ARTÍCULO

Técnicas de remuestreo en la comparación de curvas de disolución de fármacos

Gloria Frutos[1*], Jordi Ocaña[2]

[1]Departamento de Estadística e Investigación Operativa. Facultad de Farmacia Universidad Complutense Madrid . [2]Departamento de Estadística. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona.
Recibido el 3 de marzo de 2011.
e-mail: gloriafr@mat.ucm.es

RESUMEN

De acuerdo con las directrices actuales (Guías EMEA y FDA/CDER) los ensayos de disolución son siempre necesarios y en consecuencia requeridos. Pueden servir para varios propósitos: (i) durante el desarrollo de un medicamento son utilizados como una herramienta para identificar los factores que influyen en la biodisponibilidad, (ii) en el control de calidad se utilizan para probar consistencia en la fabricación y para garantizar que los perfiles de disolución siguen siendo similares a los obtenidos con los lotes del ensayo clínico pivotal, además, (iii) en la inferencia de bioequivalencia subrogada el ensayo de disolución puede ser utilizado para demostrar similitud entre diferentes formulaciones de una sustancia activa y el producto de referencia. El interés de la normativa sobre la comparación de los perfiles está centrado en conocer cuál es el grado de similaridad de las curvas y disponer de una medida sensible a las diferencias grandes. Varios comités regulatorios han recomendado el factor de similaridad f_2 como criterio para evaluar similaridad entre dos perfiles de disolución, por lo que su utilización está generalizada. El objetivo de este artículo fue desarrollar estudios teóricos y de simulación para evaluar por medio de intervalos de confianza bootstrap para f_2, la similitud de los perfiles de disolución.

Palabras clave: Factor de similaridad; Ensayos de disolución; Remuestreo; Bootstrap; Simulación.

ABSTRACT

Resampling techniques on the comparison of drug dissolution curves

According to the current Guidelines (EMEA and FDA/CDER) dissolution studies are always necessary and consequently required. Dissolution assays can serve several purposes: (i) during the development of a medicinal product a dissolution test is used as a tool to identify formulation factors that are influencing the bioavailability of the drug; (ii) in the quality control of scale-up and of production batches, a dissolution test is used to prove consistency in the manufacturing and to ensure that the dissolution profiles remain similar to those of pivotal clinical trial batches; furthermore, (iii) in bioequivalence surrogate inference a dissolution test can be used to demonstrate similarity between different formulations of an active substance and the reference medicinal product. Regulatory interest in dissolution profiles comparisons is in knowing how similar the curves are, and to have a measure sensitive to large differences at any particular time point. Similarity factor f_2 is gaining popularity due to its recommendation by various regulatory committees as a criterion for the assessment of the similarity between two dissolution profiles. The aim of this study was to develop theoretical and simulation studies to assess by means of bootstrap confidence intervals for f_2, the similarity of dissolution profiles.

Keywords: Similarity factor; Dissolution assays; Resampling; Bootstrap; Simulation.

1. INTRODUCCIÓN

Los ensayos de disolución proporcionan una evaluación de la velocidad y la extensión del medicamento cedido *in vitro* desde una forma farmacéutica, en general comprimidos o cápsulas. Puesto que la absorción humana de un principio activo solo es posible desde su forma disuelta, el proceso de disolución de un fármaco debe tener unas características adecuadas, para asegurar que alcanza los efectos terapéuticos deseados. La variable respuesta es la cantidad o porcentaje acumulado de principio activo cedido al medio de disolución, en unos tiempos de toma de muestra que se fijan previamente en función de la naturaleza de la propia forma farmacéutica. El tratamiento de los perfiles de disolución depende de la finalidad del experimento: investigadora o industrial. En investigación el objetivo es caracterizar el proceso de cesión desde un punto de vista físico-químico, con el fin de introducir modificaciones en las variables diseño que permitan modular la liberación del principio activo. Esto es particularmente importante para medicamentos con márgenes terapéuticos muy estrechos para los que, pequeños cambios en la concentración sistémica produce considerables cambios terapéuticos. Desde el punto de vista industrial los ensayos de disolución se

realizan con diversas finalidades: (*i*) como un requerimiento obligatorio en el Registro de especialidades farmacéuticas, (*ii*) para evaluar si un producto cumple las especificaciones de la farmacopea vigente respecto a poder asegurar que un porcentaje determinado de la cantidad etiquetada es biodisponible, (*iii*) como sustituto de un ensayo de bioequivalencia y (*iv*) para garantizar que los cambios realizados en la formulación después de haber sido registrada, no afectan a la extensión ni a la velocidad de disolución del fármaco, anteriores al cambio. En estos casos interesa la comparación de perfiles que en general, se refiere a la comparación de curvas de disolución correspondientes a dos lotes: a) lote de referencia, que normalmente recoge las condiciones según las cuales se registró el producto y b) lote problema, para el cual alguna de las características de fabricación ha cambiado (Guías EMEA, Guías FDA/CDER (1-5)).

No existe un protocolo general para la comparación de curvas de disolución. Los procedimientos, obligatorios para algunos medicamentos y recomendados para otros se pueden agrupar en tres categorías: métodos basados en análisis de varianza (6-10), métodos modelo-independiente (11-15) y métodos modelo-dependiente (16-20). Es muy frecuente encontrar artículos, especialmente en preformulación galénica, que utilizan de manera habitual el índice de similaridad f_2 en los procesos de optimización de los factores instrumentales y de diseño (21-25). Son mucho menos frecuentes las aportaciones conceptuales sobre el índice de similaridad (26-29). Dada la importancia práctica que ha adquirido f_2, en este trabajo se estudia el comportamiento de dicho índice en la evaluación de la similaridad de perfiles, utilizando intervalos *bootstrap* para el factor de similaridad.

2. FACTOR DE SIMILARIDAD

2.1. Estudio descriptivo

Moore y Flanner (30) propusieron dos índices f_1 y f_2, para comparar los perfiles de disolución de una formulación con otra de referencia. Estos factores evalúan la diferencia entre los porcentajes disueltos en unos determinados instantes de tiempo para las dos formulaciones que se comparan y fueron definidos mediante las expresiones:

$$f_1 = \left\{ \left[\sum_{t=1}^{n} |R_t - T_t| \right] \Big/ \sum_{t=1}^{n} R_t \right\} \cdot 100\%$$

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[1 + (1/n) \sum_{t=1}^{n} w_t (R_t - T_t)^2 \right]^{-1/2} \cdot 100 \right\}$$

donde R_t y T_t son los porcentajes de medicamento disuelto en el tiempo *t*, para la formulación de referencia y la formulación problema, respectivamente. *n* es el número de puntos experimentales sobre la curva de disolución. Para la comparación de los perfiles de los dos lotes, las medidas de disolución deberían ser hechas en las mismas condiciones experimentales y los tiempos de disolución deben ser los mismos.

