salud y la necesidad de estudios in vitro para establecer su bioequivalencia. Revista Pensamiento Actual 17(28): 108 - 120 ISSN Impreso: 1409-0112 / ISSN Electrónico: 2215-3586

Sultana N., Arayne MS, Shafi N. (2007). A validated method for the analysis of Diltiazem in raw materials and pharmaceutical formulations by RP-HPLC. Pak. J. Pharm. Sci. 20:284-290.

Torres M; Carrizales M; Sutil R; Márquez M; Muñoz M; Reigosa A; Barrios V (2007). Efecto del diltiazem sobre los lípidos séricos y lesiones ateroscleróticas en conejos hipercolesterolemicos. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica, 26(2):120-126

USP 39-NF34. (2016) U.S. Pharmacopeia National Formulary. Editorial: United States Pharmacopeial, ISBN 10: 1936424444 / ISBN 13: 9781936424443

Vivekanand A. Chatpalliwar N, Pawan K. Porwala N, Neeraj Upmanyub. (2012). Validated gradient

stability indicating HPLC method for determining Diltiazem Hydrochloride and related substances in bulk drug and novel tablet formulation. Journal of Pharmaceutical Analysis 2(3): 226-237. DOI: 10.1016 / j.jpha.2012.01.003

Ward SM, Radke J, Calhoun C, Caporossi J, Hall GA, Matuskowitz AJ, Weeda ER Weant KA. (2019). Weight-based versus non-weight-based diltiazem dosing in the setting of atrial fibrillation with rapid ventricular response. American Journal of Emergency Medicine. DOI: 10.1016/j.ajem.2019.09.020

WHO (2005). Multisource (generic) pharmaceutical products: Guidelines on registration requirements to establish interchangeability. Disponible en: http://www.who.int/medicines/services/expertcommittees/pharmprep/QAS04_093Rev4_final.pdf. Consultado: el 19 de febrero de 2013.

Yasir M., Asif M., Kumar A., Aggarwal A (2010). Biopharmaceutical classification system: An account, International Journal of Pharm Tech Research, 2(3): 1681-1690

Yoshizawa K, Nakashima K, Tabuchi M, Okumura A, Nakatake Y, Yamada M, Tsuneoka Y, Higashi T. (2020). Benzothiazepines, diltiazem and JTV-519, exert an anxiolytic-like effect via neurosteroid biosynthesis in mice, Journal of Pharmacological Sciences, DOI: 10.1016/j.jpsh.2020.03.003