

UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS

CENTRO DE BIOACTIVOS QUÍMICOS

Tesis presentada para optar por el título de Máster en Investigación y desarrollo de medicamentos



*Caracterización biofarmacéutica del citrato  
de sildenafil. ¿Bioequivalencia in vivo o  
bioexención?*

Autor: Lic. Claudia Beatriz Miranda Pérez de Alejo

Tutor: Dr.C Miguel Ángel Cabrera Pérez

Santa Clara

2018

*Pensamiento*

*“Nunca fui consciente de cualquier otra opción que no fuera la de cuestionar todo”*

*N. Chomsky*

# *Agradecimientos*

Mi más sincero agradecimiento:

- Al Dr. Miguel Ángel Cabrera, por confiar en mí, permitirme ser parte de su grupo y guiarme profesionalmente.
- A Yaidel, Zenia y Tania, porque este fue trabajo de todos y de todos es el logro.
- A Isabel, que nunca me falta.
- A todos los profesores que han contribuido a mi formación profesional.
- A mi familia, que sin importar cuál sea mi proyecto o mi ilusión siempre están ahí para mí.

A todos,  
Muchas Gracias

*Resumen*

## Resumen

El objetivo del presente estudio es contribuir a la caracterización biofarmacéutica del citrato de sildenafil según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB), siguiendo las directrices de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para bioexenciones. Los datos de solubilidad y permeabilidad intestinal del citrato de sildenafil fueron colectados de la literatura; sin embargo, los estudios experimentales de solubilidad no son concluyentes y su alta permeabilidad sugiere que es un ingrediente farmacéutico activo en el límite de Clase I y Clase II según el SCB. El perfil de solubilidad-pH se determinó mediante el método de saturación en matraces en el rango de pH de 1,2- 6,8 a 37°C en medio acuoso. La permeabilidad intestinal se determinó en rata mediante un método de perfusión *in situ* de lazo cerrado. La solubilidad del citrato de sildenafil es dependiente del pH y a un pH de 6,8 la relación dosis/solubilidad obtenida no cumple los criterios de la OMS para alta solubilidad. Los altos valores de permeabilidad obtenidos por perfusión intestinal *in situ* en ratas refuerzan los datos de permeabilidad publicados para el citrato de sildenafil. Los resultados experimentales obtenidos y los datos disponibles en la literatura sugieren que el citrato de sildenafil es un Clase II del SCB de acuerdo con las recomendaciones de la OMS para bioexención.

## **Abstract**

The main goal of this study is to contribute to the biopharmaceutical characterization of sildenafil citrate according to the Biopharmaceutical Classification System (BCS), following the guidelines of the World Health Organization (WHO) for biowaivers. Solubility and intestinal permeability data for sildenafil citrate were collected from the literature; however, the solubility information is inconclusive and its high permeability suggests that it is an active pharmaceutical ingredient at the border between Class I and Class II BCS. The solubility profile of the pH was determined by the shake-flask method in the pH range of 1.2-6.8 to 37°C and in aqueous medium. Intestinal permeability was determined in rat by a closed loop *in situ* perfusion method. The solubility of sildenafil citrate is pH-dependent and at a pH of 6.8, the dose/solubility ratio obtained does not meet the WHO criteria for high solubility. The high permeability values obtained by *in situ* intestinal perfusion in rats reinforce the published permeability data for sildenafil citrate. The experimental results obtained and the data available in the literature suggest that sildenafil citrate is a Class II BCS according to WHO recommendations for biowaivers.

# *Índice*

## Índice

<b>Introducción</b> .....	2
<b>Capítulo 1- Marco Teórico</b> .....	6
1.1 Conceptos biofarmacéuticos: Generalidades .....	6
1.2 Estudios de bioequivalencia .....	8
1.3 Sistema de Clasificación Biofarmacéutica.....	9
1.3.1 <i>Clasificación de la solubilidad</i> .....	10
1.3.2 <i>Métodos para la determinación experimental de la solubilidad</i> .....	10
1.3.3 <i>Clasificación de la permeabilidad</i> .....	11
1.3.4 <i>Métodos para la determinación experimental de la permeabilidad</i> .....	11
1.3.5 <i>Clasificación de la disolución</i> .....	13
1.4 Bioexención basado en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica.....	13
1.5 Regulatoria sobre Bioequivalencia <i>in vitro</i> .....	16
1.6 Industria Farmacéutica Cubana de Genéricos .....	19
1.7 Citrato de Sildenafil.....	19
1.7.1 <i>Características generales</i> .....	19
1.7.2 <i>Indicaciones terapéuticas, dosis recomendada e índice terapéutico</i> .....	20
1.7.4 <i>Comportamiento farmacocinético</i> .....	21
1.7.5 <i>Comportamiento de la forma de dosificación</i> .....	22
<b>Capítulo 2- Materiales y Métodos</b> .....	25
2.1 Compuesto de ensayo.....	25
2.3 Determinación experimental de la solubilidad .....	26
2.3.1 <i>Preparación de las soluciones buffer</i> .....	27
2.3.2 <i>Preparación de las curvas de calibración</i> .....	28
2.3.3 <i>Medición de la solubilidad por el método de frasco de agitación</i> .....	29
2.3.4 <i>Determinación de la solubilidad intrínseca con el programa pDISOL-X<sup>TM</sup></i> .....	29
2.4 Determinación experimental de la permeabilidad intestinal .....	30
2.4.1 <i>Preparación de las soluciones de lavado</i> .....	31
2.4.2 <i>Determinación experimental de la permeabilidad por el método de perfusión in situ</i> .....	31
2.5 Clasificación biofarmacéutica provisional del citrato de sildenafil .....	32
<b>Capítulo 3- Resultados y Discusión</b> .....	35
3.1 Solubilidad del Citrato de Sildenafil .....	35
3.2 Determinación experimental de la solubilidad .....	36
3.2.1 <i>Curvas de calibración</i> .....	36

3.2.2 Resultados del ensayo experimental de la solubilidad por el método de frasco de agitación.....	36
3.2.3 Resultados de la determinación de la solubilidad intrínseca con el programa pDISOL-X™ .....	38
3.3. Determinación experimental de la permeabilidad intestinal .....	39
3.4 Clasificación biofarmacéutica provisional del citrato de sildenafil .....	42
<b>Conclusiones</b> .....	46
<b>Recomendaciones</b> .....	48
<b>Referencias</b> .....	50

# *Introducción*

## Introducción

En la actualidad, los ensayos de bioequivalencia (BE) son aceptados por las agencias reguladoras de medicamentos como un procedimiento estándar para aprobar modificaciones relevantes en el proceso de fabricación, así como para demostrar la seguridad y eficacia de medicamentos genéricos. En los últimos años, la sustitución de estos estudios por ensayos de disolución *in vitro* (bioexención) bajo el marco del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB) ha desempeñado un papel importante en la industria farmacéutica, evitando innecesarios ensayos clínicos en humanos y una reducción considerable en el coste y el tiempo en el desarrollo de productos genéricos<sup>(1,2)</sup>.

En 1995, con la publicación de los fundamentos para la clasificación biofarmacéutica de fármacos, Amidon y colaboradores sientan las bases de lo que hoy se conoce como el SCB. Este sistema es un marco científico para clasificar un fármaco considerando su solubilidad acuosa (relativa a la dosis) y su permeabilidad intestinal<sup>(3)</sup>. La combinación de estas propiedades con la disolución del medicamento, se consideran los tres factores más importantes que modulan la velocidad y cantidad absorbida de un Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA), a partir de formas farmacéuticas sólidas orales de liberación inmediata (FFSLI). De acuerdo con el SCB, los fármacos se agrupan en cuatro clases, alta solubilidad/ alta permeabilidad (Clase I), baja solubilidad/ alta permeabilidad (Clase II), alta solubilidad/ baja permeabilidad (Clase III), y baja solubilidad/ baja permeabilidad (Clase IV).

Actualmente, el SCB ha sido aceptado por numerosas autoridades reguladoras en todo el mundo, como la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos (US-FDA)<sup>(4,5)</sup>, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA)<sup>(6)</sup>, y la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>(7)</sup>, aceptando las bioexenciones basadas en el SCB para fármacos Clase I y III contenidos en FFSLI.

El SCB también ha sido usado en las primeras etapas de desarrollo de nuevas moléculas con actividad biológica, en este sentido, varios sistemas de clasificación provisional han sido propuestos y validados utilizando datos teóricos y/o experimentales de solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal<sup>(1,8-10)</sup>. Debido a la relevancia alcanzada en los últimos años del SCB para asegurar la disponibilidad de

medicamentos en los mercados emergentes, la Federación Farmacéutica Internacional (FIP) ha publicado 49 monografías sobre bioexención fundamentalmente para los medicamentos contenidos en la Lista de Medicamentos Esenciales de la Organización Mundial de la Salud<sup>(11)</sup>.

El citrato de sildenafil (Viagra®, Pfizer), un inhibidor selectivo de la enzima fosfodiesterasa tipo 5, es un agente terapéutico efectivo para el tratamiento de la disfunción eréctil<sup>(12)</sup>. Este compuesto se absorbe rápidamente después de la administración oral, pero tiene valores de biodisponibilidad absoluta moderados ( $F \approx 40\%$ )<sup>(13)</sup>. Los valores de permeabilidad *in vivo* en humanos o los valores de permeabilidad *in situ* para el citrato de sildenafil no han sido descritos en la literatura. Sin embargo, algunas predicciones de permeabilidad humana según el SCB han sido realizadas utilizando métodos *in vitro* de cultivo celular Caco-2 y MDCK, y ensayos de permeabilidad en membrana artificial (PAMPA)<sup>(14-16)</sup>.

Varios autores han clasificado este fármaco como Clase I o Clase I/III del SCB<sup>(1,9,17)</sup>. Sin embargo, los valores contradictorios de solubilidad determinados bajo diferentes condiciones experimentales sugieren que el citrato de sildenafil es un Clase II del SCB de acuerdo con las directrices de la OMS<sup>(14,18,19)</sup>. Tomando en consideración lo anteriormente planteado el **problema científico** a resolver es: La ausencia de una correcta clasificación biofarmacéutica del citrato de sildenafil podría conducir a inadecuadas demostraciones de intercambiabilidad terapéutica para genéricos de este fármaco, lo que conllevaría a errores en la demostración de su eficacia y seguridad, afectando la salud de los pacientes.

En correspondencia con el problema científico planteado, la **hipótesis de investigación** es la siguiente: Si se lograra definir una clasificación biofarmacéutica para el citrato de sildenafil, basada en el SCB, las empresas farmacéuticas que desarrollan formas sólidas orales de liberación inmediata de este IFA podrían demostrar con seguridad su intercambiabilidad terapéutica ya sea por ensayos de bioequivalencia *in vivo* en humanos o por ensayos de disolución *in vitro*.

Para dar cumplimiento a la hipótesis de investigación se proponen los objetivos siguientes:

**Objetivo general.** Establecer una correcta caracterización biofarmacéutica para el citrato de sildenafil según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica.

**Objetivos Específicos**

1. Colectar de la literatura los datos biofarmacéuticos relevantes de solubilidad y permeabilidad descritos para el citrato de sildenafil.
2. Completar experimentalmente la información biofarmacéutica necesaria para facilitar la clasificación del citrato de sildenafil según el SCB.

# *Marco Teórico*

## Capítulo 1- Marco Teórico

### 1.1 Conceptos biofarmacéuticos: Generalidades

Para una total comprensión de los estudios biofarmacéuticos de IFAs y su relevancia durante el proceso de desarrollo de nuevos fármacos, así como de medicamentos genéricos, es necesario abordar una serie de conceptos generales, los cuales se describen a continuación.

#### *Biofarmacia*

Se define como el estudio de la influencia de las propiedades fisicoquímicas de los fármacos, su presentación y sus vías de administración sobre la velocidad y magnitud de su absorción. Los factores que influyen sobre la liberación de un fármaco de su forma farmacéutica, su disolución en los líquidos fisiológicos, su estabilidad en esos líquidos, su permeabilidad a través de las membranas biológicas más importantes y su metabolismo pre-sistémico, condicionarán la velocidad y magnitud de la absorción del fármaco<sup>(20)</sup>.

#### *Biodisponibilidad*

Es un concepto farmacocinético que se refiere a la velocidad y cantidad a la cual la dosis de un fármaco, administrado en su forma farmacéutica, alcanza la circulación sistémica<sup>(21)</sup>. Entre los factores que influyen de manera directa o indirecta en la biodisponibilidad de un principio activo se destacan: el tipo de forma farmacéutica y los excipientes utilizados, el mecanismo de absorción, las características propias del sistema gastrointestinal y el tiempo de tránsito, las características fisicoquímicas del fármaco que afectan la absorción y finalmente, el metabolismo pre-sistémico a nivel intestinal y hepático<sup>(20)</sup>.

La biodisponibilidad puede ser absoluta o relativa. En el primer caso se compara la biodisponibilidad de un fármaco administrado por la vía oral con datos de una dosis intravenosa, obteniéndose información útil sobre la distribución y eliminación del fármaco e indirectamente se determina la permeabilidad oral y la influencia de enzimas y transportadores pre-sistémicos. En cambio, la biodisponibilidad relativa es aquella en la que se compara la biodisponibilidad de un fármaco administrado en la forma farmacéutica de prueba con la del mismo fármaco administrado mediante la forma farmacéutica convencional. Por lo tanto, la biodisponibilidad relativa es una

medida de la eficacia de la absorción de un mismo principio activo desde dos formas farmacéuticas similares<sup>(21)</sup>.

### *Bioequivalencia*

Es un término utilizado en farmacocinética para evaluar comparativamente la equivalencia terapéutica entre dos formulaciones de un medicamento que contiene el mismo principio activo. Para que dos medicamentos sean bioequivalentes deben ser equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas y su biodisponibilidad, en magnitud y velocidad, deben ser similar en tal grado que sus efectos, en términos de eficacia y seguridad, serán esencialmente los mismos<sup>(21)</sup>.

### *Equivalentes Farmacéuticos*

Son productos farmacéuticos que contienen idénticas cantidades de los mismos principios activos, o sus mismas sales o ésteres, en idéntica forma farmacéutica y vía de administración, pero no necesariamente contienen los mismos excipientes, y que cumplen con las mismas o comparables especificaciones de calidad. Los equivalentes farmacéuticos no necesariamente implican bioequivalencia ya que diferencias en los excipientes y/o procesos de manufactura pueden conducir a una rápida o lenta disolución y/o absorción.