El primer índice, f_1, refleja la diferencia acumulada entre dos curvas en todos los puntos experimentales. Este porcentaje es cero cuando los dos perfiles son idénticos y aumenta proporcionalmente con la disimilaridad entre las curvas. Conceptualmente f_1 es una función de la diferencia absoluta media entre las dos curvas por lo que se suele denominar factor "diferencia" y f_2, es una medida de similaridad en el porcentaje de disolución entre dos curvas, por lo que es denominado factor de "similaridad". Este segundo índice f_2 fue adoptado por las FDA's Guidance for Industry (3-5), como procedimiento recomendado para la comparación de perfiles de disolución.

El índice f_2 es una transformación de la suma de errores al cuadrado; considera la media de la suma de cuadrados de la diferencia, para cada punto, entre los perfiles de las dos curvas a comparar y ajusta los resultados entre 0 y 100. Para diferencias iguales o mayores que 100 la ecuación tiene que ser reajustada o los datos normalizados para que no se obtengan valores de f_2 negativos. Cuando los dos perfiles son idénticos, f_2 es igual a 100 y decrece cuando aumenta la disimilaridad. En el caso de que la disolución en un lote haya acabado (el porcentaje disuelto es del 100%) cuando la disolución en el otro lote no ha empezado (el porcentaje disuelto del 0%) resulta:

$$f_2 = 50 \cdot \log\left\{\left[1 + (1/n)\sum_{t=1}^{n}(100)^2\right]^{-1/2} \cdot 100\right\} = -0.001$$

que puede ser redondeado a 0. El valor de f_2 varía de 0 a 100, un valor de similaridad más alto indica que los perfiles son más parecidos.

En una situación real debido a la variación entre lotes en los perfiles de disolución, no se espera que el valor de f_2 sea cercano a 100, incluso cuando las dos curvas de disolución procedan del mismo lote. Se acepta que un lote problema es "similar" a un lote de referencia si la diferencia entre los perfiles de disolución de los dos lotes que se comparan no es mayor que la diferencia de perfiles de disolución entre dos lotes de referencia. Empíricamente, la experiencia en análisis de datos de disolución hace que se considere aceptable una diferencia media de no

más de un 10% en cualquiera de los puntos de dos lotes de una misma formulación. En la Tabla 1 se muestran valores de f_2 para diferencias preestablecidas entre porcentajes de dos curvas de disolución.

Tabla 1.- Valores de f_2 para diferencias medias entre perfiles de disolución de dos lotes de referencia.

Dif(%)	0	2	5	10	15	20	30	40	50	60	70	80	90	100
f_2	100	82,5	64,6	50	41,1	34,9	26,1	19,9	15,0	11,1	7,74	4,84	2,3	0

La Tabla 1 muestra que el 10% de diferencia media corresponde a un valor de f_2 de 49.9, que por simplicidad se redondea a 50. Por tanto un lote problema se considera similar a un lote de referencia si el valor f_2 de dos perfiles reales no es menor de 50.

La Figura 1 muestra la gráfica correspondiente a los valores de f_2 frente a las diferencias medias entre dos curvas de disolución. En dicha figura se observa que la pendiente de la curva es grande para diferencias pequeñas, por lo que el factor f_2 es sensible para discriminar entre curvas cercanas entre si. Para diferencias grandes el factor de similaridad no es un criterio sensible.

El factor de similaridad proporciona la misma información para curvas que están a la misma distancia por encima y por debajo de la curva de referencia puesto que las diferencias figuran al cuadrado en la ecuación que define f_2. Esta falta de capacidad de discriminación no hace perder generalidad a f_2 debido a que en la práctica este tipo de simetría sería atribuible a un error sistemático y la presencia de errores no aleatorios se produce con probabilidad muy pequeña porque los ensayos de velocidad de disolución son pruebas validadas y realizadas bajo control estadístico. Por otra parte, el criterio del AUC (area bajo la curva) avalaría la decisión tomada en estos casos.

La comparación de varias curvas muy próximas es una de las aplicaciones mas extendida del factor de similaridad, especialmente en ensayos donde se obtienen perfiles de disolución muy parecidos y cuya cercanía no es fácilmente cuantificable. El diagrama de barras (31) mostrado en la Figura 2 da una idea suficientemente aproximada del proceso como para poder discriminar en la fase de pre formulación.

Desde el punto de vista descriptivo el factor de similaridad se puede utilizar como una herramienta muy sencilla en los estudios iniciales de desarrollo y optimización de un producto farmacéutico.

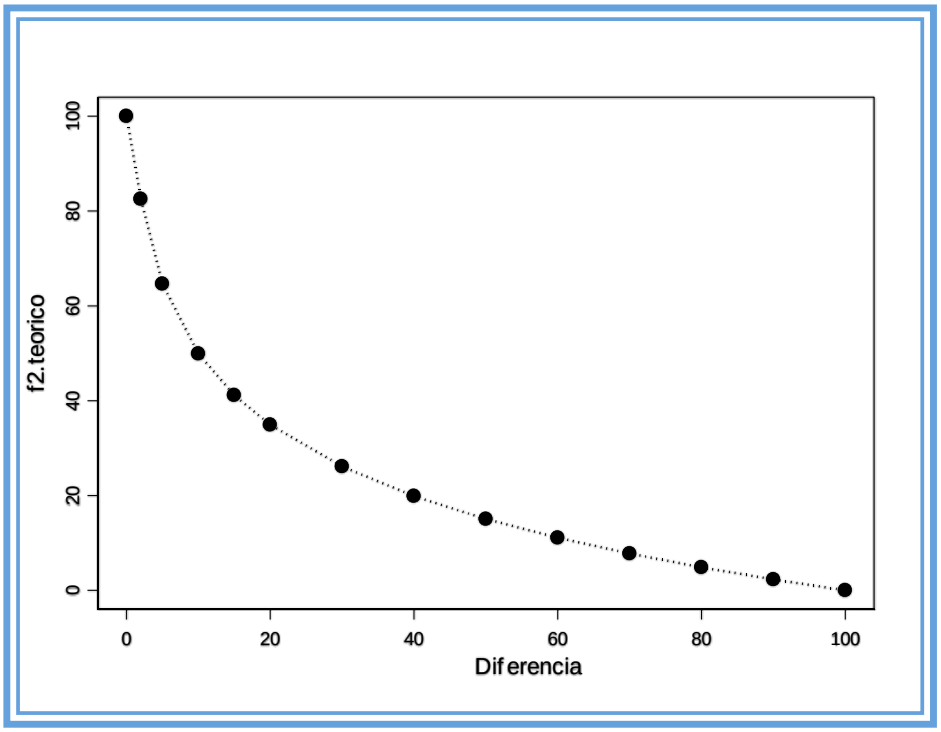

Figura 1.- Relación entre distancias medias entre curvas de disolución y valores calculados de f_2, Tabla 1.

