

ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE GRANULOCITOS EN BOLSAS PLÁSTICAS FLEXBOY.

Danae Fernández^{1*}, Orestes D. López¹, Carmen D. Pino¹, Ernesto R. Fernández².

¹Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador

²Centro Nacional de Biopreparados, Cuba

*email: dfdezr78@yahoo.es, da.fernandez@uta.edu.ec

Resumen

Se realizó un estudio de estabilidad del Ingrediente Farmacéutico Activo el rG-CSF en bolsas plásticas flexibles de etil vinil acetato de 50 mL, estériles y listas para el uso, proveedor STEDIM, con el objetivo de establecer el período de validez en este sistema de envase a la temperatura de 2-8°C. Las muestras fueron tomadas de tres lotes producidos a escala industrial que cumplieron los requisitos de calidad especificados por control de la calidad. El producto muestreado fue ensayado de acuerdo al Cronograma de Ensayos de Estabilidad en los tiempos: 0, 4, 8 y 12 meses. Fueron realizados los ensayos siguientes: Características Organolépticas, Actividad Biológica, Concentración de Proteínas, Focalización Isoeléctrica, Electroforesis, Western Blotting, HPLC, pH, Esterilidad y Pirógenos. Todos los resultados obtenidos en cada ensayo cumplieron con el criterio de aceptación para este producto sin presentar diferencias significativas entre las medias obtenidas en cada análisis, por lo que se puede afirmar que el Ingrediente Farmacéutico Activo de rG-CSF es estable en bolsas durante 12 meses. El nuevo sistema de envase aseguró la esterilidad de este producto parenteral, así como su estabilidad física y química durante su conservación.

Palabras clave: rG-CSF, Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos, FLEXBOY, IFA, estudios de estabilidad

STUDY OF STABILITY OF THE GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR (RG-CSF) IN FLEXBOY PLASTIC BAGS

Abstract

A stability study of the Active Pharmaceutical Ingredient of the rG-CSF in sterile ready-to-use 50 mL ethyl vinyl acetate flexible plastic bags, STEDIM supplier, with the aim of establishing the shelf life in this packaging system at 2-8 °C. Samples were taken from three batches produced at industrial scale that met the quality requirements specified by quality control. The sampled product was tested according to the Stability Testing Schedule at the times: 0, 4, 8 and 12 months. The following tests were performed: Organoleptic Characteristics, Biological Activity, Protein Concentration, Isoelectric

Targeting, Electrophoresis, Western Blotting, HPLC, pH, Sterility and Pyrogens. All the results obtained in each assay met the acceptance criterion for this product without presenting significant differences between the means obtained in each analysis, so it can be stated that the rG-CSF API is stable in this kind of bags for 12 months. The new packaging system ensured the sterility of this parenteral product, as well as its physical and chemical stability during its conservation.

Key words: rG-CSF, recombinant Granulocyte Colony Stimulating Factor, FLEXBOY bags, Active Pharmaceutical Ingredient, stability studies.

Introducción

El rG-CSF es el Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos obtenido por vía recombinante, constituyendo el Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) del ior® LeukoCIM, este es un biosimilar del Neupogen® producido por la Empresa Farmacéutica Amgen. Es un producto de alto potencial terapéutico utilizado durante la quimioterapia del cáncer (1) ya que regula la producción de neutrófilos en la médula ósea (2), ocupando un lugar importante dentro de los productos biotecnológicos en el mercado mundial. Se obtiene a partir de la bacteria *Escherichia coli* en la cual se insertó un plásmido que codifica para la expresión del rG-CSF. La proteína expresada por las bacterias se encuentra como cuerpos de inclusión, que posteriormente a través de la lisis celular son recuperados y disueltos en un medio apropiado. A partir del procesamiento de los cuerpos de inclusión se obtiene la materia prima activa para la purificación y formulación de la solución parenteral para el rG-CSF (3).