### *Alternativa Farmacéutica*

Los productos farmacéuticos son alternativas farmacéuticas si contienen idénticas cantidades de los mismos principios activos, pero difieren en su forma farmacéutica o en su forma química. Las alternativas farmacéuticas entregan la misma fracción activa por la misma ruta de administración pero no son equivalentes farmacéuticos.

### *Equivalente terapéutico*

Cuando se trata de medicamentos equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas que después de la administración a las mismas dosis molares, los efectos referidos a la seguridad y eficacia son esencialmente los mismos al ser administrados a pacientes, por la misma ruta y bajo las condiciones declaradas en el etiquetado.

### *Producto Farmacéutico Innovador*

Es en general el que se registró por primera vez, por lo que usualmente corresponde a un IFA patentado y para el que se realizaron los estudios completos de calidad, seguridad y eficacia. Por lo general es el producto de elección para demostrar la intercambiabilidad.

#### *Producto Genérico*

Son los que contienen un mismo ingrediente farmacéutico activo y se comercializan bajo la denominación común internacional o bajo una marca. Se fabrican por múltiples fabricantes y en muchas ocasiones no tienen la misma fortaleza ni la misma forma de dosis que el producto innovador. El nombre genérico se utiliza para denominar un ingrediente farmacéutico activo que no está amparado por marca y coincide en general con la denominación común internacional de la sustancia.

#### *Producto Farmacéutico Multiorigen*

Son productos farmacéuticamente equivalentes o alternativas farmacéuticas que se fabrican por diferentes fabricantes en el mundo y que pueden o no ser equivalentes desde el punto de vista terapéutico. Es la denominación actual para los llamados medicamentos genéricos. Este término se utiliza por la OMS para evitar confusiones dado que el término “producto genérico” tiene significados diferentes en distintas jurisdicciones.

#### *Producto Farmacéutico Intercambiable*

Es el producto terapéuticamente equivalente a un producto innovador o de referencia.

### **1.2 Estudios de bioequivalencia**

Los estudios de bioequivalencia se iniciaron en el año 1977, cuando la FDA exigió la realización de determinaciones farmacocinéticas, a través de la medición del área bajo la curva (AUC) y la concentración plasmática máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ), para fármacos genéricos de digoxina, fenitoína, antidepresivos tricíclicos e hipoglucemiantes orales que habían reportado problemas de eficacia<sup>(22)</sup>.

Los estudios de bioequivalencia *in vivo* han sido avalados durante muchos años como el estándar de oro para demostrar la seguridad y eficacia de los medicamentos genéricos<sup>(23)</sup>. Sin embargo, con el surgimiento y aplicación del SCB los estudios de

bioequivalencia *in vitro* han alcanzado un notable auge en el campo de los medicamentos genéricos. Estos estudios son de mayor rapidez, menor costo y con menos problemas éticos asociados que los tradicionales ensayos *in vivo*<sup>(2)</sup>.

La utilización de los estudios *in vitro* (ensayos comparativos de velocidad de disolución a diferentes valores de pH) se basan en el hecho de que luego de la administración oral de una forma farmacéutica sólida, la absorción del principio activo depende de los procesos de liberación, disolución y permeabilidad a través de la barrera gastrointestinal<sup>(3)</sup>. Las diferencias observadas *in vivo* entre la velocidad y la cuantía de la absorción de un principio activo en dos productos farmacéuticos orales sólidos (Equivalentes Farmacéuticos o Alternativas Farmacéuticas) pueden ser atribuibles a diferencias en la cinética de liberación-disolución del fármaco *in vitro*. Sin embargo, cuando la liberación-disolución *in vivo* de una forma farmacéutica sólida de liberación inmediata es rápida con relación al vaciamiento gástrico y el principio activo tiene una alta permeabilidad, es poco probable que la velocidad y la cuantía de la absorción del fármaco dependan de la liberación-disolución y/o el tiempo de tránsito gastrointestinal del fármaco. Bajo tales circunstancias, es posible que no sea necesaria la demostración de la bioequivalencia *in vivo* para los productos farmacéuticos que contienen ingredientes farmacéuticos activos con alta solubilidad y alta permeabilidad, siempre que los excipientes usados en la forma farmacéutica y el proceso de fabricación no afecten significativamente la absorción de los ingredientes farmacéuticos activos<sup>(4)</sup>.

### **1. 3 Sistema de Clasificación Biofarmacéutica**

El SCB es un marco científico utilizado para clasificar los principios activos basándose en su solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal. Cuando se combina con la cinética de liberación-disolución del producto farmacéutico, el SCB considera tres factores principales que gobiernan la velocidad y cuantía de la absorción a partir de formas farmacéuticas de liberación inmediata: disolución, solubilidad y permeabilidad intestinal<sup>(3)</sup>.

De acuerdo al SCB, los principios activos se clasifican de la siguiente manera:

Clase	Solubilidad	Permeabilidad
I	Alta	Alta
II	Baja	Alta
III	Alta	Baja
IV	Baja	Baja

Esta clasificación puede ser usada para el marco de las especificaciones de la disolución *in vitro* y puede también proveer un base para predecir la probabilidad de obtener una correlación *in vivo–in vitro* (IVIVC) satisfactoria<sup>(4)</sup>.

La US-FDA, EMA y OMS tienen implementada la bioexención basada en el SCB para sustituir los estudios de bioequivalencia *in vivo* para los IFAs de FFSLI, clasificados como Clase I y Clase III, siempre y cuando este científicamente justificado y recomendado<sup>(4,6,7)</sup>.

### 1.3.1 Clasificación de la solubilidad

Un IFA se considera de alta solubilidad, cuando la mayor dosis terapéutica simple es soluble en 250 mL o menos de medio acuoso en un rango de pH de 1,2– 6,8. El perfil pH-solubilidad del IFA debe ser determinado a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  en medio acuoso. Se recomienda un mínimo de tres determinaciones de solubilidad por cada valor de pH<sup>(7)</sup>.

Cuando la solubilidad aparece en forma cualitativa, se suele aplicar el término descriptivo para aproximar la solubilidad basado en las referencias estándares descritas por el Merck Index o la Farmacopea de los Estados Unidos (USP)<sup>(24,25)</sup>.

### 1.3.2 Métodos para la determinación experimental de la solubilidad

Hay varios métodos descritos en la literatura para evaluar la solubilidad experimental de un IFA, sin embargo el más utilizado es el método de "*Shake Flask*" o matraces saturados. Este es un método sencillo que consiste en obtener una solución sobresaturada del IFA en los medios de disolución en estudio. La solución se deja en agitación por un tiempo determinado y luego se deja reposar para lograr la sedimentación y alcanzar la solubilidad en equilibrio. El fármaco es cuantificado

tomando muestras del sobrenadante. Es un método sencillo, de fácil implementación y cuyos resultados son reproducibles<sup>(26)</sup>.

### 1.3.3 Clasificación de la permeabilidad

Un IFA es altamente permeable cuando la magnitud de la absorción es superior o igual al 85%, basado en estudios de balance de masa o en comparación con la administración intravenosa del producto de referencia (biodisponibilidad absoluta). Idealmente estos estudios deben ser realizados a la misma dosis que la utilizada para la clasificación de la solubilidad. Si esto no es posible, se debe justificar la linealidad farmacocinética de la dosis, para el uso de otras dosis<sup>(7)</sup>.

### 1.3.4 Métodos para la determinación experimental de la permeabilidad

Existen cinco enfoques principales para demostrar una alta permeabilidad bajo el marco del SCB: *i)* estudios de biodisponibilidad absoluta o de balance de masa en seres humanos, *ii)* recuperación urinaria de medicamento inalterado en seres humanos, *iii)* estudios de perfusión intestinal *in vivo* en seres humanos, *iv)* estudios de permeabilidad *in vitro* a través de un cultivo de monocapas de células epiteliales, y/o *v)* metabolismo elevado según la definición del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica de Distribución de Fármacos (BDDCS)<sup>(27,28)</sup>.

Los estudios en células Caco-2 (células de adenocarcinomas de colon humano) son recomendados por la US-FDA y la EMA como un modelo adecuado para evaluar la permeabilidad intestinal<sup>(6,7)</sup>. Las células Caco-2 son capaces de diferenciarse morfológica y funcionalmente, de manera espontánea, a células con gran similitud al enterocito intestinal humano<sup>(29)</sup>. Varios autores han demostrado que los fármacos pueden ser agrupados en diferentes niveles de absorción en base a los valores de permeabilidad en células Caco-2 (tabla 1). Los compuestos con alta permeabilidad en células Caco-2 son normalmente bien absorbidos, mientras que los de baja permeabilidad no siempre exhiben una pobre absorción *in vivo*<sup>(29,30)</sup>. Sin embargo, inferir una baja absorción, basado solamente en los valores de permeabilidad en Caco-2, es muy dudoso, ya que tanto la solubilidad como la estabilidad metabólica pueden influir en los valores de absorción.

**Tabla 1.** Correlación entre la permeabilidad en células Caco-2 y la absorción oral en humanos descrita en la literatura.

<b>Datos analizados (Referencia)</b>	<b>Rango de Caco-2 (<math>P_{app}</math>) <math>\times 10^{-6}</math> cm/s</b>	<b>Criterio de Absorción</b>
17 fármacos <sup>(31)</sup>	>1	Absorción completa
	0,1 a 1	1%< Absorción <100%
	$\leq 0,1$	Absorción <1%
36 fármacos, compuestos similares a fármacos y excipientes <sup>(32)</sup>	<1	Pobre absorción (0-20%)
	1 a 10	Moderada absorción (20-70%)
	$\geq 10$	Buena absorción (70-100%)
51 fármacos, compuestos similares a fármacos <sup>(33)</sup>	<0,4	Muy pobre absorción oral
	>7	Excelente absorción oral
120 fármacos, compuestos similares a fármacos <sup>(34)</sup>	>16	Alta absorción (>75%)
	0,1 a 10	Amplio rango de absorción
20 fármacos <sup>(35)</sup>	>14	Alta absorción (90-100%)
	<5	Baja absorción (0-89%)

$P_{app}$ : constante de permeabilidad

Las células MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) son un modelo clásico para estudiar la regulación del crecimiento celular, el metabolismo y los mecanismos de transporte. De forma similar a las Caco-2, se han logrado diferenciar en epitelios columnares y formar uniones estrechas cuando se cultivan en membranas semipermeables. Su uso como modelo de barrera celular para validar el transporte de fármaco en el epitelio intestinal ha sido muy amplio. Entre las dos líneas celulares (Caco-2 y MDCK) se han obtenido excelentes correlaciones (>0,90)<sup>(36)</sup>. A su vez, se han establecido correlaciones muy bien definidas de ambos tipos de células con la fracción absorbida en humanos.

Por otra parte también se han realizado estudios de permeabilidad en membranas artificiales paralelas (PAMPA). Este es un método *in vitro*, muy utilizado por las compañías farmacéuticas que permite una rápida evaluación de la permeación transcelular. Estas membranas lipídicas carecen de poros y de sistemas de transporte activo<sup>(37)</sup>. El método BAMPA desarrollado por Sugano y col.<sup>(38)</sup> en el 2001, surge como una alternativa al método PAMPA, son membranas artificiales biomiméticas que tratan de imitar el borde de cepillo de la membrana intestinal.

Uno de los modelos más ampliamente utilizados para la determinación de la permeabilidad intestinal es el método *in vitro* de intestino de rata aislado<sup>(39)</sup>. La utilidad de este modelo para estudiar la absorción de fármacos ha sido ampliamente investigada y su aplicación combinada con otros modelos experimentales como Caco-2, MDCK, etc. demuestra ser una herramienta más confiable, no sólo para caracterizar la permeabilidad de los fármacos sino también para clasificar la permeabilidad de acuerdo al SCB y por consiguiente, para procedimientos de bioexención basados en este sistema<sup>(40)</sup>.

Por último, otro de los métodos de permeabilidad comúnmente utilizados son los estudios de perfusión *in situ* en ratas dentro de los que podemos señalar el método de paso simple<sup>(41)</sup> y el método de lazo cerrado desarrollado por Doluisio y col.<sup>(42)</sup>. Ambas metodologías brindan condiciones experimentales muy cercanas a lo que ocurre durante el proceso de absorción oral. Varios estudios han demostrado que la magnitud de la absorción en humanos puede ser predicha por estos métodos *in situ*<sup>(41,43,44)</sup>.

### 1.3.5 Clasificación de la disolución

Se considera que un producto medicamentoso de liberación inmediata es de disolución rápida cuando un 85% o más de la cantidad marcada de la sustancia medicamentosa se disuelve dentro de los 30 minutos<sup>(4,6,7)</sup> usando el Aparato I de la USP (canastilla) a 100 rpm o el Aparato II (paleta) a 50 rpm, en un volumen de 900 mL (EMA, OMS) o 500 mL (FDA) en cada uno de los siguientes medios:

- 0,1 N de HCl o Fluido Gástrico Simulado USP sin enzimas
- Tampón de pH 4,5 (acetato)
- Tampón de pH 6,8 (fosfato) o Fluido Intestinal Simulado sin enzimas.

Se considera que un producto medicamentoso de liberación inmediata es de disolución muy rápida cuando un 85% o más de la cantidad marcada de la sustancia medicamentosa se disuelve en 15 minutos, usando las mismas condiciones anteriores.