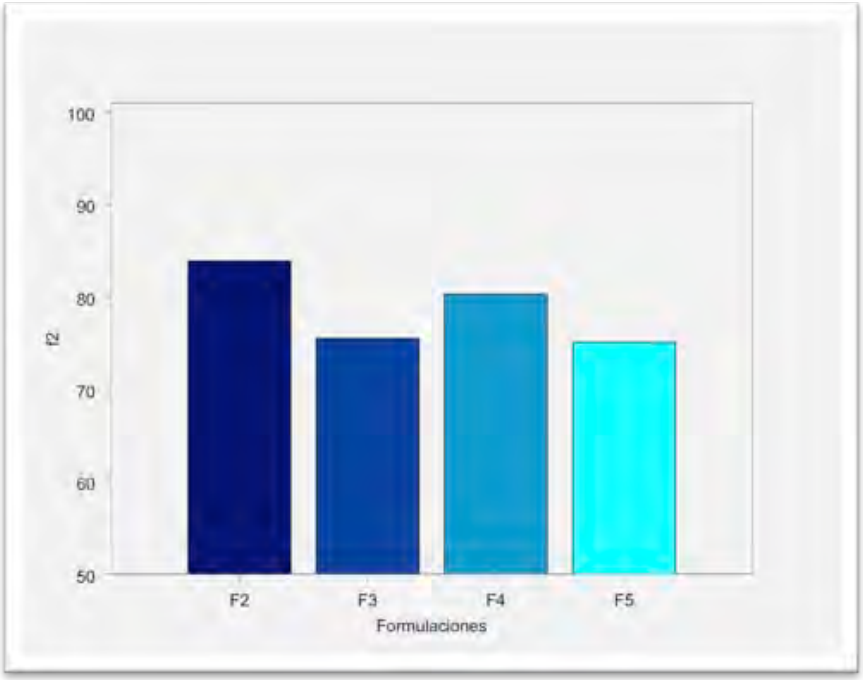

Figura 2.- Factor de similaridad para perfiles de disolución correspondientes a distinta relación de excipientes.

2.2. Estudio inferencial

Por analogía con el índice descriptivo de Moore y Flanner (30) se puede definir el factor de similaridad poblacional (32) por la expresión:

$$f_2 = 50 \cdot \log\left\{\left[1 + (1/P)\sum_{i=1}^{P}(\mu_{ti} - \mu_{ri})^2\right]^{-1/2} \cdot 100\right\}$$

donde se consideran los perfiles de disolución de dos lotes generados usando P puntos tales que $(\mu_{r1}, \mu_{r2}, \text{K}, \mu_{rP})$ representa los porcentajes medios de disolución en los P puntos sobre el perfil de referencia (Ref) y los $(\mu_{t1}, \mu_{t2}, \text{K}, \mu_{tP})$ son los correspondientes P porcentajes medios sobre el perfil problema (Test).

Según la normativa, para comprimidos se utilizan 12 unidades experimentales y el perfil de disolución de cada lote es una estimación basada en los valores medios de disolución de las 12 unidades. x_{kij} representa el porcentaje disuelto en el tiempo i (i = 1, 2,...,P), de un comprimido j (j = 1, 2,...,12) perteneciente al lote k (k = Ref, Tes). Los vectores de medias para cada lote se utilizan para estimar los vectores de medias poblacionales. Con estos valores medios, f_2 es estimado mediante las expresiones:

$$\hat{f}_2 = 50 \cdot \log\left\{\left[1 + (1/P)\sum_{i=1}^{P}(\bar{x}_{ti} - \bar{x}_{ri})^2\right]^{-1/2} \cdot 100\right\}$$

donde $\bar{x}_{ti}$ y $\bar{x}_{ri}$ son valores de disolución medios de los 12 comprimidos medidos en el i-ésimo valor del tiempo del lote problema y de referencia, respectivamente y,

$$\hat{f}_2 = 50 \cdot \log\left\{\left[1 + d/P\right]^{-1/2} \cdot 100\right\} = 100 - 25\log(1 + d/P)$$

donde se realiza la sustitución $d = \sum_{i=1}^{P}(\bar{x}_{ti} - \bar{x}_{ri})^2$ para simplificar posteriores cálculos.

Debido a la variación en el muestreo del estimador, la similaridad de disolución de los lotes no puede ser evaluada por comparación directa de $\hat{f}_2$ con el limite de similaridad, SL. Asumiendo que el valor esperado de $\hat{f}_2$ sea f_2, esto es E ($\hat{f}_2$) = f_2, se debería comparar el límite inferior del intervalo (90%) de E($\hat{f}_2$) con SL en lugar de hacer la comparación entre $\hat{f}_2$ y SL. Para poder expresar de forma matemática el intervalo de confianza se necesita conocer la distribución en el muestreo de $\hat{f}_2$. Cada componente del vector de medias muestrales es una variable

aleatoria con error estándar se($\bar{x}_{ki.}$), donde k = r, t; los elementos en $\bar{x}_k$ están correlacionados. Con objeto de tener una distribución estándar o asintóticamente estándar de $\hat{f}_2$, se estandariza $\hat{f}_2$ mediante su matriz de covarianza. Una forma estandarizada de $\hat{f}_2$, es una función complicada de la distancia de Mahalanobis descrita por Tsong y col.(33) y Sathe y col (34). Alternativamente el intervalo de confianza al 90% puede ser simulado mediante el método bootstrap tal como ha sido descrito por Tsong y col. (35).

2.3. Intervalos de confianza

El método bootstrap fue creado por Efron (36) como un conjunto de técnicas de remuestreo que aproxima la distribución en el muestreo de un estadístico por su distribución bootstrap. Se puede utilizar como una herramienta no paramétrica para calcular intervalos de confianza.