Para la liberación de los lotes de IFA y su comercialización, es necesario que cumplan con los criterios de aceptación para los Requisitos de Calidad presentes en su especificación. Fue factible utilizar en su almacenamiento las bolsas plásticas de etil vinil acetato, por lo que fue necesario realizar un estudio de estabilidad a tiempo real en este sistema de envase a la temperatura de 2- 8 °C para predecir el período de validez de este producto (4) ya que las proteínas son moléculas sensibles a la interacción contenedor/cierre.

De acuerdo a Weitbrecht, Kallmeyer (5) estas bolsas de bioprocesamiento Flexboy® están diseñadas para la preparación, el almacenamiento y el transporte de soluciones biofarmacéuticas, productos intermedios y productos finales a granel. Este envase no contiene extractables tóxicos para el organismo humano, proporcionan una alternativa de un solo uso a los recipientes de vidrio, acero inoxidable y plástico rígido tradicionales en una gran variedad de aplicaciones, proporcionando una fácil manipulación y esterilidad para el IFA (5).

Materiales y Métodos

En el estudio se utilizaron muestras tomadas de modo aleatorio provenientes de 3 lotes de IFA que cumplieron con los requisitos de calidad, envasadas en bolsas plásticas flexibles FLEXBOY de etil

vinil acetato de 50 mL, estériles y listas para el uso, proveedor STEDIM, y conservadas a la temperatura de 2-8 °C. Se realizaron los siguientes ensayos: Características Organolépticas, Concentración de Proteínas, pH, Focalización Isoeléctrica, Electroforesis, Cromatografía Líquida de Alta Resolución, Actividad Biológica, Western Blotting, Esterilidad y Pirógenos en los tiempos 0, 4, 8 y 12 meses, de acuerdo con el Cronograma de Ensayos de Estabilidad, para verificar el cumplimiento de los requisitos de calidad durante su conservación (6).

Técnicas analíticas

Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS- PAGE): Se realizó por un Sistema de Buffer discontinuo en Gel de Poliacrilamida en presencia de Dodecil Sulfato Sódico (SDS-PAGE). El método consistió en la separación de las proteínas por su peso molecular al aplicar una corriente eléctrica alterna, utilizando un patrón de G-CSF de 18 800 Da con un 99% de pureza.

Western Blotting: Está técnica se utilizó para la identificación de proteínas que luego de ser transferidas a una membrana son reveladas con un anticuerpo monoclonal específico para rh-G-CSF.

Focalización isoelectrica: Fue identificada la proteína mediante su punto isoelectrico (pI), separándolas por su diferente distribución de cargas eléctricas utilizando un gradiente de pH entre 5 y 8. El Neupogen® presenta un punto isoelectrico de 6,0 (7), en correspondencia el criterio de aceptación del IFA para este ensayo fue de $6,1 \pm 0,15$.

Concentración de proteínas: Se realizó mediante el método de absorción ultravioleta, utilizando el principio de la ley de Lambert-Beer que establece que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración. Los residuos aromáticos correspondientes a la fenilalanina, triptófano y tirosina absorben entorno a los 260-290 nm. La fenilalanina sólo absorbe de 250 a 260 nm y su contribución es muy pequeña, por tanto la señal a 280 nm es debido a los residuos aromáticos de tirosina y triptófano (8).

Fue considerado valores aceptables de concentración de proteínas mayores o iguales a 1 mg/mL.

Actividad biológica: Se fundamentó en la capacidad del rG-CSF de estimular la formación de colonias diferenciadas de las células progenitoras de la médula ósea, conociendo que éste producto estimula la producción de un linaje específico y produce colonias de granulocitos. Se consideraron valores aceptables los que cumplen con el criterio de aceptación de 30 ± 9 UI/vial (9).

Análisis potenciométrico (pH): Se realizó la potenciometría, utilizando un pHmetro calibrado con buffers de pH 4 y 7. Los valores de pH que se obtuvieron entre 3,8 y 4,2 fueron considerados aceptables según la especificación del producto.