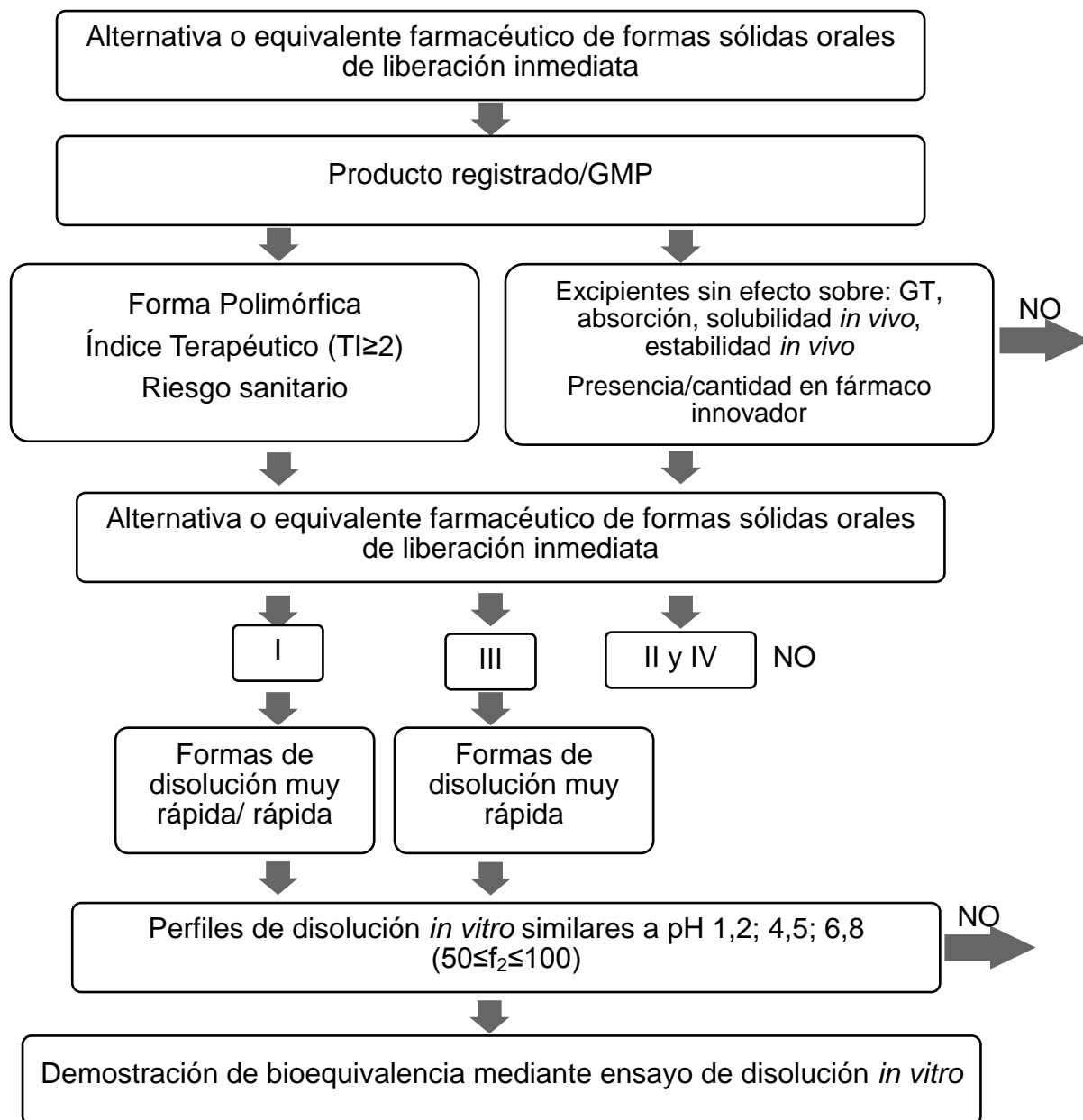
## 1.4 Bioexención basada en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica

La bioexención es la prerrogativa de la autoridad reguladora para eximir de la obligación de presentar estudios de bioequivalencia *in vivo* (ensayo clínico en

humanos) para el establecimiento de la equivalencia terapéutica, la cual puede demostrarse mediante estudios *in vitro*. Para formas farmacéuticas sólidas orales de liberación inmediata, la evidencia de bioequivalencia se determina basándose en una comparación del perfil de disolución *in vitro* entre el producto en estudio y el producto de referencia, siempre y cuando el IFA tenga adecuados valores de solubilidad y permeabilidad intestinal<sup>(4,6,7)</sup>.

La bioexención elimina la exposición innecesaria de individuos sanos a medicamentos, reduce la carga regulatoria y proporciona alivio económico, manteniendo en alto los estándares de salud pública para la equivalencia terapéutica<sup>(2)</sup>. Especialmente en países en vías de desarrollo, donde a menudo no hay recursos suficientes para realizar los estudios de bioequivalencia *in vivo*, el uso del SCB se convierte en una herramienta importante para asegurar la eficiencia y calidad de los productos farmacéuticos<sup>(17)</sup>.

En la figura 1 se muestra un procedimiento general de bioexención de un IFA cumpliendo con los requerimientos de las principales agencias reguladoras de medicamentos (US-FDA, OMS y EMA).



**Figura 1.** Bioexención de estudios de bioequivalencia *in vivo* de formas farmacéuticas sólidas orales de liberación inmediata, utilizando ensayos de disolución *in vitro*, de acuerdo al SCB.

La bioexención es aplicable a FFSLI, cuyo proceso de producción cumpla con las Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Farmacéuticos (BPF).

Para bioexonerar un IFA de un estudio de bioequivalencia *in vivo* es necesario evaluar las características propias del principio activo y de la forma de dosificación. Inicialmente se necesitan conocer las características polimórficas del fármaco, ya que diferencias en el polimorfismo de un IFA pueden modificar la

biodisponibilidad<sup>(45)</sup>. Otro elemento a considerar es el índice terapéutico, el SCB no es aplicable a fármacos con estrecho margen terapéutico. La formulación farmacéutica no debe presentar excipientes críticos que puedan afectar la absorción del IFA<sup>(46)</sup>. Después de evaluados todos los factores anteriores se deberá clasificar el fármaco según el SCB pudiendo someter a bioexención fármacos clasificados como Clase I y/o Clase III. Si los perfiles de disolución son similares en el rango de pH estudiado se podrá demostrar la bioequivalencia mediante un ensayo disolución *in vitro*<sup>(4,6,7)</sup>.

### 1.5 Regulatoria sobre Bioequivalencia *in vitro*

La bioexención ha sido incorporada a las normativas de las principales agencias reguladoras de medicamentos en el mundo como la OMS, US-FDA y EMA, aceptando la demostración de bioequivalencia *in vitro* para fármacos clasificados como Clase I y Clase III según el SCB (tabla 2)<sup>(4,6,7)</sup>.

**Tabla 2.** Marco regulatorio Internacional sobre bioequivalencia *in vitro*.

Agencia Reguladora	Regulación
<b>Administración de Fármacos y Alimentos (US-FDA)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System: guidance for industry (US-FDA, 2017)</i><sup>(4)</sup></li> <li>• <i>Dissolution Testing and Specification Criteria for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms containing Biopharmaceutics Classification System class 1 and 3 Drugs Guidance for Industry (Draft Guidance, 2015)</i><sup>(5)</sup></li> </ul>
<b>Agencia Europea de Medicamentos (EMA)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Guideline on the investigation of bioequivalence, 2010</i><sup>(6)</sup></li> <li>• <i>Compilation of individual product-specific guidance on demonstration of bioequivalence. EMA 2016</i><sup>(47)</sup></li> </ul>
<b>Organización Mundial de la Salud (OMS)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability. WHO 2017</i><sup>(7)</sup></li> </ul>

En la mayoría de los países latinoamericanos la bioexención se considera una herramienta útil para demostrar la intercambiabilidad terapéutica de los medicamentos genéricos (tabla 3). Sin embargo, su aplicación aún es escasa debido

fundamentalmente al limitado número de laboratorios o centros acreditados para la realización de estos estudios y a la ausencia de una clasificación biofarmacéutica de los medicamentos esenciales que defina los principios activos candidatos a bioexención.

**Tabla 3.** Marco regulatorio sobre bioequivalencia *in vitro* en las principales agencias de medicamentos de América Latina y el Caribe

País	Agencia Reguladora	Aceptan el SCB (Si/No)	Regulación
Brasil	ANVISA	Si	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dirección Colegiada de la Resolución- RDC nº 37 del 3 de Agosto 2011 Guía para la inserción o sustitución de estudios de Biodisponibilidad/ Bioequivalencia relativa<sup>(48)</sup>.</li> </ul>
Chile	ISP	Si	<ul style="list-style-type: none"> <li>Resolución.Exenta No 727/05 Norma que define los criterios destinados a establecer equivalencia terapéutica en productos farmacéuticos en Chile. (Res. Ex. 727/05, Publicada en la gaceta oficial en Nov. 29, 2005)<sup>(49)</sup></li> <li>GBIOF 02: Bioexención de los estudios de Biodisponibilidad/Bioequivalencia para establecer Equivalencia Terapéutica de Formas Farmacéuticas Sólidas Orales<sup>(50)</sup></li> </ul>
Cuba	CECMED	Si	<ul style="list-style-type: none"> <li>Regulación. No. 18 / 2007. "Requerimientos para los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia"<sup>(51)</sup>.</li> <li>Regulación No. 48 / 2007. "Requerimientos para aplicar y/o diseñar un ensayo de disolución para capsulas y tabletas de liberación inmediata"<sup>(52)</sup>.</li> </ul>
Colombia	INVIMA	Si	<ul style="list-style-type: none"> <li>Resolución Número 1124 de 2016. Guía de Biodisponibilidad (BD) y Bioequivalencia (BE)<sup>(53)</sup>.</li> </ul>
El Salvador	DNM	Si	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reglamento Técnico Salvadoreño RTS 11.02.01:16 Productos Farmacéuticos. Medicamentos de uso humano. Bioequivalencia e intercambiabilidad<sup>(54)</sup>.</li> </ul>
Ecuador	ARCSA	Si	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reglamento Sustitutivo de registro sanitario para Medicamentos en general (Acuerdo No. 00000586)/Reform 2016<sup>(55)</sup></li> </ul>
República Dominicana	DIGEMAPS	No	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dec. No. 246-06 que establece el Reglamento que regula la fabricación, elaboración, control de calidad, suministro, circulación, distribución, comercialización, información, publicidad, importación, almacenamiento, dispensación, evaluación, registro y donación de los medicamentos<sup>(56)</sup>.</li> </ul>
Panamá	DNFD	Si	<ul style="list-style-type: none"> <li>Decreto de Bioequivalencia para consultar. "Regula lo relativo a la Equivalencia Terapéutica".2010<sup>(57)</sup>.</li> </ul>

Perú	DIGEMID	Si	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ley 1 de 10 de enero de 2001. "Sobre Medicamentos y otros Productos para la Salud Humana". (G.O. 24218 de 12 de enero de 2001)<sup>(58)</sup></li> <li>• Directiva Sanitaria No. -MINSA / DIGEMID.V.01. Directiva Sanitaria que Regula los Estudios de Equivalencia para Demostrar la Intercambiabilidad de Medicamentos<sup>(59)</sup></li> <li>• Resolución Ministerial 708/2015<sup>(60)</sup></li> </ul>
México	COFEPRIS	Si	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos a los que deben sujetarse los Terceros autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad<sup>(61)</sup>.</li> </ul>
Venezuela	INHRR	Si	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resolución No 212, por la cual se dictan las Normas Venezolanas de Biodisponibilidad y Bioequivalencia de Productos Farmacéuticos<sup>(62)</sup>.</li> </ul>
Argentina	ANMAT	Si	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disposición 758/2009: Criterios de Bioexención de Estudios de Bioequivalencia para medicamentos sólidos orales de liberación inmediata<sup>(63)</sup>.</li> <li>• Guía para la solicitud de Bioexenciones de Ingredientes Farmacéuticos Activos con Requerimiento de Bioequivalencia<sup>(64)</sup>.</li> </ul>

ANVISA: Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (Brazil); ISP: Instituto de Salud Pública (Chile); CECMED: Centro para el control estatal de medicamentos y dispositivos médicos (Cuba); INVIMA: Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Colombia); ARCSA: Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (Ecuador); DIGEMAPS: Dirección General de Medicamentos, Alimentos y Productos Sanitarios (Dominican Republic); DIGEMID: Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas (Perú); COFEPRIS: Comisión Federal para la Protección contra riesgos sanitarios (Mexico); ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Teconología (Argentina); DNM: Dirección Nacional de Medicamentos (El Salvador); INHRR: Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (Venezuela); DNFD: Dirección Nacional de Farmacia y Drogas (Panamá)

Cuba mantiene una regulatoria sobre bioequivalencia emitida en el año 2006, mediante la cual se reconocen los estudios de bioequivalencia *in vitro* según el SCB. Sin embargo, la regulatoria se encuentra desactualizada y no está en correspondencia con las recientes armonizaciones entre la FDA, OMS y EMA, considerando aún los fármacos Clase II del SCB como candidatos a bioexención. La regulatoria cubana vigente se muestra en la tabla 3, no obstante el CECMED se encuentra en un proceso de actualización de la regulatoria sobre bioequivalencia (comunicación personal).

## **1.6 Industria Farmacéutica Cubana de Genéricos**

La industria farmacéutica cubana tiene dentro de su misión la producción de medicamentos para el mejoramiento de la salud del pueblo y la generación de bienes exportables. Uno de sus principales programas es el desarrollo de medicamentos genéricos y productos farmacéuticos de avanzada.

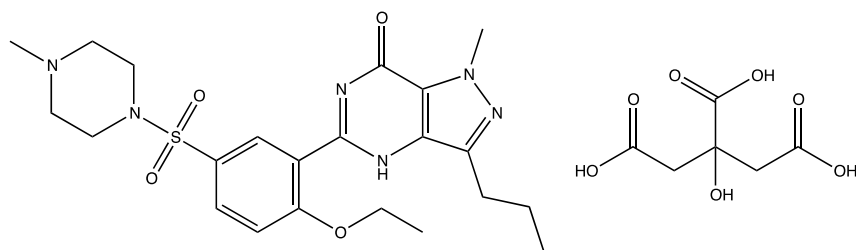
Más de la mitad de los medicamentos que conforman el Cuadro Básico de Medicamentos de Cuba (CBM) son genéricos nacionales, por lo cual el SCB debe considerarse por el Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED) como una valiosa herramienta para asegurar la seguridad y eficacia de los medicamentos producidos, además su utilización facilitaría la inclusión de medicamentos cubanos en el mercado internacional disminuyendo los costos y problemas éticos de los tradicionales estudios *in vivo*.

Los principales retos a los que se enfrenta la industria farmacéutica cubana en cuanto a la aplicación del SCB es la desactualización de la normativa nacional vigente, la ausencia de laboratorios o centros acreditados por el CECMED para la realización de estudios *in vitro*, así como la ausencia de una lista de medicamentos que de acuerdo a su clasificación puedan ser considerados para bioexención

## **1.7 Citrato de Sildenafil**

### *1.7.1 Características generales*

INN: Citrato de sildenafil. CAS: 171599-83-0. Su nombre químico es citrato de 1-[4-etoxi-3-(6,7-dihidro-1-metil-7-oxo-3-propil-1H-pirazol[4,3-d] pirimidin-5-il) fenilsulfonil]-4-metilpiperazina y su estructura se muestra en la figura 1. La fórmula química es  $C_{22}H_{30}N_6O_4S \cdot C_6H_8O_7$  y el peso molecular es de 666,703 g/mol.