El número de intervalos de confianza exactos es muy limitado, la mayoría de los intervalos estándar están basados en aproximaciones asintóticas que pueden ser bastante imprecisas en la práctica. El objetivo de los intervalos de confianza bootstrap es mejorar, mediante mecanismos automáticos, la precisión de los intervalos estándar: $\hat{\theta} \pm z^{(\alpha)}\hat{\sigma}$ donde $\hat{\theta}$ es la estimación puntual del parámetro de interés θ, $\hat{\sigma}$ es la desviación estándar de $\hat{\theta}$ y $z^{(\alpha)}$ es el 100α-ésimo percentil de la distribución N(0,1).

Según el planteamiento bootstrap, mediante muestreo aleatorio se obtienen unos datos observados $\mathbf{x} = (x_1, x_2, \ldots, x_n)$ de una variable aleatoria con función de distribución de probabilidad desconocida, con los que se calcula una estimación $\hat{\theta} = s(\mathbf{x})$ del estadístico de interés. A partir de la distribución empírica de los datos observados se genera, por muestreo aleatorio con reemplazamiento, la muestra bootstrap, $\mathbf{x}^* = (x_1^*, x_2^*, \ldots, x_n^*)$, de la que se obtiene la estimación bootstrap, replicación bootstrap, del parámetro $\hat{\theta}^* = s(\mathbf{x}^*)$. Si el proceso se repite B veces, la estimación bootstrap del error estándar de $\hat{\theta} = s(\mathbf{x})$ es la desviación estándar de las replicaciones bootstrap:

$$se_{boot} = \left\{ \sum_{b=1}^{B} \left[s\left(\mathbf{x}^{*b}\right) - s(\cdot) \right]^2 \Big/ (B-1) \right\}^{1/2}$$

donde $s\left(\mathbf{x}^{*b}\right)$ es la replicación bootstrap de $s\left(\mathbf{x}\right)$ para cada muestra bootstrap y $s\left(\cdot\right)$ es:

$$s\left(\cdot\right)=\sum_{b=1}^{B}s\left(\mathbf{x}^{*b}\right)/B$$

El intervalo de confianza, 1-2α, PI (percentil interval) viene definido por los percentiles α y 1-α de $\hat{G}$, función de distribución acumulada de $\hat{\theta}^{*}$. Siguiendo la notación de Efron y col (36), $\hat{\theta}^{*(\alpha)}$ representa el 100α-ésimo percentil de B replicaciones bootstrap; el intervalo percentil que cubra el parámetro θ con probabilidad 1-2α se obtiene directamente de estos percentiles:

$$\left[\hat{\theta}_{lo},\hat{\theta}_{up}\right]=\left[\hat{G}^{-1}\left(\alpha\right),\hat{G}^{-1}\left(1-\alpha\right)\right]$$

Como por definición $\hat{G}^{-1}\left(\alpha\right)=\hat{\theta}^{*(\alpha)}$, el 100α-ésimo percentil de la distribución bootstrap, también se puede escribir el intervalo percentil como:

$$\left[\hat{\theta}_{lo},\hat{\theta}_{up}\right]=\left[\hat{\theta}^{*(\alpha)},\hat{\theta}^{*(1-\alpha)}\right]$$

2.4. Sesgo del estimador del factor de similaridad

La evaluación de la similaridad de disoluciones utilizando el intervalo de confianza para $E(\hat{f}_2)$ estimado por el método bootstrap, sin sesgo únicamente si $E(\hat{f}_2) = f_2$. El valor esperado de la diferencia cuadrática media entre las medias de las muestras del lote problema y el de referencia se puede calcular mediante la siguiente expresión (donde n es el número de comprimidos en cada lote, σ_{ti}^2 y σ_{ri}^2 son las varianzas de las medidas del porcentaje de disolución en el i-ésimo punto de los lotes problema y de referencia respectivamente):

$$E\left[\left(1/P\right)\sum_{i=1}^{P}\left\{\sum_{j=1}^{n}\left(x_{tij}-x_{rij}\right)/n\right\}^{2}\right]=$$

$$E\left(\left(1/P\right)\left\{\sum_{i=1}^{P}\left[\left(\sum_{j}\left(x_{tij}-x_{rij}\right)/n-\left(\mu_{ti}-\mu_{ri}\right)\right)^{2}\right]+\sum_{i=1}^{P}\left(\mu_{ti}-\mu_{ri}\right)^{2}\right\}\right)=$$

$$\left(1/P\right)\left[\sum_{i=1}^{P}\left(\mu_{ti}-\mu_{ri}\right)^{2}+\sum_{i=1}^{P}\left(\sigma_{ti}^{2}+\sigma_{ri}^{2}\right)/n\right]$$

El límite de la expresión anterior cuando n tiende a infinito es:

$$(1/P)\left[\sum_{i=1}^{P}(\mu_{ti}-\mu_{ri})^2\right]$$

es decir las diferencias cuadráticas medias entre las medias de las muestras tiende a la diferencia cuadrática media entre las medias de las poblaciones. Por tanto $\hat{f}_2$ es un estimador asintóticamente sin sesgo de f_2.

Por el contrario cuando el término $\sum_{i=1}^{P}\left(\sigma_{ti}^2+\sigma_{ri}^2\right)/n$ no es despreciable, aplicando el desarrollo de Taylor, alrededor de E(d), resulta la esperanza del estimador:

$$E\left(\hat{f}_2\right)=E\{100-25\log[1+d/P]\}\approx 100-25\log\left(1+E(d)/P\right)$$
$$=100-25\log\left(1+(1/P)\left[\sum_{i=1}^{P}(\mu_{ti}-\mu_{ri})^2+\sum_{i=1}^{P}\left(\sigma_{ti}^2+\sigma_{ri}^2\right)/n\right]\right)$$

Puesto que el termino $\sum_{i=1}^{P}\left(\sigma_{ti}^2+\sigma_{ri}^2\right)/n$ es positivo, resulta $E\left(\hat{f}_2\right)\leq f_2$; debido a que la esperanza del estimador es menor que el parámetro a estimar, Shah y col (32) indican que f_2 es *conservativo* en la estimación de la similaridad de perfiles de disolución.