**Figura 2.** Estructura química del citrato de sildenafil (ChemDraw Versión.12.03.1216 Cambridgsoft)

### 1.7.2 Indicaciones terapéuticas, dosis recomendada e índice terapéutico

El citrato de sildenafil es un fármaco utilizado para el tratamiento de la disfunción eréctil y la hipertensión arterial pulmonar. Este compuesto actúa mediante la inhibición de la fosfodiesterasa tipo 5 (PDE<sub>5</sub>) específica de GMP cíclico (GMP<sub>c</sub>), una enzima que promueve la degradación del GMP<sub>c</sub> y que regula el flujo de sangre en el pene.

La dosis oral máxima para el tratamiento de la disfunción eréctil es de 100 mg/d. En adultos mayores de 18 años, se recomienda iniciar con una dosis de 50 mg, 1 hora antes de comenzar la actividad sexual. Según la respuesta individual del paciente, la dosis puede ser aumentada a 100 mg o disminuida a 25 mg. La máxima frecuencia recomendada es de una dosis en 24 horas.

Para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar la dosis es de 60 mg/d (20 mg tres veces al día). En los pacientes con insuficiencia hepática la dosis inicial debe ser de 25 mg. En la hipertensión arterial pulmonar neonatal y niños de 1 mes hasta 18 años la dosis máxima es de 2 mg/Kg cada 6 horas.

Los eventos adversos más frecuentes observados durante el tratamiento con citrato de sildenafil son: epistaxis, cefalea, sofocos, dispepsia, insomnio, rinitis, sinusitis, diarrea, aumento de temperatura, mialgia, parestesia, priapismo, etc<sup>(65)</sup>.

De forma general el rango terapéutico del citrato de sildenafil es mayor que 2, lo que le da un margen de seguridad mayor.

### 1.7.3 Propiedades químico-físicas

El citrato de sildenafil es un sólido cristalino de color blanco, ligeramente higroscópico<sup>(66)</sup>. El compuesto es muy soluble en dimetilsulfóxido (DMSO),

dimetilformamida (DMF) y en disoluciones diluidas de ácidos minerales. Es moderadamente soluble en ácido acético, agua y etanol; ligeramente soluble en metanol; y casi insoluble en hexano y cloroformo. Se ha descrito en la literatura la presencia de tres polimorfos<sup>(67)</sup>.

La lipofilidad reportada del citrato de sildenafil en octanol/agua ( $\log P_{\text{sildenafil}}$ ), determinada por métodos potenciométricos, es de 3.18<sup>(68)</sup>. Otros autores describen el valor de  $\log P_{\text{sildenafil}} = 2,27^{(69)}$ ;  $2,7^{(18)}$  y  $0,78^{(67)}$ .

El coeficiente de distribución (Log D) del citrato de sildenafil a pH 3, 7 y 11 fueron de -0,52; 1,59 y 1,13 para las especies catiónicas, neutras y aniónicas, respectivamente. Los valores calculados de Log D utilizando ACD/Labs y bajo las mismas condiciones de pH anteriores, fueron de -0,52; 2,24 y 2,01, respectivamente<sup>(14)</sup>. Ambos resultados indican que la lipofilidad de las diferentes especies están en el siguiente orden: neutra > aniónica > catiónica, e inversamente proporcional a sus solubilidades. Por otro lado Walker y col. describen un valor experimental de Log  $D_{7,4}$  de  $2,7^{(15)}$ .

El citrato de sildenafil es un anfótero con valores de pKa = 6,78 (protonación de la amina terciaria) y 9,12 (desprotonación de la pirimidinona). El compuesto es básicamente neutro a pH fisiológico<sup>(68)</sup>.

#### *1.7.4 Comportamiento farmacocinético*

Luego de la administración oral, el citrato de sildenafil es rápidamente absorbido, alcanzando un pico de concentración plasmática alrededor de 1 hora (0,5-2 horas)<sup>(70)</sup>. El valor medio de biodisponibilidad absoluta está entre 38% y 41%<sup>(15,70)</sup>. Los estudios de absorción del citrato de sildenafil marcado con [<sup>14</sup>C] indican que el 92% de la dosis administrada es completamente absorbida, por lo que su baja biodisponibilidad no es debido a una absorción incompleta sino que es el resultado de un extensivo metabolismo de primer paso intestinal y hepático<sup>(70)</sup>.

Cuando el citrato de sildenafil es administrado con alimentos se reduce la velocidad de absorción con un retraso en el  $T_{\text{max}}$  de 60 minutos y una reducción de un 29% en el  $C_{\text{max}}$ .

Tanto el citrato de sildenafil como su principal metabolito (N-desmetil sildenafil) presentan una alta afinidad por las proteínas plasmáticas ( $\approx 96\%$ ), siendo el enlazamiento a proteínas independiente de la concentración del fármaco<sup>(70)</sup>. Luego de la administración intravenosa del citrato de sildenafil, el valor medio del volumen de distribución en el estado estacionario ( $V_{ss}$ ) es de 105 L, lo cual excede sustancialmente el volumen acuoso total del organismo ( $\approx 42$  L), indicando una amplia distribución a tejido y una posible unión a proteínas extravasculares<sup>(71)</sup>.

La semivida de eliminación ( $T_{1/2}$ ) del citrato de sildenafil es de 3-5 horas, independientemente de la vía de administración. El sildenafil presenta un amplio metabolismo, no detectándose en heces y orina la presencia de fármaco inalterado. Luego de la administración oral, entre el 73-88% de los metabolitos son excretados en heces fecales y entre un 6-15% en orina<sup>(72)</sup>.

El aclaramiento sistémico (CL) del citrato de sildenafil es de 41 L/h, lo que lo clasifica como un fármaco con una razón de extracción hepática intermedia (50%)<sup>(70)</sup>. El sildenafil es metabolizado principalmente por la isoenzima CYP3A4 del citocromo P<sub>450</sub>, y en menor extensión por la CYP2C9<sup>(70)</sup>. La farmacocinética del sildenafil citrato es lineal en el rango de dosis recomendado (25 a 100 mg)<sup>(72)</sup>.

#### *1.7.5 Comportamiento de la forma de dosificación*

Se han identificado en la literatura especializada muy pocos estudios que muestren resultados de bioequivalencia entre formulaciones de liberación inmediata de citrato de sildenafil.

La biodisponibilidad relativa entre comprimidos comerciales y genéricos de tabletas de 100 mg de citrato de sildenafil se evaluó en voluntarios mexicanos sanos, en ayunas y utilizando un diseño aleatorizado cruzado<sup>(69)</sup>. Para el citrato de sildenafil, en un intervalo de confianza del 90%, el logaritmo de  $C_{max}$ , el  $AUC_{0-24}$  y el  $AUC_{0-inf}$  fueron 86,5- 113,6%, 94,7- 108,8% y 94,9- 108,8%, respectivamente. Estos resultados sugieren que el genérico de sildenafil cumple con los criterios regulatorios para asumir que es bioequivalente con el de referencia.

Otro estudio de bioequivalencia de tabletas de sildenafil 20 mg se desarrolló en voluntarios masculinos Tailandeses<sup>(73)</sup>. El ensayo a dosis única, aleatorizado, abierto y cruzado se realizó en 32 voluntarios sanos en condiciones de ayuna. Los valores

de la media geométrica (90% IC) para la razón entre los parámetros  $AUC_{0-24}$ ,  $AUC_{0-inf}$  y  $C_{max}$  para el producto de ensayo sobre el de referencia fueron 101,0% (92,0-110,9%), 100,8% (92,1- 110,4%) and 100,9% (90,0-113,1%) para el sildenafil, respectivamente. Ambas formulaciones fueron bioequivalentes en términos de velocidad y magnitud de la absorción.

Otros estudios de bioequivalencia para formulaciones orodispersables o de disgregación bucal han sido descritos en la literatura<sup>(74-76)</sup>. En todos los casos las formulaciones de ensayo han sido bioequivalentes con las de referencia.

# *Materiales y Métodos*

## Capítulo 2- Materiales y Métodos

Toda la información relevante sobre la permeabilidad y la solubilidad del citrato de sildenafil fue recopilada de bases de datos electrónicas disponibles como PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), DrugBank (<https://www.drugbank.ca>), y Medline (<https://medlineplus.gov/spanish/encyclopedia.html>). Además se revisaron artículos científicos y otros documentos de referencia como la Farmacopea de los Estados Unidos<sup>(25)</sup>.

### 2.1 Compuesto de ensayo

El citrato de sildenafil (pureza > 99%) fue suministrado por los Laboratorios MEDSOL (Habana, Cuba). El resto de los reactivos utilizados durante el estudio fueron de grado analítico. Los reactivos fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Barcelona, España).

### 2.2 Procedimientos normalizados de operación utilizados en los ensayos de solubilidad y permeabilidad

En la tabla 4 se muestra una relación de los procedimientos normalizados de operación (PNO) utilizados para el estudio de solubilidad y permeabilidad del citrato de sildenafil. Todos los procedimientos fueron aprobados con antelación por el Departamento de Aseguramiento de la Calidad del Centro de Bioactivos Químico.

**Tabla 4.** Relación de Procedimientos Normalizado de Operación (PNO) utilizados en los ensayos de solubilidad y permeabilidad intestinal.

Código	Título
PNO: I.G.001	PNO. Metodología para la confección de los protocolos de investigación.
PNO:I.12.001	PNO. Limpieza, desinfección y esterilización del material quirúrgico y cristalería.
PNO: I.12.002	PNO. Recepción, identificación y almacenamiento de muestras para estudios de Bioequivalencia.
PNO: I.12.005	PNO. Manipulación de la rata.
PNO: I.12.006	PNO. Pesaje de rata en el laboratorio.

PNO: I.12.007	PNO. Eutanasia en rata.
PNO: I.12.008	PNO. Administración intraperitoneal en rata.
PNO: I.12.010	PNO. Traslado y recepción de animales (ratas).
PNO: R.01.005	PNO. Manejo y eliminación de desechos en la Unidad de Modelación y Experimentación y Biofarmacéutica.
PNO: I.12.T01	PNO. Permeabilidad <i>in situ</i> en ratas Sprague Dawley (método de perfusión en lazo cerrado)
PNO: I.12.T03	PNO. Ensayos de solubilidad por el método de Shake Flask o método de agitación hasta saturación en matraces.
FCE.I.04.001	PNO. Funcionamiento y cuidado de Agitador Vortex.
FCE.I.04.008	PNO. Funcionamiento y cuidado del Baño de María.
FCE.I.04.009	PNO. Funcionamiento y cuidado del Bidestilador de agua.
FCE.I.04.010	PNO. Funcionamiento y cuidado del Espectrofotómetro UV-Vis.
FCE.I.04.011	PNO. Funcionamiento y cuidado del Baño de Agua Termostatizado.
FCE.I.04.013	PNO. Funcionamiento y cuidado de la Balanza de Plato.
FCE.F.02.017	PNO. Funcionamiento y cuidado de la Balanza Microanalítica.
FCE.I.04.016	PNO. Funcionamiento y cuidado de la Centrífuga.
FCE.I.04.026	PNO. Funcionamiento y cuidado del pH-metro.
FCE.I.04.028	PNO. Funcionamiento y cuidado de las micropipetas.

### 2.3 Determinación experimental de la solubilidad

Para complementar la información de solubilidad publicada en la literatura sobre el citrato de sildenafil, se realizó la determinación experimental de la solubilidad en un rango de pH entre 1,2 y 6,8, de acuerdo a lo establecido en las normativas de la OMS<sup>(7)</sup>. Las mediciones se desarrollaron según el método de saturación de matraces (*Shake Flask*) propuesto por Baka y col.<sup>(26)</sup> y siguiendo las recomendaciones de Avdeef y col.<sup>(77)</sup> para optimizar las mediciones de solubilidad.

### 2.3.1 Preparación de las soluciones buffer

Los medios de disolución fueron preparados siguiendo las instrucciones de la Farmacopea de los Estados Unidos USP XXXVIII<sup>(25)</sup>. Las cantidades de reactivos fueron recalculadas según los volúmenes utilizados en el estudio.

#### Solución amortiguadora pH=1,2 (Volumen = 100 mL)

Se colocaron 25 mL de solución de cloruro de potasio (KCl) 0,2 M en un matraz volumétrico de 100 mL, se agregaron 42,5 mL de solución de ácido clorhídrico (HCl) 0,2 M y se completó el volumen con agua destilada.

*Solución de cloruro de potasio (KCl) 0,2 M:* Se pesaron 1,491 g de cloruro de potasio, se adicionaron a un matraz de 100 mL y se completó el volumen con agua destilada.

*Solución de ácido clorhídrico (HCl) 0,2 M:* Se tomaron 1,64  $\mu$ L de ácido clorhídrico al 37%, se añadió a un matraz de 100 mL y se completó el volumen con agua destilada.

#### Solución amortiguadora pH=4,5 (Volumen = 100 mL)

Se colocaron 0,299 g de acetato de sodio trihidratado ( $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) en un volumétrico de 100 mL, se agregaron 1,4  $\mu$ L de solución de ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 2N y se completó el volumen con agua destilada.

*Solución de ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 2N:* Se tomaron 2,891  $\mu$ L de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  al 99 %, se añadió a un matraz de 25 mL y se completó el volumen con agua destilada.

#### Solución amortiguadora pH=6,8 (Volumen = 100 mL)

Se colocaron 25 mL de solución de fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,2 M en un volumétrico de 100 mL, se agregaron 11,2 mL de solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0,2 M y se completó el volumen con agua destilada.

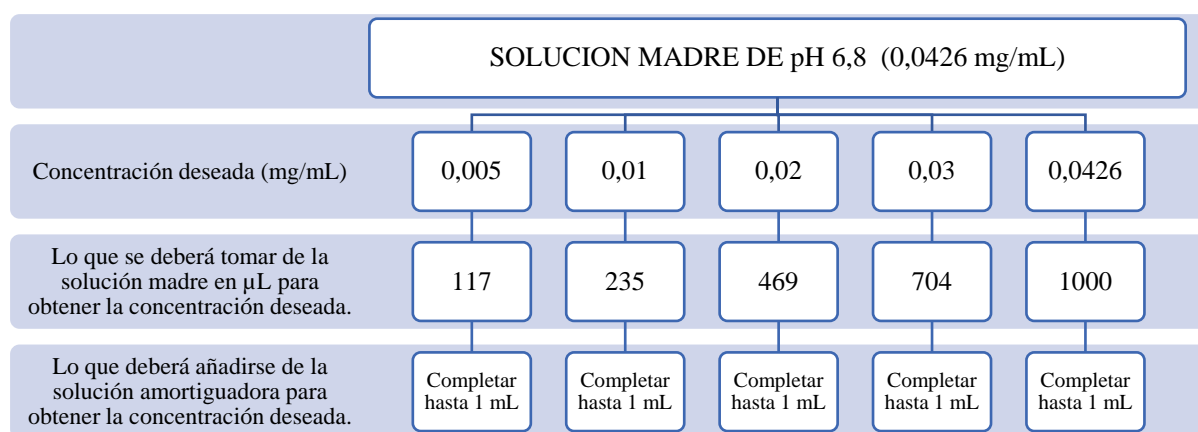
*Solución de fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,2 M:* Se pesaron 2,722 g de fosfato monobásico de potasio, se adicionaron a un matraz de 100 mL y se completó el volumen con agua destilada.

*Solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0,2 M:* Se pesaron 0,8 g de hidróxido de sodio, se adicionaron a un matraz de 100 mL y se completó volumen con agua destilada.

### 2.3.2 Preparación de las curvas de calibración

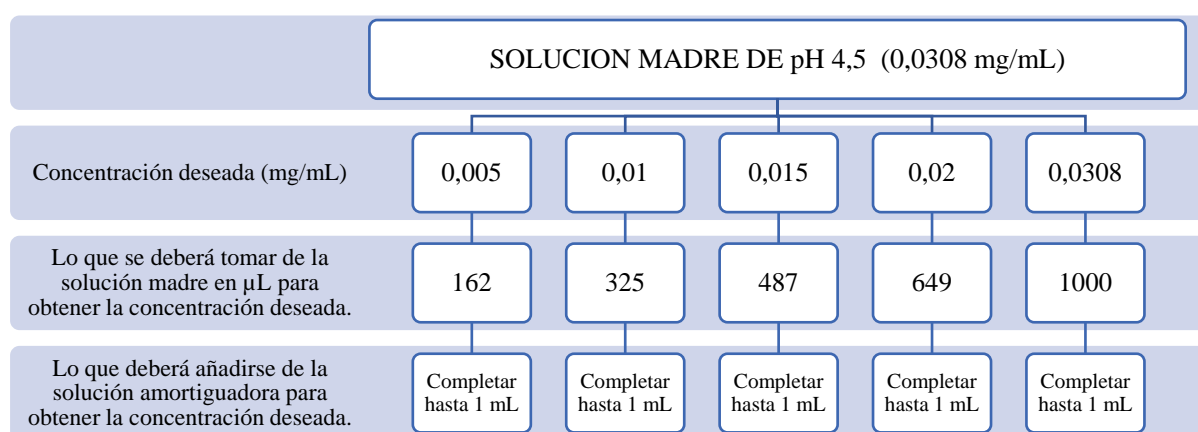
Para realizar la curva de calibración a pH 6,8, se pesaron 2,13 mg de citrato de sildenafil, luego se adicionó la solución amortiguadora de pH 6,8 hasta completar un volumen de 50 mL y obtener una concentración final de 0,0426 mg/mL. A partir de esta solución se prepararon 5 concentraciones para conformar la curva de calibración. El procedimiento que se siguió se muestra la figura 3.

**Figura 3.** Procedimiento de preparación de la curva de calibración a pH 6,8.



Para la curva de calibración a pH 4,5, se pesaron 1,54 mg de citrato de sildenafil, se adicionó la solución amortiguadora de pH 4,5 hasta completar 50 mL y obtener una concentración final de 0,0308 mg/mL. De esta solución se prepararon 5 concentraciones para conformar la curva de calibración. El procedimiento que se siguió se muestra en la figura 4.

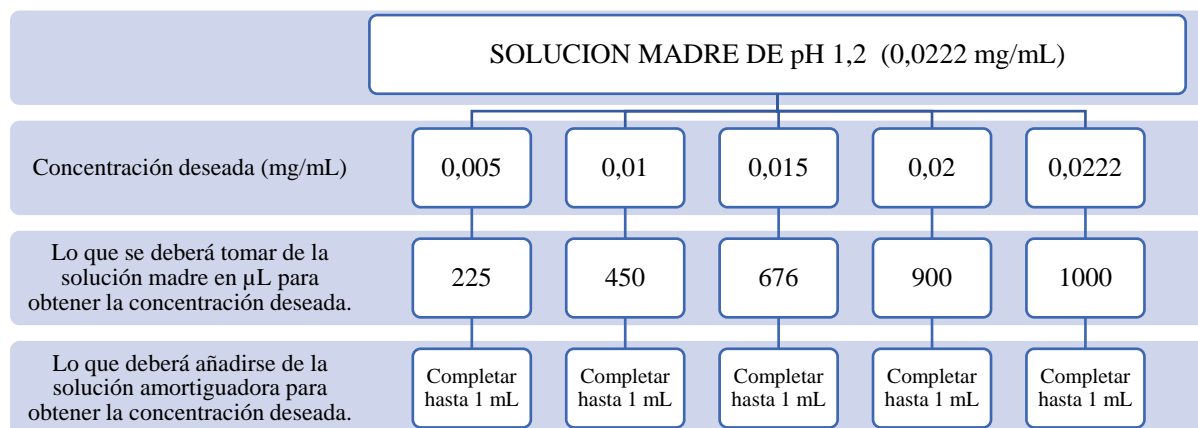
**Figura 4.** Procedimiento de preparación de la curva de calibración a pH 4,5.



Finalmente, para realizar la curva de calibración a pH 1,2, se pesaron 1,11 mg de citrato de sildenafil, luego se adicionó solución amortiguadora de pH 1.2 hasta

completar 50 mL y obtener una concentración final de 0,0222 mg/mL. De esta solución se prepararon 5 concentraciones para conformar la curva de calibración. El procedimiento que se siguió se muestra en la figura 5.

**Figura 5.** Procedimiento de preparación de la curva de calibración a pH 1,2.



La cuantificación se realizó por espectrofotometría UV-VIS a 292 nm.

### 2.3.3 Medición de la solubilidad por el método de frasco de agitación

Un exceso de citrato de sildenafil fue adicionado en 3 mL de cada solución buffer (pH 1,2–6,8). La suspensión fue agitada por 6 horas a 300 rpm a  $37\pm 1$  °C (Baño Termostatizado Julabo con unidad MIXControl, Alemania). Posteriormente las muestras fueron mantenidas a  $37\pm 1$  °C sin agitación durante 18 horas para lograr la sedimentación.

Se extrajeron alícuotas de 1,5 mL del sobrenadante y se centrifugaron durante 10 min a 2000 rpm (Centrífuga Eppendorf AG 5430, Alemania). Todas las mediciones de solubilidad se realizaron por triplicado. Para determinar la solubilidad del citrato de sildenafil, se analizaron las muestras a la longitud de onda máxima del fármaco ( $\lambda_{\text{máx}} = 292$  nm), utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo-Fisher Genesys 10S, China). Antes de la lectura las muestras se diluyeron en dependencia de su solubilidad en cada buffer. Los valores de absorbancia fueron interpolados en la curva de calibración.

### 2.3.4 Determinación de la solubilidad intrínseca con el programa pDISOL-X<sup>TM</sup>

El pDISOL-X<sup>TM</sup> es un programa para el análisis de la disolución en función del pH, peso del sólido, solubilidad, constantes de ionización, condiciones de agitación,

capacidad tampón, etc., mediante la simulación de gradientes de concentración de micro-especies en la capa límite acuosa.

Inicialmente se utilizan los datos experimentales de los perfiles de logS-pH como datos de entrada del programa. El algoritmo del programa considera las contribuciones de todas las especies presentes en la solución, incluyendo los componentes del buffer. El enfoque no depende de ninguna extensión explícitamente derivada de las ecuaciones de Henderson-Hasselbalch. El algoritmo computacional deriva internamente sus propias ecuaciones implícitas, que son posteriormente refinadas por regresión no lineal de mínimos cuadrados <sup>(78)</sup>.

El programa asume una condición inicial de una suspensión del fármaco sólido en una solución que a menudo contiene un electrolito de fondo, por ejemplo, 0,15 M NaCl, idealmente con la suspensión saturada sobre un amplio rango de pH. El programa calcula la distribución de las especies correspondientes a una secuencia de adiciones de ácido fuerte HCl (o de ácido débil H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ácido acético, etc.) para simular la especiación de la suspensión hasta pH ~ 0. Luego se simula una secuencia de perturbaciones con NaOH (o KOH), y se calcula la solubilidad en cada punto, hasta que se alcanza pH ~ 13. La fuerza iónica se calcula en cada paso y se ajustan los valores de pKa <sup>(78)</sup>.

Al final de la simulación, se compara la curva logS vs. pH calculada con la medida real logS vs. pH. Luego se realiza un procedimiento por mínimos cuadrados no lineales, ponderados con logS, para refinar el modelo de equilibrio propuesto. El proceso se repite hasta que las diferencias entre los valores logS calculados y medidos alcancen un mínimo. La calidad general del refinamiento se evalúa mediante la "bondad de ajuste" (GOF) <sup>(78)</sup>.

#### **2.4 Determinación experimental de la permeabilidad intestinal**

El ensayo de determinación de la permeabilidad, mediante perfusión intestinal *in situ* en ratas, fue aprobado por el comité de ética del Centro de Bioactivos Químicos, cumpliendo las regulatorias nacionales e internacionales para el uso de animales de laboratorio. Para el ensayo de permeabilidad se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley con un peso entre 250 y 295 g. Los animales fueron suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba).

Las ratas fueron mantenidas en jaulas estándar, con ciclos luz-oscuridad de 12 horas. Los animales se alimentaron diariamente con comida estándar y agua *ad libitum*. Antes de cada experimento, los animales se mantuvieron en ayuna durante 20 horas y se garantizó el suministro de agua para mantener la hidratación.

#### 2.4.1 Preparación de las soluciones de lavado

Se prepararon dos soluciones de lavado, una para la limpieza del tracto intestinal (A) y otra para ajustar el pH intestinal (B).

##### Solución de Lavado A

NaCl.....9,0 g  
KCl.....0,34 g  
CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O.....0,19 g  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O.....0,76 g  
H<sub>2</sub>O bidestilada.....c.s.p 1L

##### Solución de Lavado B

NaCl.....9,0 g  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O.....0,041 g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....0,058 g  
H<sub>2</sub>O bidestilada.....c.s.p. 1L

Las disoluciones se almacenaron en refrigeración.

#### 2.4.2 Determinación experimental de la permeabilidad por el método de perfusión *in situ*

El método de perfusión *in situ* en lazo cerrado, basado en el método de Doluisio, se realizó de acuerdo a lo referenciado en la literatura<sup>(42)</sup>. Las ratas fueron anestesiadas con una inyección de uretano al 25% (1,4 g/kg). Posteriormente se realizó una incisión abdominal, y una vez localizado el intestino delgado, se ligó el conducto biliar evitando la circulación entero-hepática. Cada extremo del intestino delgado (duodeno e íleon) fue canulado. La cánula se conectó a una jeringa con una llave de tres pasos para controlar la entrada de solución en el intestino. Posteriormente, el contenido intestinal se eliminó mediante lavado con soluciones fisiológicas y el intestino fue colocado nuevamente en la cavidad peritoneal y cubierto con una

almohadilla de algodón para mantener la hidratación y evitar la pérdida de calor corporal<sup>(79,80)</sup>.

Una disolución de citrato de sildenafil (0,2 mg/mL) en buffer fosfato fue perfundido por la jeringa proximal, y a los 5 minutos la muestra fue recogida por la jeringa distal (400 µL). Este procedimiento se llevó a cabo alternativamente durante 30 minutos<sup>(81,82)</sup>. El perfusato fue inmediatamente analizado a la longitud de onda máxima para el citrato de sildenafil ( $\lambda_{\text{máx}} = 292 \text{ nm}$ ), utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo-Fisher Genesys 10S, China). Teniendo en cuenta que la reabsorción de agua puede ser significativa, al final del experimento se colectó el volumen remanente en el intestino y se determinó la constante de reabsorción de agua  $k_0$ <sup>(83)</sup>. La concentración del fármaco en cada muestra se corrigió según la siguiente ecuación:

$$C = C_e \left( \frac{V_T}{V_0} \right)$$

Donde C es la concentración real en el tiempo,  $C_e$  es la concentración experimental obtenida en cada tiempo,  $V_0$  es el volumen inicial y  $V_t$  es el volumen en cada tiempo de toma de muestra. El coeficiente de absorción ( $k_{ap}$ ) en el tiempo inicial fue obtenido por regresión lineal mediante la siguiente ecuación:

$$C_t = C_0 \cdot e^{-k_{at}}$$

El coeficiente de absorción fue transformado en valores de permeabilidad según la siguiente ecuación:

$$P_{app} = r \cdot \frac{k_{ap}}{2}$$

Donde r es el radio intestinal perfundido, calculado por la relación área/volumen administrado, considerando un volumen de 10 mL y las mediciones de cada animal. Se realizaron 6 réplicas del experimento.

## 2.5 Clasificación biofarmacéutica provisional del citrato de sildenafil

Para clasificar el citrato de sildenafil, según el SCB, se siguió la clasificación de compuestos "altamente permeables" y "altamente solubles" establecida por la directriz de la OMS<sup>(7)</sup>.

Una vez determinada la solubilidad experimental del citrato de sildenafil en soluciones buffers a pH 1,2; 4,5 y 6,8, se calculó la relación dosis/solubilidad (D/S)

de la dosis máxima que se reporta en la literatura para el citrato de sildenafil (100 mg). Si el volumen requerido para disolver la mayor dosis es menor o igual a 250 mL, entonces el compuesto se clasifica como "altamente soluble".

En el caso de la permeabilidad, la OMS considera un fármaco altamente permeable cuando la magnitud de la absorción en humanos es de al menos el 85%<sup>(7)</sup>. Teniendo en cuenta este criterio, se clasificó la permeabilidad del citrato de sildenafil.