2.5. Contrastes de hipótesis

Cuando $\hat{f}_2$ se utiliza como una estimación de f_2 se pueden considerar dos interpretaciones:

Si el límite de similaridad, SL_{f_2}, se fija independientemente de los datos de lotes de referencia, por ejemplo SL_{f_2} = 50 para todos los productos, la comparación de la similaridad utilizando el límite inferior del intervalo de confianza bootstrap para $E(\hat{f}_2)$ se puede considerar como una aproximación al test para las siguientes hipótesis:

$$H'_o: 100-25\log\left(1+(1/P)\left[\sum_{i=1}^{P}(\mu_{ti}-\mu_{ri})^2+\sum_{i=1}^{P}\left(\sigma_{ti}^2+\sigma_{ri}^2\right)/n\right]\right)\leq SL_{f_2}$$

frente a la alternativa

$$H'_a: 100-25\log\left(1+(1/P)\left[\sum_{i=1}^{P}(\mu_{ti}-\mu_{ri})^2+\sum_{i=1}^{P}\left(\sigma_{ti}^2+\sigma_{ri}^2\right)/n\right]\right)>SL_{f_2}$$

la hipótesis nula será rechazada cuando los dos sumandos sean pequeños. Por tanto puede considerarse un test conservativo para las siguientes hipótesis respecto a f_2:

$$H_o : 100 - 25\log\left(1 + (1/P)\left[\sum_{i=1}^{P}(\mu_{ti} - \mu_{ri})^2\right]\right) \leq SL_{f_2}$$

$$H_a : 100 - 25\log\left(1 + (1/P)\left[\sum_{i=1}^{P}(\mu_{ti} - \mu_{ri})^2\right]\right) > SL_{f_2}$$

En este caso el procedimiento propuesto puede ser considerado de dos formas: como un test conservativo para H_0 o como un test aproximado para H_0' cuando $\sum_{i=1}^{P}\left(\sigma_{ti}^2 + \sigma_{ri}^2\right)/n$ es muy pequeño (esto es, si n es grande y las varianzas dentro de los lotes son pequeñas para todos los puntos en el intervalo de tiempo muestreado).

2. Si SL_{f_2} es específico de un producto y determinado por la experiencia con medias observadas de lotes de referencia, el límite de similaridad se fija para $E(\hat{f}_2)$ en lugar de para f_2. Por tanto las hipótesis se definen como:

$$H_o' : 100 - 25\log\left(1 + (1/P)\left[\sum_{i=1}^{P}(\mu_{ti} - \mu_{ri})^2 + \sum_{i=1}^{P}\left(\sigma_{ti}^2 + \sigma_{ri}^2\right)/n\right]\right) \leq SL_{E(\hat{f}_2)}$$

frente a la alternativa:

$$H_a' : 100 - 25\log\left(1 + (1/P)\left[\sum_{i=1}^{P}(\mu_{ti} - \mu_{ri})^2 + \sum_{i=1}^{P}\left(\sigma_{ti}^2 + \sigma_{ri}^2\right)/n\right]\right) > SL_{E(\hat{f}_2)}$$

y el test no tendría sesgo.

3. RESULTADOS

A modo de ejemplo se han utilizado datos simulados para calcular los límites de confianza bootstrap. Las filas de la matriz de datos corresponden a 12 comprimidos para cada una de las formulaciones simuladas: Ref, Tes1, Tes2, Tes3 y Tes4, respectivamente. Las columnas de la matriz corresponden a cuatro tiempos de valoración, T1, T2, T3 y T4, los mismos para cada formulación. Los valores de la variable representan el porcentaje acumulado disuelto de medicamento para cada una de las formulaciones en los tiempos considerados. El resumen descriptivo, medias y desviaciones típicas de la matriz de datos se incluyen en la Tabla 2.

Tabla 2.- Porcentaje medio acumulado para cada lotes, para cada uno de los tiempos de valoración.

	T1		T2		T3		T4	
	Media	Sd	Media	Sd	Media	Sd	Media	Sd
Ref	34.92	2.36	59.48	2.85	79.27	2.98	95.07	2.73
Tes1	40.34	4.28	67.15	6.62	87.01	4.97	97.72	1.55
Tes2	49.33	2.96	65.30	5.09	86.75	3.67	102.8	1.90
Tes3	25.79	2.47	50.64	2.37	66.99	2.68	88.60	2.68
Tes4	15.08	2.26	59.50	2.84	79.27	2.98	95.07	2.73
Tes5	43.39	1.46	77.96	1.74	86.30	2.90	98.60	2.10

La matriz de datos se puede expresar mediante el vector: $x_{ij} = \left(x_{i1j}, x_{i2j}, \ldots, x_{iPj}\right)'$ donde cada elemento representa una columna de la matriz, el índice *i* se refiere al lote, *P* es el número de tiempos en los que se ha medido la cantidad de medicamento disuelta y *j* el numero de comprimidos ensayados en cada lote.

El procedimiento bootstrap se realizó según el siguiente esquema:

a) Se generan muestras bootstrap $x_{ij}^* = \left(x_{i1j}^*, x_{i2j}^*, \ldots, x_{iPj}^*\right)'$ mediante remuestreo con reemplazamiento de los vectores de dimensión 12 que contienen los porcentajes acumulados disueltos, $x_{ij} = \left(x_{i1j}, x_{i2j}, \ldots, x_{iPj}\right)'$. El muestreo se debe realizar independientemente para la muestra de comprimidos de referencia y para el lote problema.

b) Se calcula el factor de similaridad para cada muestra bootstrap.

c) Se repiten los pasos anteriores tantas veces como se indique en el parámetro B (número de veces que se realiza la simulación) con lo que se obtiene B valores de $\hat{f}_2^*$, valor estimado de f_2 en la muestra bootstrap

Considerando que se generan B conjuntos de muestras usando el método bootstrap, el intervalo de confianza 90% se define por $\left[L\hat{f}_2^*, U\hat{f}_2^*\right]$ donde $L\hat{f}_2^*$ y $U\hat{f}_2^*$ son los percentiles α % y (1-α) % de los valores de $E\left(\hat{f}_2^*\right)$. El límite inferior, L_f, del intervalo de confianza (1-α) % para f_2 es el α% quantil de los valores bootstrap para $\hat{f}_2^*$

Se rechaza la hipótesis nula con un nivel de significación α, y se concluye que los perfiles de disolución del lote de referencia y del problema son similares si $L\hat{f}_2^*$ es menor que el límite fijado para f_2.