# *Resultados y Discusión*

## Capítulo 3- Resultados y Discusión

### 3.1 Solubilidad del Citrato de Sildenafil

En la tabla 5 se muestra un resumen de los datos de solubilidad (mg/mL) publicados en la literatura para el citrato de sildenafil.

**Tabla 5.** Solubilidad (mg/mL) descrita en la literatura para el citrato de sildenafil y su correspondiente relación dosis/solubilidad (D/S) (mL) para las tres dosis del fármaco

Medio (pH)	Solubilidad (mg/mL)			D/S <sup>a</sup> (mL)		
	25°C	30°C	37°C	25 mg	50 mg <sup>b</sup>	100 mg <sup>c</sup>
Agua <sup>(18)</sup>	3,5					
HCl 1M <sup>(18)</sup>	5,8					
NaOH 1M <sup>(18)</sup>	42,3					
Agua <sup>(14)</sup>						
pH=3			6,9	3,6	7,2	14,4
pH=4			7,1	3,5	7,1	14,2
pH=5			2,1	12,1	24,2	48,4
pH=6			0,1	227,3	454,6	909,1
pH=7			0,02	1250,0	2500,0	5000,0
pH=8			0,03	833,3	1666,7	3333,3
pH=9			0,04	625,0	1250,0	2500,0
pH=10			0,1	250,0	500,0	1000,0
pH=11			0,3	78,1	156,2	312,5
Buffer Citrato <sup>(67)</sup>						
pH=2,3		2,8		8,8	17,7	35,3
pH=3,2		0,9		26,9	53,8	107,5
pH=3,8		0,8		32,5	64,9	129,9
pH=4,3		2,9		8,6	17,2	34,5
pH=4,7		2,4		10,3	20,7	41,3
pH=5,1		0,6		39,1	78,1	156,2
pH=5,6		0,2		125	250	500
pH=6,1		0,07		357,1	714,3	1428,6
pH=7,3		0,02		1388,9	2777,8	5555,6
pH=8,8		0,02		1388,9	2777,8	5555,6

<sup>a</sup>Calculada a partir de los datos de solubilidad a 30°C y 37°C, el límite crítico es de 250 mL; <sup>b</sup>Dosis máxima de acuerdo con la Lista de Medicamentos Esenciales de la OMS; <sup>c</sup>Máxima dosis registrada por otras agencias. Los números en cursiva no cumplen con la relación dosis/solubilidad para la bioexención.

Para clasificar un principio activo bajo los requerimientos del SCB es necesario conocer la solubilidad del fármaco en 250 mL de solución a tres valores de pH (1,2;

4,5 y 6,8) y a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}^{(7)}$ . Como se muestra en la tabla 5 no se encuentran descritos en la literatura los valores de solubilidad del citrato de sildenafil bajo estas condiciones, por lo que se requiere su determinación experimental.

### 3.2 Determinación experimental de la solubilidad

#### 3.2.1 Curvas de calibración

Se validaron las concentraciones obtenidas durante el proceso de valoración de las muestras de los perfiles solubilidad-pH. Para ello se estudió la linealidad de las curvas de calibración utilizadas para valorar las muestras a los pH 1,2; 4,5 y 6,8. En la tabla 6 se pueden observar el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de las curvas de calibración, que siempre fue superior a 0,99. En la misma tabla se detallan los errores estándar (EE) de la ordenada en el origen y de la pendiente.

**Tabla 6.** Ensayo de linealidad de las curvas de calibración empleados para la valoración de las muestras de solubilidad-pH del citrato de sildenafil

pH	Ordenada en el origen	EE	Pendiente	EE	$r^2$
1,2	-0,0104	$1,3 \times 10^{-4}$	31,832	$3,81 \times 10^{-2}$	0,997
4,5	0,0374	$6,3 \times 10^{-4}$	14,524	$3,61 \times 10^{-2}$	0,997
6,8	-0,0075	$6,6 \times 10^{-5}$	6,869	$1,8 \times 10^{-3}$	0,998

#### 3.2.2 Resultados del ensayo experimental de la solubilidad por el método de frasco de agitación

Los resultados de solubilidad obtenidos, así como la relación dosis/solubilidad encontrada para las tres dosis comerciales del citrato de sildenafil se muestran en la tabla 7.

**Tabla 7.** Solubilidad experimental (mg/mL) del citrato de sildenafil y su correspondiente relación dosis/solubilidad (D/S) (mL) para las tres dosis referidas.

Medio (pH)	Solubilidad (mg/mL)		D/S <sup>a</sup> (mL)		Criterio de Aceptación (D/S ≤ 250 mL) para fármacos de “Alta Solubilidad” (Si/No)
	37°C	25 mg	50 mg <sup>b</sup>	100 mg <sup>c</sup>	
Buffer (pH=1,2)	10,6	2,4	4,7	9,4	Si
Buffer (pH=4,5)	3,9	6,4	12,9	25,8	Si
Buffer (pH=6,8)	0,05	<i>543,5</i>	<i>1086,9</i>	<i>2173,9</i>	No

<sup>a</sup>Calculado para los valores de solubilidad a 37°C, el valor límite es 250 mL; <sup>b</sup>Dosis máxima de acuerdo a la Lista de Medicamentos Esenciales de la OMS; <sup>c</sup>Máxima dosis reportada por otras agencias. Los números en *itálica* no cumplen con la relación dosis/solubilidad para bioexención.

Basados en los resultados de solubilidad obtenidos es posible calcular la relación D/S, que representa el volumen de medio necesario para solubilizar la mayor dosis administrada de un IFA.

Se pueden encontrar diferencias en relación con las dosis del medicamento, dependiendo del país y de los protocolos adoptados, las cuales pueden determinar la variabilidad en la clasificación biofarmacéutica de un compuesto. Por ejemplo, teniendo en cuenta la dosis de un medicamento, el mismo principio activo puede considerarse como de alta solubilidad en un país y de baja solubilidad en otro país<sup>(42)</sup>.

Según la monografía del citrato de sildenafil, las dosis descritas para las formas sólidas orales (comprimidos) del producto son 25, 50 y 100 mg<sup>(18)</sup>. Aunque la dosis normal de citrato de sildenafil es de 50 mg, se puede utilizar una dosis única más elevada de 100 mg, por lo que se necesita conocer si esa dosis es muy soluble en medio acuoso y bajo las condiciones establecidas por la OMS para bioexención.

Para el citrato de sildenafil la relación D/S, basada en la dosis más alta (100 mg), es superior a 250 mL en solución acuosa a pH 6 (ver tabla 5), lo mismo sucede en buffer citrato pH 5,65. Sin embargo, esta relación no ha sido claramente descrita en

la literatura, por lo que no se puede asegurar, sólo con los datos publicados, la baja solubilidad del producto según el SCB<sup>(10)</sup>.

De acuerdo con la tabla 5 a una dosis de 25 mg de citrato de sildenafil, la relación D/S es inferior a 250 mL para soluciones acuosas de hasta pH 6; sin embargo, para dosis mayores (50 y 100 mg) esta relación se cumple hasta valores de pH 5. Estos valores no cumplen con los requisitos de la OMS para un medicamento con alta solubilidad; no obstante, la prueba no se realizó en las soluciones buffers establecidas según Farmacopea o en el rango de pH recomendado.

Un comportamiento similar se observa en buffer citrato, donde a partir de un valor de pH de 5,65, el compuesto no tiene una alta solubilidad. Estos resultados son contradictorios con otros descritos en la literatura y que se han utilizado para clasificar el citrato de sildenafil según el SCB<sup>(18)</sup>.

Los resultados experimentales encontrados en este estudio (tabla 7) indican inequívocamente que el citrato de sildenafil no presenta una alta solubilidad (Clase II/IV SCB) debido a que a las tres dosis del producto sus relaciones D/S son superiores a 250 mL a valores de pH de 6,8.

### *3.2.3 Resultados de la determinación de la solubilidad intrínseca con el programa pDISOL-X<sup>TM</sup>*

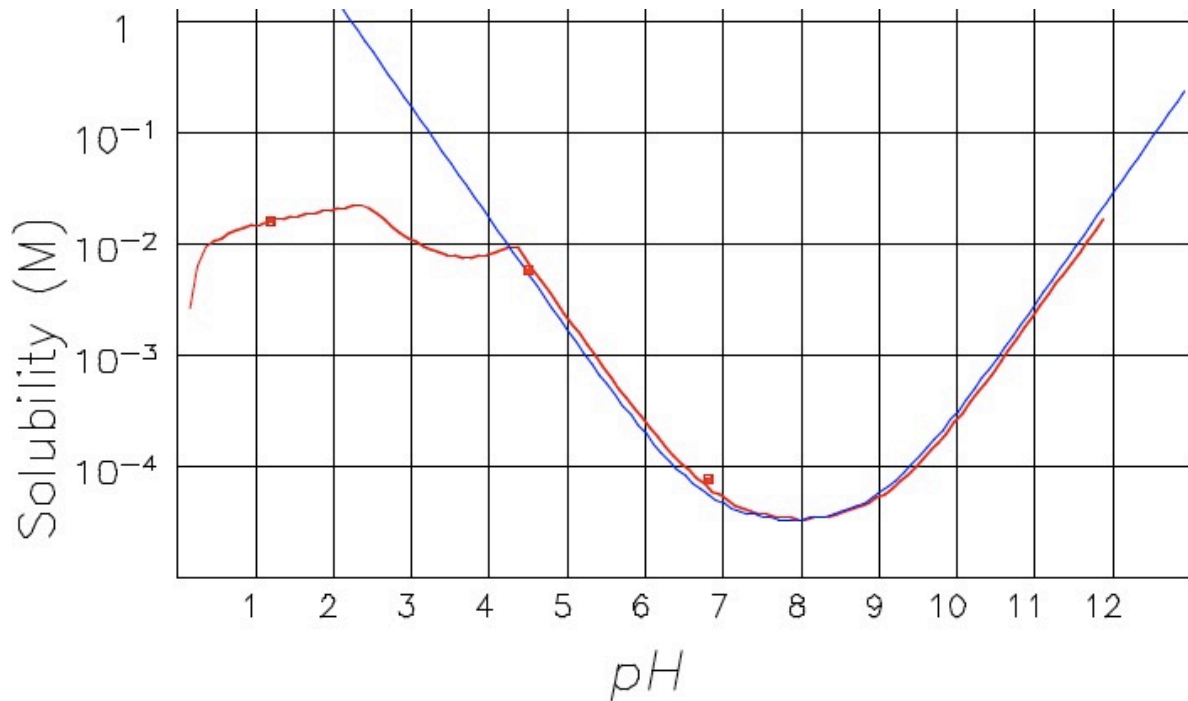
La figura 6 muestra el perfil logS vs. pH del citrato de sildenafil. La línea en azul se calculó con la ecuación de Henderson-Hasselbalch, mientras que la línea en rojo se determinó sobre la base del modelo de equilibrio más consistente con las mediciones reales de logS en los distintos pH.

Para valores de  $\text{pH} > \text{pKa}^{\text{GIBBS}}$ , (4,37) el precipitado es el anfolito no cargado que muestra la forma parabólica característica. Para un  $\text{pH} > 4,5$ , la curva logS-pH muestra un perfil similar comparado con el que se predeciría a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbalch (HH). La solubilidad intrínseca (unidades molares) se refinó como  $S_0 = 18,8 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$ .

A valores de  $\text{pH} < \text{pKa}^{\text{GIBBS}}$ , la curva logS-pH no sigue el comportamiento establecido por la ecuación de HH y esto se debe a que como hay un exceso de fármaco añadido el valor de  $K_s$  (constante de solubilidad) de la sal (clorhidrato de

sildenafil) es excedido y hace que dos sólidos co-precipiten, el compuesto original (XHs) y su sal ( $\text{XH}_2^+\text{Cl}^-$ ).

La calidad del ajuste entre los datos simulados y experimentales de la curva logS-pH es adecuado, con valores de GOF de 0,7.



**Figura 6.** Perfil solubilidad-pH del citrato de sildenafil

### 3.3. Determinación experimental de la permeabilidad intestinal

Los valores de permeabilidad reportados en la literatura para el citrato de sildenafil por métodos *in silico*, *in vitro*, *in situ* e *in vivo* son mostrados en la tabla 8. Para el citrato de sildenafil, los valores de perfusión intestinal en humanos no son descritos en la literatura, sin embargo, estudios farmacocinéticos con productos marcados permitió caracterizar la fracción absorbida del citrato de sildenafil como 92%, lo cual sugiere una alta permeabilidad<sup>(15)</sup>.

Kasim y colab.<sup>(1)</sup> realizaron una clasificación de la permeabilidad de los fármacos de acuerdo a su coeficiente de distribución utilizando el metoprolol como compuesto de referencia debido a que se conoce que este tiene una fracción oral absorbida elevada 95% ( $\text{LogP}_{\text{metoprolol}} = 1,72$ ). De acuerdo a esta clasificación el citrato de sildenafil fue clasificado como un IFA de alta permeabilidad.

Dentro de los métodos *in vitro*, los estudios en células de adenocarcinoma de colon humano, Caco-2<sup>(84)</sup> y células de riñón de perro (MDCK)<sup>(36)</sup> han sido los más utilizados para evaluar la permeabilidad y predecir la absorción de los candidatos a fármacos. Estos métodos han mostrado buena correlación con los valores de permeabilidad obtenidos mediante métodos *in vivo*<sup>(32)</sup>.

La tabla 8 muestra una extensiva revisión de la literatura sobre los valores de permeabilidad en células Caco 2 descritos para el citrato de sildenafil. Con el objetivo de obtener una mejor armonización de los datos y tomando un valor promedio, se utilizaron solamente los valores experimentales que se encontraban dentro del intervalo [Promedio  $\pm$  2 x Desviación Estándar (DE)]. En algunos casos el promedio y la media de los valores fueron comparados tomando en consideración la distribución de los datos. Finalmente, la permeabilidad en células Caco 2 para el citrato de sildenafil fue de  $32,6 \times 10^{-6}$  cm/s, lo cual se corresponde a una completa absorción oral del fármaco cuando se compara con el valor de permeabilidad del metoprolol. Los valores de permeabilidad en células MDCK para este compuesto muestran un comportamiento similar a los obtenidos mediante ensayos en células Caco 2.

**Tabla 8.** Valores de permeabilidad reportados en la literatura para el citrato de sildenafil y el compuesto de referencia metoprolol

Compuesto	<i>In silico</i>		<i>In vitro</i> ( $\times 10^{-6}$ cm/s)			<i>In situ</i> ( $\times 10^{-6}$ cm/s)	<i>In vivo</i> ( $\times 10^{-4}$ cm/s)	F <sub>abs</sub> (%) <sup>h</sup>
	LogP	CLogP	Caco-2 <sup>a</sup>	MDCK <sup>d</sup>	PAMPA <sup>e</sup>	Perfusión ratas <sup>f</sup>	Perfusión humanos <sup>g</sup>	
Citrato de Sildenafil	2,35	1,72	27,4 <sup>(15)</sup> 25,6 <sup>(85)</sup> 48,0 <sup>(86)</sup> 32,6 <sup>b</sup>	26 <sup>(85)</sup>	0,02 (pH=3) <sup>(14)</sup> 17,5 (pH=8)	ND	ND	92 <sup>(15)</sup>
Metoprolol	1,72	1,35	20 <sup>c</sup>	19 <sup>(87)</sup>	3,5 (pH=5-7) <sup>(88)</sup>	20 <sup>(89)</sup>	1,34 <sup>(39)</sup>	95 <sup>(90)</sup>

<sup>a</sup>Valores de permeabilidad (apical-basolateral) en células Caco-2; <sup>b</sup>Valores de permeabilidad promedio en Caco-2 del citrato de sildenafil tomados de varias referencias bibliográficas; <sup>c</sup>Permeabilidad en Caco-2 del metoprolol, tomado de más de 15 referencias en la literatura; <sup>d</sup>Permeabilidad (apical-basolateral) en células MDCK; <sup>e</sup>Permeabilidad en membranas paralelas artificiales (PAMPA); <sup>f</sup>Permeabilidad en modelos de perfusión *in situ* en segmentos intestinales de rata; <sup>g</sup>Permeabilidad en modelos de perfusión en humanos; <sup>h</sup>Fracción absorbida en humanos; ND: no disponible.

El ensayo de permeabilidad en membranas artificiales (PAMPA) es un método *in vitro*, ampliamente utilizado por las empresas farmacéuticas que permite evaluar rápidamente la permeabilidad transcelular. Wang y col.<sup>(32)</sup> estudiaron la permeabilidad del citrato de sildenafil a través de membranas artificiales (MultiScreen Filter Plate Assembly), un método muy similar a PAMPA, y se obtuvieron valores de permeabilidad a pH 8 de  $17,5 \times 10^{-6}$  cm/s. Estos resultados son mucho más altos que los del metoprolol en el ensayo PAMPA, lo cual sugiere una alta permeabilidad intestinal para el citrato de sildenafil.

Aunque las autoridades regulatorias no permiten la estimación de la permeabilidad basado en parámetros fisicoquímicos, los valores de logP y ClogP están en correspondencia con los resultados alcanzados con las metodologías experimentales y apoyan la alta permeabilidad del citrato del sildenafil.

Los métodos antes mencionados coinciden en que el citrato de sildenafil es un compuesto de alta permeabilidad. Sin embargo, como se muestra en la tabla 2, no se reportan en la literatura estudios *in situ* e *in vivo* de determinación de la permeabilidad intestinal del citrato de sildenafil, por lo que los datos reportados no permiten clasificar de manera concluyente la permeabilidad del compuesto. Por esta razón se realizó la determinación de la permeabilidad mediante métodos *in situ*.

Los resultados alcanzados se muestran en la tabla 9. El valor de permeabilidad obtenido, utilizando la técnica de perfusión *in situ*, es superior al del metoprolol, lo que indica que el citrato de sildenafil es un fármaco de alta permeabilidad (Clase I/II BCS).

**Tabla 9.** Permeabilidad del citrato de sildenafil mediante perfusión intestinal *in situ* en rata

Método	Permeabilidad ( $\times 10^{-6}$ cm/s)	Criterio de Aceptación ( $\times 10^{-6}$ cm/s)	Clasificación
Perfusión intestinal en rata	$P_{eff} = 18,4 \pm 7$	$P_{eff} \geq 20 \pm 4^{(91)}$	Alta

### 3.4 Clasificación biofarmacéutica provisional del citrato de sildenafil

Se ha descrito ampliamente en la literatura diferentes clasificaciones del citrato de sildenafil según el SCB. Varios autores han clasificado provisionalmente las formas

sólidas de liberación inmediata que aparecen en la lista de medicamentos esenciales de la OMS<sup>(1,23,92)</sup>. En el caso de Kasim y Takagi<sup>(1)</sup> la clasificación se basó en la solubilidad acuosa (a través del número de dosis,  $D_o$ ) disponible en la literatura y una correlación de la permeabilidad en membranas intestinales humanas, para un grupo de 29 fármacos de referencia, con sus coeficientes de partición calculados ( $\log P$  y  $C\log P$ ). De acuerdo a este tipo de clasificación el citrato de sildenafil es un fármaco Clase I/III.

Pham-The y col.<sup>(9)</sup> desarrollaron una clasificación biofarmacéutica provisional para un grupo de fármacos y compuestos similares a fármacos, basado en datos de solubilidad (número de dosis,  $D_o$ ) y la permeabilidad medida en células Caco-2. A su vez, desarrollaron modelos *in silico* para ambas propiedades, los cuales permitieron asignar una clasificación provisional a nuevas entidades moleculares. El citrato de sildenafil fue clasificado como Clase I del SCB.

Wu y Benet<sup>(17)</sup> clasificaron el citrato de sildenafil como Clase I en su sistema de clasificación biofarmacéutica de disposición de fármaco (BDDCS). Este sistema utiliza las características de disposición (metabolismo y excreción) del ingrediente farmacéutico activo como un estimado de su permeabilidad gastrointestinal.

Dahan y col.<sup>(93)</sup> desarrollaron una metodología *in silico* para clasificar provisionalmente, de acuerdo al SCB, los fármacos más vendidos en el mundo y los fármacos orales de liberación inmediata del listado de medicamentos esenciales de la OMS. Tres métodos diferentes se utilizaron para la permeabilidad: el coeficiente de reparto basado en contribuciones de grupo ( $C\log P$ ), basado en contribuciones de átomos ( $A\log P$ ) y basado solamente en la fórmula molecular y la contribución de elementos ( $K\log P$ ). La solubilidad fue estimada *in silico* utilizando ecuaciones termodinámicas basadas en el coeficiente de reparto y el punto de fusión. El citrato de sildenafil se clasificó como Clase I del SCB (usando  $C\log P$ ) y Clase III (usando  $A\log P$  y  $K\log P$ ).

Tomando en consideración los datos presentados por cada una de las metodologías desarrolladas para lograr una clasificación provisional del SCB, se podría concluir que el citrato de sildenafil pertenece a la Clase I del BCS. Para ello se le dio mayor relevancia a las clasificaciones con métodos experimentales que utilizando modelos *in silico*. No obstante, en la tabla 8 se puede apreciar que los valores de

permeabilidad del citrato de sildenafil en células MDCK y utilizando membranas artificiales son mayores que los descritos para el metoprolol (compuesto de referencia de alta permeabilidad), además la fracción absorbida en humanos es de 92% y los resultados experimentales encontrados en este estudio respaldan que el citrato de sildenafil presenta una alta permeabilidad y sugieren que es un Clase I del SCB (tabla 9).

De acuerdo con las directrices más recientes de la OMS sobre ensayos de bioequivalencia<sup>(7)</sup>, la dosis utilizada para el cálculo de la razón dosis/solubilidad es la mayor dosis simple recomendada. Siguiendo estos argumentos y utilizando 100 mg como la mayor dosis simple (aunque la más utilizada es 50 mg), el citrato de sildenafil no cumple el criterio de la OMS para alta solubilidad (tabla 5) si se siguen únicamente los datos descritos en la tabla. Sin embargo, se impone un análisis más integral para la clasificación de la solubilidad del sildenafil. En primer lugar, no se describen en la literatura los valores de solubilidad de acuerdo a los requerimientos de la OMS para la bioexención según el BCS, o sea a pH 1,2; 4,5 y 6,8 a 37°C. Los datos mostrados en la tabla 5 fueron obtenidos a partir de soluciones acuosas y no a los rangos de pH indicados. Por otro lado, varios autores han considerado un valor mínimo de solubilidad del citrato de sildenafil de 3,5 mg/mL lo que hace que el valor del número de dosis sea inferior a 1 ( $D_0=0,1$ ) y por lo tanto el compuesto sea de alta solubilidad acuosa<sup>(1,17)</sup>. Como los resultados encontrados en la literatura son contradictorios se determinó el perfil solubilidad-pH para el citrato de sildenafil según los requisitos de bioexención de la OMS. Los valores alcanzados se muestran en la tabla 7 y muestran que el sildenafil citrato presenta una baja solubilidad.

En resumen, los datos disponibles en la literatura y los determinados experimentalmente para la solubilidad, así como los valores de permeabilidad referidos, sugieren que el citrato de sildenafil es un compuesto Clase II del SCB, en concordancia con los requerimientos de la OMS, por lo que no puede ser bioexonerado de ensayos de bioequivalencia *in vivo* a través de ensayos de disolución *in vitro*.

Considerando los resultados, el citrato de sildenafil debe ser un IFA considerado por el CECMED como candidato para un estudio de bioequivalencia *in vivo*, siendo esta la manera de demostrar su intercambiabilidad terapéutica con el producto innovador.

# *Conclusiones*

## Conclusiones

1. Los datos de solubilidad y permeabilidad reportados en la literatura para el citrato de sildenafil no son concluyentes y no permiten clasificar esas dos propiedades según el SCB.
2. La solubilidad experimental del citrato de sildenafil es baja a valores pH de 6,8, por lo que no cumple los criterios de la OMS para ser clasificado como compuesto de alta solubilidad.
3. La permeabilidad experimental del citrato de sildenafil, determinada mediante modelos *in situ* en ratas, fue alta.
4. De acuerdo a los resultados de solubilidad y permeabilidad, el citrato de sildenafil es un Clase II del SCB por lo que no puede ser bioexonerado de ensayos de bioequivalencia *in vivo* para la demostración de la intercambiabilidad terapéutica de formas sólidas orales de liberación inmediata que lo contengan.

# *Recomendaciones*

## **Recomendaciones**

Se propone analizar la posibilidad de bioexención del citrato de sildenafil a partir de establecer una correlación *in vitro-in vivo*, utilizando datos de estudios de bioequivalencia *in vivo* en humanos.

## *Referencias Bibliográficas*

## Referencias

1. Kasim NA, Whitehouse M, Ramachandran C, Bermejo Sanz M, Lennernäs H, Hussain AS, et al. Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. *Mol Pharm.* 2004;1(1):85–96.
2. Cook JA, Davit B, Polli JE. Impact of Biopharmaceutics Classification System-Based Biowaivers. *Mol Pharm.* 2010;7(5):1539–44.
3. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res.* 1995;12(3):413–20.
4. CDER/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. 2017.
5. CDER/FDA. Dissolution Testing and Specification Criteria for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Containing Biopharmaceutics Classification System Class 1 and 3 Drugs Guidance for Industry Dissolution Testing and Specification Criteria for Immediate-Release S. *Food Drug Adm.* 2015;(August):5.
6. EMA. EMA/CHMP: Guidelines on the investigation of Bioequivalence. London; 2010.
7. WHO. Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability. Annex6, WHO Technical Report Series, No 1003. 2017;181–236.
8. Wu CY, Benet LZ. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm Res.* 2005;22(1):11–23.
9. Pham-The H, Garrigues T, Bermejo M, Gonzalez-Alvarez I, Monteagudo MC, Cabrera-Perez MAA, et al. Provisional classification and in silico study of biopharmaceutical system based on caco-2 cell permeability and dose number. *Mol Pharm.* 2013/05/17. 2013;10(6):2445–61.

10. Butler J, Dressman JB. The Developability Classification System: Application of Biopharmaceutics Concepts to Formulation Development. *J Pharm Sci.* 2010;99(12):4940–54.
11. WHO Model List of Essential Medicines. 19th List. 2015.
12. Carson C. Long-term use of sildenafil. *Expert Opin Pharmacother.* 2003;4:397–405.
13. Jung S, Seo Y, Kim GK, Woo JS, Yong CS, Choi H. Comparison of the Solubility and Pharmacokinetics of Sildenafil Salts. *Arch Pharm Res.* 2011;34(3):451–4.
14. Wang Y, Chow MSS, Zuo Z. Mechanistic analysis of pH-dependent solubility and trans-membrane permeability of amphoteric compounds: Application to sildenafil. *Int J Pharm.* 2008;352:217–24.
15. Walker DK, Ackland MJ, James G, Muirhead GJ, Rance DJ, Wastall P, et al. Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat, rabbit, dog and man. *Xenobiotica.* 1999;29(3):297–310.
16. Gertz M, Harrison A, Houston JB, Galetin A. Prediction of human intestinal first-pass metabolism of 25 CYP3A substrates from in vitro clearance and permeability data. *Drug Metab Dispos.* 2010;38(7):1147–58.
17. Benet LZ, Broccatelli F, Oprea TI. BDDCS Applied to Over 900 Drugs. *AAPS J.* 2011;13(4):519–47.
18. Canada P. Product monograph: Viagra. 2015.
19. Brittain HG. Analytical profiles of drug substances and excipients. Volume 27. Academic Press; 1994. 611 p.
20. Aulton ME. Farmacia: la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. Elsevier; 2004.
21. González-Álvarez I, Cabrera-Pérez MÁ, Bermejo-Sanz M, editors. Metodologías Biofarmacéuticas en el desarrollo de medicamentos. 20/04/2015. Alicante, España: Universidad Miguel Hernández; 2015. 567 p.
22. Bavestrellof L. Bioequivalencia: ¿Debemos exigirla? *Rev Chil Infect.*