En la Tabla 3 se incluyen los valores del factor de similaridad muestral $\hat{f}_2$, calculados mediante la función **fun.f$_2$,** escrita para S-PLUS (37).

fun.f$_2$

```
options(digits=4)
fun.3 <- function( datos.no.estrat, estrat, nom.estrat)
{
n <- nrow(datos.no.estrat)
if(missing(estrat)){
n1 <- n %/% 2
estrat <- rep(c(1,2), c(n1,n-n1))
          }
else if(n > (lstrat <- length(estrat)))
estrat <- c( estrat, rep(estrat[lstrat],n-lstrat))
datos.estrat <- cbind(estrat[1:n], datos.no.estrat)
if(!missing(nom.estrat))
names(datos.estrat)[1] <- nom.estrat
datos.estrat
}
fun.4 <- function(Refdat,w)
{
sampl.star <- Refdat[w,]
P <- ncol(sampl.star) - 1  # P número de instantes de observación
primer.grupo <- sampl.star[,1] == sampl.star[1,1]
medias1 <- apply(sampl.star[primer.grupo,-1],2,mean)
medias2 <- apply(sampl.star[!primer.grupo,-1],2,mean)
50 * log10(1/sqrt((1 + sum((medias1 - medias2)^2)/P))*100)
}
```

La función **fun.3** añade a una matriz o data.frame una primera columna que codifica el estrato, grupo o condición experimental a la que pertenece cada fila; los parámetros de la función son: (i) datos.no.estrat es un parámetro obligatorio que representa la matriz de datos sin identificación de estratos; en este estudio se trata de la matriz rbind(Ref,Tes$_i$) para i = 1,2,..,5. (ii) estrat es un vector o factor opcional que se utilizará para codificar la permanencia de cada fila a un estrato. Si la longitud de estrat es menor que el número de filas de datos.no.estrat, el último código de estrato se repite hasta codificar todas las filas restantes, si es mayor los valores sobrantes se ignoran; si no se especifica se supone que la mitad (entera) codifica un primer estrato (valor 1) y las restantes un segundo (valor 2). (iii) nom.estrat, es una cadena de caracteres opcional que recoge el nombre que se dará a la columna que codifica los estratos.

La función **fun.4** calcula el factor de similitud utilizando matrices de datos muestrales; sus parámetros son: w, y Refdat. El vector de índices, w, indica los elementos (filas), de la matriz Refdat que intervienen en una remuestra concreta

(la muestra original se especifica por, 1: nrow(Refdat). El segundo parámetro Refdat es la matriz de datos en la que cada fila corresponde a una unidad experimental (comprimido) y cada columna, a partir de la segunda, a un instante de medida. La primera columna codifica el estrato (lote), al que pertenece cada fila (comprimido). Normalmente nrow(Refdat) será igual a length(w), en caso contrario las remuestras serán de distinto tamaño que la muestra original, situación que también puede darse en el remuestreo jackknife.

Cuando se toma $\hat{f}_2$ como estimación puntual de f_2 para evaluar la similaridad de las disoluciones, según los resultados presentados en la Tabla 3 se podría considerar que todos los lotes excepto el 5 tienen perfiles de disolución similares al lote de referencia, cuando se utiliza como criterio de similaridad el valor de 50 (computado basándose en una distancia media del 10% para todos los puntos).

Tabla 3.- Factores de similaridad correspondientes a las diferentes comparaciones.

	Ref-Tes1	Ref-Tes2	Ref-Tes3	Ref-Tes4	Ref-Tes5
$\hat{f}_2$	60.01	51.08	51.2	50.07	48.04

En la Tabla 4 se muestran los valores medios, correspondientes a las remuestras bootstrap para los distintos lotes, de $\hat{f}_2^*$ y los intervalos de confianza bootstrap PI para distinto número de simulaciones, calculados con la función **fun.f2.** Mediante esta función se estratifica la matriz de datos (**fun.3**) y se calcula el estadístico (**fun.4**) de cada una de las R remuestras bootstrap generadas mediante la función **boot** creada por Davison y Hinkley (38) y adaptada para este estudio.

```
boot(data, statistic, R, sim="ordinary", stype="i", strata=rep(1,n), L=NULL, m=0, weights=NULL,
ran.gen=function(d, p) d, mle=NULL, ...)

boot.ci(boot.out, conf=0.95, type="all", index=1:min(2,length(boot.out$t0),

var.t0=NULL, var.t=NULL, t0=NULL, t=NULL, L=NULL, h=function(t) t,

hdot=function(t) rep(1,length(t)), hinv=function(t) t, ...)
```

En la Tabla 4 también se observa que los extremos inferiores de los intervalos de confianza al 95% basado en 2000 muestras son 51.55, 47.67, 48.00, 48.14 y 45.53 para los lotes Tes1, Tes2, Tes3, Tes4 y Tes5 respectivamente. Esto indica que todos los lotes excepto el primero se considerarían no similares al lote de referencia cuando se utiliza el valor de 50 como punto de corte para aceptar

similaridad entre dos perfiles de disolución. La velocidad de convergencia de los intervalos de confianza bootstrap es dependiente de los datos, algunos autores (36) consideran que un bootstrap de 400 conjuntos de muestras da una estimación precisa, sin embargo en muchos casos es necesario aumentar el valor de R para poder asegurar que la estimación es estable. La Tabla 4 muestra que la estabilidad de los intervalos de confianza es diferente para las distintas comparaciones, se puede aceptar que todos son estables utilizando 2000 conjuntos de muestras para la estimación del intervalo percentil.

Tabla 4.- Valores medios de $\hat{f}_2^*$ e intervalos bootstrap PI para diferente número de simulaciones, R.

R	Ref-Tes1	Ref-Tes2	Ref-Tes3	Ref-Tes4	Ref-Tes5
100	60.08 (49.78, 71.59)	51.32 (47.83, 54.84)	51.05 (48.16, 55.68)	50.22 (48.39, 52.63)	48.17 (45.49, 50.99)
200	60.34 (51.60, 70.56)	51.08 (47.36, 54.62)	51.05 (47.38, 55.16)	49.93 (48.02, 51.79)	48.02 (45.69, 50.38)
400	60.09 (51.67, 70.18)	51.10 (47.79, 54.44)	51.23 (48.13, 55.54)	50.09 (48.22, 52.20)	47.98 (45.47, 50.67)
500	60.58 (52.15, 71.46	51.08 (48.00, 54.40)	51.21 (47.70, 54.88)	49.98 (48.10, 52.01)	47.99 (45.65, 50.29)
1000	60.31 (51.74, 70.27	51.09 (47.74, 54.86)	51.21 (47.82, 55.29)	49.93 (48.07, 51.86)	48.02 (45.58, 50.54)
2000	60.19 (51.55, 70.11)	51.03 (47.67, 54.38)	51.27 (48.00,55.09)	49.97 (48.14, 52.00)	48.04 (45.53, 50.59)
5000	60.35 (51.89, 70.42)	51.00 (47.68, 54.36)	51.23 (48.00, 54.99)	49.99 (48.07, 51.95)	48.03 (45.72, 50.46)

En la Figura 3 se representan, para R= 2000, los histogramas correspondientes a $\hat{f}_2^*$ para los distintos lotes comparados. La distribución $\hat{f}_2^*$ es ligeramente asimétrica para las comparaciones de algunos lotes, por lo que puede ser necesario un ajuste.

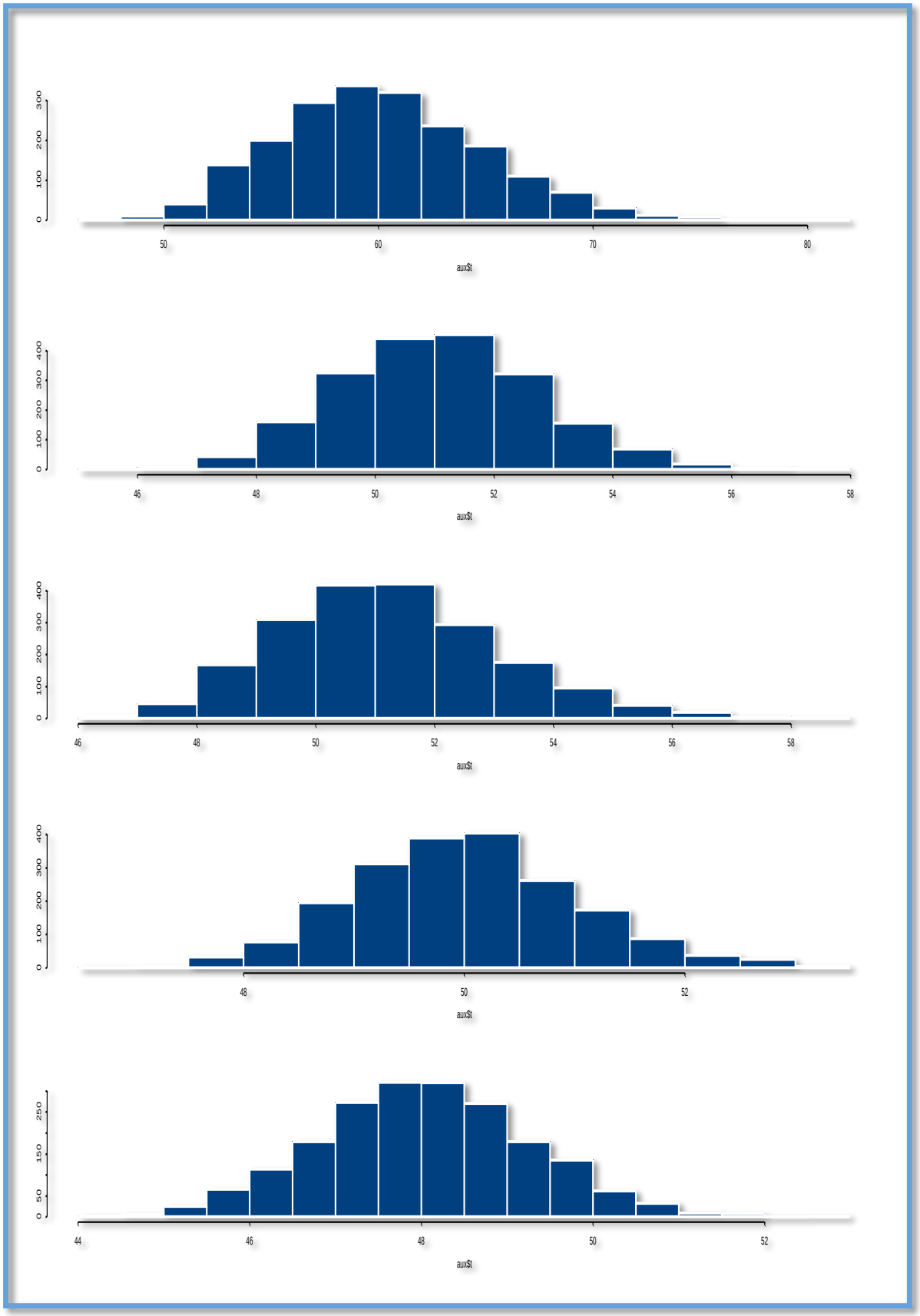

Figura 3.- Histogramas correspondientes a $\hat{f}_2^*$ para los distintos lotes (R=2000).

El factor de similaridad es un índice que evalúa la similaridad de dos perfiles de disolución combinando las diferencias en todos los puntos del intervalo de tiempo, en una sola medida. Tal medida es estimada sustituyendo las medias de la población por las medias de las muestras. Los datos de disoluciones suelen presentar autocorrelación, la variación del estimador es difícil de calcular y el mismo estimador es sesgado y con propiedades estadísticas difíciles de deducir. Incluso la transformación logarítmica de f_2 complica el conocimiento de la distribución en el muestreo de las diferencias cuadráticas medias. De acuerdo con Liu (39) no hay formula matemática para la distribución en el muestreo ni exacta ni en forma asintótica. Por lo tanto es difícil evaluar los errores de Tipo I, de Tipo II, la potencia, el tamaño de muestra, la magnitud del sesgo, la validez de la aproximación y de la sensibilidad del test para $\hat{f}_2$, por lo que el método bootstrap resulta una técnica alternativa muy conveniente.

El método bootstrap permite simular el intervalo de confianza para el factor de similaridad de manera que, la regla de decisión para aceptar o no, similaridad entre perfiles de disolución de dos lotes de comprimidos, estará basada en la comparación del límite inferior del intervalo con el valor crítico y no en la estimación puntual del parámetro.

4. REFERENCIAS

1. EMEA CPMP/QWP/604/96. Note For Guidance On Quality Of Modified Release Products: A: Oral Dosage Forms B: Transdermal Dosage Forms. European Agency For The Evaluation Of Medical Products. London, 29 July 1999.
2. EMEA CPMP/EWP/QWP/1401/98. Note for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence. European Agency for the Evaluation of Medical Products. London, 26 July 2001.
3. FDA/CDER. Guidance for Industry. Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls, In Vitro Dissolution Testing, and In Vivo Bioequivalence Documentation. US Food and Drug Administration. November 1995.
4. FDA Guidance for Industry: Modified Release Solid Oral Dosage Forms: Scale-up and post Approval Changes (SUPAC-MR): Chemistry, Manufacturing and Controls; In vitro Dissolution Testing and in vivo Bioequivalence Documentation, September 1997.
5. FDA/CDER. Guidance for Industry: Waiver of in vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. August 2000. US. M.C.
6. Box, G.E.P. (1950). Problems on the Analysis of Growth and Wear Curves. Biometrics, 6: 362-389.
7. Box, G.E.P. (1954). Some theorems of quadratic forms applied in the study of analysis of variance problems. II Effects of inequality of variance and the correlation between errors in the two way classification. Ann. Math. Stat., 25: 484-498.
8. Mauger, J.W., Chilco, D., & Howard, S. (1986) On the analysis of dissolution data. Drug Dev. Ind. Pharm., 12 (7): 969-992.