- 2003;20(Supl 1):38–40.
23. Lindenberg M, Kopp S, Dressman JB. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;58(2):265–78.
  24. The Merck Index. 14th ed. Whitehouse Station, N.J., USA: Merck Research Laboratories;
  25. Formulary USPN. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 38-NF 33). In: United States Pharmacopeia Convention. 2015.
  26. Baka E, Comer JEA, Takács-Novák K. Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;46(2):335–41.
  27. Chen ML, Amidon GL, Benet LZ, Lennernäs H, Yu LX. The BCS, BDDCS, and regulatory guidances. *Pharm Res.* 2011;28(7):1774–8.
  28. Ku MS. Use of the Biopharmaceutical Classification System in early drug development. *AAPS J.* 2008;10(1):208–12.
  29. Dahan A, Lennernäs H, Amidon GL, Lennernäs H, Amidon GL. The Fraction Dose Absorbed, in Humans, and High Jejunal Human Permeability Relationship. *Mol Pharm.* 2012;9(6):1847–51.
  30. Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev.* Elsevier B.V.; 2012;64(SUPPL.):280–9.
  31. Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;175(3):880–5.
  32. Yee S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man--fact or myth. *Pharm Res.* 1997;14(6):763–6.
  33. Yazdanian M, Glynn SL, Wright JL, Hawi A. Correlating partitioning and caco-2

- cell permeability of structurally diverse small molecular weight compounds. *Pharm Res.* 1998;15(9):1490–4.
34. Thomas S, Brightman F, Gill H, Lee S, Pufong B. Simulation modelling of human intestinal absorption using Caco-2 permeability and kinetic solubility data for early drug discovery. *J Pharm Sci.* 2008;97(10):4557–74.
  35. Volpe DA. Drug Permeability Studies in Regulatory Biowaiver Applications. In: Ehrhardt C, Kim K-J, editors. *Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models.* 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA: Springer; 2008. p. 665–80.
  36. Irvine JD, Takahashi L, Lockhart K, Cheong J, Tolan JW, Selick HE, et al. MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *J Pharm Sci.* 1999;88(1):28–33.
  37. Kansy M, Senner F, Gubernator K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J Med Chem.* 1998;41(7):1007–10.
  38. Sugano K, Hamada H, Machida M, Ushio H. High throughput prediction of oral absorption: improvement of the composition of the lipid solution used in parallel artificial membrane permeation assay. *J Biomol Screen.* 2001;6(3):189–96.
  39. Peternel L, Kristan K, Petruševska M, Rizner TL, Legen I. Suitability of Isolated Rat Jejunum Model for Demonstration of Complete Absorption in Humans for BCS-Based Biowaiver Request. *J Pharm Sci.* 2012 ;101(4):1436–49.
  40. Amidon KS, Langguth P, Lennernäs H, Yu L, Amidon GL. Bioequivalence of Oral Products and the Biopharmaceutics Classification System: Science, Regulation, and Public Policy. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;90(3):467–70.
  41. Salphati L, Childers K, Pan L, Tsutsui K, Takahashi L. Evaluation of a single-pass intestinal-perfusion method in rat for the prediction of absorption in man. *J Pharm Pharmacol.* 2001;53(7):1007–13.
  42. Doluisio JT, Billups NF, Dittert LW, Sugita ET, Swintosky J V. Drug absorption. I. An in situ rat gut technique yielding realistic absorption rates. *J Pharm Sci.* 1969;58:1196–2000.

43. Fagerholm U, Johansson M, Lennernäs H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. *Pharm Res.* 1996;13(9):1336–42.
44. Lozoya-agullo I, Gonzalez-alvarez I, Zur M, Fine-shamir N, Cohen Y, Markovic M. Closed-Loop Doluisio ( Colon , Small Intestine ) and Single-Pass Intestinal Perfusion ( Colon , Jejunum ) in Rat — Biophysical Model and Predictions Based on Caco-2. *Pharmaceutical Research*; 2017;(102).
45. Raw a. Regulatory considerations of pharmaceutical solid polymorphism in Abbreviated New Drug Applications (ANDAs). *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56(3):397–414.
46. García-Arieta A. Interactions between active pharmaceutical ingredients and excipients affecting bioavailability: Impact on bioequivalence. *Eur J Pharm Sci.* 2014;65:89–97.
47. EMEA. Compilation of individual product-specific guidance on demonstration of bioequivalence(EMA/CHMP/736403/2014) Rev 3. 2016;44(April):1–61.
48. ANVISA/Brasil. Resolução da diretoria colegiada – RDC no 37 , de 3 de agosto de 2011. Ministério da Saúde - Agência Nac. 2011;1–10.
49. ISP. Resol.Exenta No 727/05 Norma que define los criterios destinados a establecer equivalencia terapeutica en productos farmaceuticos en Chile. Publicada en el D Of 291105 Complement. 2005;1–53.
50. Ministerio de Salud. Instituto de Salud Pública de Chile. GUÍA TÉCNICA G-BIOF 02: Bioexención de los estudios de Biodisponibilidad/Bioequivalencia para establecer Equivalencia Terapéutica de Formas Farmacéuticas Sólidas Orales. 2007.
51. CECMED. Regulación 18-07: Requerimientos para estudios de Biodisponibilidad y Bioequivalencia. Habana; 2007.
52. CECMED. Regulación No. 48 / 2007 Requisitos para aplicar y/o diseñar un ensayo de disolución en cápsulas y tabletas de liberación inmediata. 2007.
53. INVIMA. Resolución 1124 de 2016. Por la cual se establece la Guía que contiene los criterios y requisitos para el estudio de Biodisponibilidad y

- Bioequivalencia de medicamentos, se define el listado de los que deben presentarlos y se establecen las condiciones. 2016.
54. Intercambiabilidad HBE. Reglamento Técnico Salvadoreño RTS 11.02.01:16 Productos Farmacéuticos. Medicamentos de uso humano. Bioequivalencia e intercambiabilidad. 2013;(503).
  55. ARCSA. Reglamento sustitutivo de registro sanitario para medicamentos en general (Acuerdo No. 00000586)/Reform 2016. Vol. 0. 2016.
  56. DGDF. Dec. No. 246-06 que establece el Reglamento que regula la fabricacion, elaboracion, control de calidad, suministro, circulacion, distribucion, comercializacion, informacion, publicidad, importacion, almacenamiento, dispensacion, evaluacion, registro y don. 2006.
  57. República de Panamá. Ministerio de Salud. Modificación del decreto ejecutivo no 6 de 2005 relativo a equivalencia terapéutica e intercambiabilidad. Decreto de bioequivalencia para consultar. 2010.
  58. República de Panamá. Ministerio de Salud. Ley 1 de 10 de enero de 2001. "Sobre Medicamentos y otros Productos para la Salud Humana". (G.O. 24218 de 12 de enero de 2001). 2001.
  59. MINSA/DIGEMID. Directiva Sanitaria que Regula los Estudios de Equivalencia para Demostrar la Intercambiabilidad de Medicamentos.
  60. MINSA/DIGEMID. Resolución Ministerial 708-2015. 2015.
  61. COFEPRIS. Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. Diario Oficial. 2013.
  62. Republica Bolivariana de Venezuela. Ministerio de Salud. Resolución No 212/06. 2006.
  63. ANMAT. Disposición 758/2009: Criterios de Bioexención de Estudios de Bioequivalencia para medicamentos sólidos orales de liberación inmediata. 2009;
  64. ANMAT. Guía para la solicitud de Bioexenciones de Ingredientes Farmacéuticos Activos con Requerimiento de Bioequivalencia. 2016;1:1–51.

65. Cheping Sánchez N, editor. *Formulario Nacional de Medicamentos*. Cuarta. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2014. 843 p.
66. Melnikov P, Corbi PP, Cuin A, Cavicchioli M, Guimaraes WR. Physicochemical Properties of Sildenafil Citrate ( Viagra ) and Sildenafil Base. *J Pharm Sci Innov*. 2003;92(10):2140–3.
67. Badwan A, Nabulsi L, Al-Omari M, Daraghmeh N, Ashour M. Sildenafil Citrate. In: Brittain HG, editor. *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients Volume 27*. Academic Press Professional, Inc.; 2001. p. 339–76.
68. Gobry V, Bouchard G, Carrupt P-A, Testa B, Girault HH. Physicochemical Characterization of Sildenafil : Ionization , Lipophilicity Behavior , and Ionic-Partition Diagram Studied by Two-Phase Titration and Electrochemistry. *Helv Chim Acta*. 2000;83:1465–74.
69. Marcelín-Jiménez G, Ángeles-Moreno AP, Contreras-Zavala L, García-González A, Ramírez-San Juan E. Comparison of Fasting Bioavailability Among 100-mg Commercial , 100-mg Generic , and 50-mg Chewable Generic Sildenafil Tablets in Healthy Male Mexican Volunteers : A Single-Dose , 3-Period , Crossover Study. *Clin Ther*. 2012;34(3):689–98.
70. Gupta M, Kovar A, Meibohm B. The Clinical Pharmacokinetics of Phosphodiesterase-5 Inhibitors for Erectile Dysfunction. *J Clin Pharmacol*. 2005;45:987–1003.
71. Goldenberg MM. Safety and Efficacy of Sildenafil Citrate in the Treatment of Male Erectile Dysfunction. *Clin Ther*. 1998;20(6):1033–48.
72. Nichols DJ, Muirhead GJ, Harness JA. Pharmacokinetics of sildenafil after single oral doses in healthy male subjects: absolute bioavailability, food effects and dose proportionality. *Br J Clin Pharmacol*. 2002;53 Suppl 1:5S–12S.
73. Chuasuwan B, Ratnatilaka P, Supasena W, Manamuti C, Techatanawat I, Narakorn P, et al. Bioequivalence Study of Sildenafil 20 mg Tablets in Healthy Thai Male Volunteers. *Mahidol Univ J Pharm Sci* 2014; 2014;41(2):1–6.
74. Roh H, Son H, Lee D, Yeon KJ, Kim HS, Kim H, et al. Pharmacokinetic Comparison of an Orally Disintegrating Film Formulation With a Film-Coated

- Tablet Formulation of Sildenafil in Healthy Korean Subjects: A Randomized, Open-Label, Single-Dose, 2-Period Crossover Study. *Clin Ther.* 2013;35(3):205–14.
75. Dadey E. Bioequivalence of 2 Formulations of Sildenafil Oral Soluble Film 100 mg and Sildenafil Citrate ( Viagra ) 100 mg Oral Tablets in Healthy Male Volunteers. *Am J Ther.* 2015;8(0):1–8.
  76. Radicioni M, Castiglioni C, Giori A, Cupone I, Frangione V, Rovati S. Bioequivalence study of a new sildenafil 100 mg orodispersible film compared to the conventional film-coated 100 mg tablet administered to healthy male volunteers. *Drug Des Devel Ther.* 2017;11:1183–92.
  77. Avdeef A, Fuguet E, Llinàs A, Ràfols C, Bosch E, Völgyi G, et al. Equilibrium solubility measurement of ionizable drugs – consensus recommendations for improving data quality. *Admet Dmpk.* 2016;4(2):117–78.
  78. Völgyi G, Marosi A, Novák KT, Avdeef A. Salt Solubility Products of Diprenorphine Hydrochloride , Codeine and Lidocaine Hydrochlorides and Phosphates – Novel Method of Data Analysis Not Dependent on Explicit Solubility Equations. *ADMET.* 2013;1(4):48–62.
  79. Casabo VG, Nunez-Benito E, Martinez-Coscolla A, Miralles-Loyola E, Martin-Villodre A, Pla-Delfina JM. Studies on the reliability of a bihyperbolic functional absorption model. II. Phenylalkylamines. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1987;15(6):633–43.
  80. Ferrando R, Garrigues TM, Bermejo M V, Martin-Algarra R, Merino V, Polache A. Effects of ethanol on intestinal absorption of drugs: in situ studies with ciprofloxacin analogs in acute and chronic alcohol-fed rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999;23(8):1403–8.
  81. Bermejo M, Merino V, Garrigues TM, Pla Delfina JM, Mulet A, Vizet P, et al. Validation of a biophysical drug absorption model by the PATQSAR system. *J Pharm Sci.* 1999;88(4):398–405.
  82. Ruiz-Garcia A, Bermejo M, Merino V, Sanchez-Castano G, Freixas J, Garrigues TM. Pharmacokinetics, bioavailability and absorption of flumequine

- in the rat. *Eur J Pharm Biopharm.* 1999;48(3):253–8.
83. Tugcu-Demiroz F, Gonzalez-Alvarez I, Gonzalez-Alvarez M, Bermejo M. Validation of phenol red versus gravimetric method for water reabsorption correction and study of gender differences in Doluisio's absorption technique. *Eur J Pharm Sci.* 2014;62:105–10.
  84. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology.* 1989;96(3):736–49.
  85. Gertz M, Harrison AP, Houston JB, Galetin A. Prediction of human intestinal first-pass metabolism of 25 CYP3A substrates from invitro clearance and permeability data. *Drug Metab Dispos.* 2010;38(7):1147–58.
  86. Stenberg P, Norinder U, Luthman K, Artursson P. Experimental and computational screening models for the prediction of intestinal drug absorption. *J Med Chem.* 2001;44(12):1927–37.
  87. Thiel-Demby VE, Humphreys JE, St John Williams LA, Ellens HM, Shah N, Ayrton AD, et al. Biopharmaceutics classification system: validation and learnings of an in vitro permeability assay. *Mol Pharm.* 2009/02/28. 2009;6(1):11–8.
  88. Sugano K, Takata N, Machida M, Saitoh K, Terada K. Prediction of passive intestinal absorption using bio-mimetic artificial membrane permeation assay and the paracellular pathway model. *Int J Pharm.* 2002;241(2):241–51.
  89. Zhu C, Jiang L, Chen TM, Hwang KK. A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. *Eur J Med Chem.* 2002;37(5):399–407.
  90. Kim CEK-J, Ehrhardt C, Kim KJ. Drug Absorption Studies. In Situ, In Vitro and In Silico Models. Ehrhardt C, Kim KJ, editors. Vol. VII, Biotechnology: Pharmaceutical Aspects. LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA: Springer; 2008. 696 p.
  91. Kim JS, Mitchell S, Kijek P, Tsume Y, Hilfinger J, Amidon GL. The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: utility for BCS class I

- biowaiver requests. *Mol Pharm.* 2006;3(6):686–94.
92. Takagi T, Ramachandran C, Bermejo M, Yamashita S, Yu LX, Amidon GL. A Provisional Biopharmaceutical Classification of the Top 200 Oral Drug Products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. *Mol Pharm.* 2006;3(6):631–43.
  93. Dahan A, Wolk O, Kim YH, Ramachandran C, Crippen GM, Takagi T, et al. Purely in Silico BCS Classification: Science Based Quality Standards for the World's Drugs. *Mol Pharm.* 2013;10:4378–90.