9. Greenhouse, S.W., & Geisser, S. (1959) On methods in the analysis of profile data. Psychometrika, 24: 95-112.

10. Huynh, H., & Feldt, L.S. (1976) Estimation of Box correction for degrees of freedom from sample data in randomised block and split-plot design. J. Ed. Stat., 1: 69-82.

11. Polli, J.E., Rekhi, G.S., & Shah, V.P. (1996) Methods to compare dissolution profiles. Drug Info. J., 30: 1113-1120.

12. Tanigawari, K., Yamaoka, K., Nakagawa, T., & Uno, T. (1982) New method for the evaluation of in vitro dissolution time and disintegration time. Chem.Pharm.Bull., 30: 1088-1090.

13. Yamaoka, K., Nakagawa, T., & Uno, T. (1978) Statistical Moments in Pharmackinetics. J. Pharm. Biopharm., 6, (69): 547-558.

14. Kim, H., & Fassihi, R. (1997) A new ternary polymeric matrix system for controlled drug delivery of highly soluble drugs. Pharm. Res., 14: 1415-1421.

15. Rescigno, R. (1992) Bioequivalence. Pharm. Res., 9: 925-928.

16. Noyes, A.A., & Whitney, W.R. (1897) The rate of solution of solid substances in their own solutions. J. Am. Chem. Soc., 19: 930-934.

17. Higuchi, T. (1963) Mechanism of sustained action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drug dispersed in solid matrices. J. Pharm. Sci., 52 (12): 1145-1149.

18. Korsmeyer, N.A., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., & Peppas, N.A. (1983) Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. Inter. J. Pharmc., 15: 25-35.

19. Peppas, N.A. (1985) Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. Pharm. Acta Helv., 60: 110-111.

20. Lidner, W.D., & Lippold, B.C. (1995) Drug released from hydrocolloid embedding with high or low susceptibility to hydrodynamic stress. Pharm. Res., 12 (11): 1781-1785.

21. Lu, C., Lu, Y., Chen, J., Zhang, W., & Wu, W. (2007) Synchronized and sustained release of multiple components in silymarin from erodible monostearate matrix system, Eur. J. Pharm. Biopharm., 66: 210-219.

22. Varshosaz, J., Tavakoly, N., & Kheirolahi, F. (2006) Use of hydrophilic natural gums in formulation of sustained-release matrix tablets of tromadol hydrochloride. (http://www.aapspharmscitech.org). AAPS PharmSciTech, 7 (1) Article 24.

23. Soni, T.G., Desai, J.U., Nagda, C.D., Gandhi, T.R., & Chotai, N.P. (2008) Mathematical evaluation of similarity factor using various weighing approaches on aceclofenac marketed formulations by model-independent method. Pharmazie, Die., 63(1): 31-34.

24. Philip, A.K., & Pathak K. (2006) Osmotic flow trough asymmetric membrane: A means for controlled delivery of drugs with varying solubility. AAPS PharmaSciTech, 7(3) Article 56 (http://www.aapspharmscitech.org).

25. Patel, D.M., Patel, N. M., Patel, V.F., & Bhatt, D.A. (2007) Floating granules of Ranitidine Hydrochloride-Gelucire: formulation optimization using factorial design, AAPS PharmSciTech, 8 (2) Article 30 (http://www.aapspharmscitech.org).

26. Gohel, M.C., Sarvaiya, K.G., Metha, N.R., Soni, Ch.D., Vyas, V.U., & Dave, R.K. (2005) Assessment of Similarity Factor Using Different Weighting Approaches. Dissolution Technologies, 1-6.

27. Gohel, M.C., Sarvaiya, K.G., Shah, A.R., & Brahmbhatt, B.K. (2009) Mathematical approach for the assessment of similarity factor using a new scheme for calculating weight. Indian J Pharm Sci., 71:142-4.

28. Liu, J.P., Ma, M.C., & Chow, S.C. (1997) Statistical evaluation of similarity factor f2 as a criterion for assessment of similarity between dissolution profiles. Drug Info. J. 31, 1255-1271.

29. Ocaña, J., Frutos, G., & Sánchez, O.P. (2009) Using the similarity factor f2 in practice: A critical revision and suggestions for its standard error estimation. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 99: 49-56.

30. Moore, J.W., & Flanner, H.H. (1996) Mathematical Comparison of Dissolution Profiles. Pharm. Tech., 20 (6): 64-74.

31. Pavón, C.V., Frutos, P., Lastres, J.L., & Frutos, G. (1994) Matrix tablets containing HPMC and Poliamide 12: comparison of dissolution data using the Gompertz function. Drug Dev. and Ind. Pharm., 20(6): 2509-2518.

32. Shah,V.P., Tsong, Y., Shate, P., & Liu, J.P. (1998) In vitro Dissolution Profiles Comparison. Statistics and Analysis of the Similarity Factor, f2. Pharm. Res., 16 (6): 889-896.

33. Tsong, Y., Sathe, P.M., & Shah V.P. (2003) In vitro dissolution profile comparison, in: S.C. Chow (Ed.), Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics, Second Edition, Marcel Dekker, Inc., New York, 2003, pp. 456-462.

34. Shate, P., Tsong, Y., & Shah, V.P. (1996) In vitro Dissolution Profiles Comparison: Statistics and Analysis, Model Dependent Approch. Pharm. Res., 13 (12): 1799-1803.

35. Tsong, Y., Hammerstrom, T., Shate, P., & Shah, V.P. (1996) Statistical Assesessment of Mean Differences between two Dissolution Data Sets. Drug Inf. J., 30: 1105-1112.

36. Efron, B. & Tibshirani, R.J. (1993) An Introduction to the bootstrap. Chapman&Hall.

37. S-PLUS 2000. MathSoft. Data Analysis Products Division. 1700 West Avelake Ave N, Suite 500. Seattle, WA 98109.

38. Davison, A.C., & Hinkley, D.V. (1997) Bootstrap Methods and their Applications. Cambridge University Press.

39. Efron, B. (1979) Bootstrap methods: another look at the jackknife. Ann. Statist., 7: 1-26.

40. Liu, J.P., Ma, M.C., & Chow, S.C. (1997) Statistical evaluation of similarity factor f2 as a criterion for assessment of similarity between dissolution profiles. Drug Info. J., 31: 1255-1271.