Cromatografía en fase reversa: Se utilizó esta técnica cromatográfica para cuantificar la presencia de productos de degradación en el rG-CSF debido al nuevo sistema de envase (10).

Cromatografía en gel filtración: La columna fue calibrada con estándares de peso molecular, se

determinó el peso molecular de la sustancia en análisis, comparando con la sustancia de referencia. La proteína pudo sufrir modificaciones transduccionales durante la fermentación, purificación y conservación que afectarían su actividad biológica. Mediante esta técnica se determinó si existía la presencia de agregados en el IFA (11).

Características Organolépticas: Se realizó la inspección visual para comprobar si el IFA se mantiene como un líquido transparente e incoloro, libre de partículas.

Esterilidad: Se determinó si existía presencia de microorganismos viables en el IFA mediante la filtración de una muestra de este a través de una membrana, se analizó al inicio y a los 12 meses, de acuerdo a lo reportado en la USP 24 (12).

Pirógenos: Fue realizada para detectar un nivel aceptable de riesgo de reacciones febriles concerniente al producto objeto de análisis en los pacientes a los que se les suministrará el IFA de rG-CSF en forma parenteral, en correspondencia con la USP 24. El producto cumplirá con los requerimientos de ausencia de pirógenos, si ningún conejo muestra un incremento de la temperatura individual de 0,5°C o más, por encima de su temperatura control, y si la suma de los 3 incrementos individuales de temperatura máximos, no excede de 1,4°C (12).

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados estadísticamente con el Software STATGRAPHICS CENTURION versión 17.1.12. Este sistema comparó las medias de los valores obtenidos para los ensayos: Concentración de Proteínas, pH, Focalización Isoeléctrica, Electroforesis, Cromatografía Líquida de Alta Resolución, Actividad Biológica, en los tiempos: 0, 4, 8 y 12 meses mediante la prueba de Análisis de varianza, calculando el valor de F para determinar si existieron diferencias significativas entre estas.

Resultados y Discusión

Resultados

Los resultados del estudio de estabilidad se muestran en la tabla 1, donde se observa que los valores obtenidos en cada ensayo, para los tres lotes en estudio, cumplieron con el límite especificado durante los 12 meses. Se demostró con el análisis estadístico que no existieron diferencias significativas entre los valores obtenidos en cada tiempo por cada lote.

Tabla 1. Resultados obtenidos en el estudio de estabilidad

Ensayo/Método a ser aplicado		Tiempo cero	Tiempo 4 meses	Tiempo 8 meses	Tiempo 12 meses	Criterio de aceptación
Características organolépticas	Lote 1	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Líquido transparente e incoloro, libre de partículas sedimentadas.
	Lote 2	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	
	Lote 3	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	
Concentración de Proteínas	Lote 1	1,7	1,62	1,72	1,58	$\geq 1 \text{ mg/mL}$
	Lote 2	1,4	1,38	1,41	1,36	
	Lote 3	1,3	1,4	1,33	1,36	
pH	Lote 1	4,0	4,08	4,03	3,98	$4 \pm 0,2$
	Lote 2	4,1	3,99	4,06	4,05	
	Lote 3	4,0	4,1	4,03	4,12	
Cromatografía en Fase Reversa	Lote 1	98,4	98,63	98,53	98,24	$\geq 95 \%$
	Lote 2	99,3	98,46	98,26	97,62	
	Lote 3	99,3	98,9	98,06	98,34	
Cromatografía en Gel Filtración	Lote 1	98,2	97,44	97,83	97,47	$\geq 95 \%$
	Lote 2	99,0	98,03	98,00	97,81	
	Lote 3	99,3	99,15	98,54	98,70	
Actividad biológica	Lote 1	30	30	26	31	$30 \pm 9 \text{ UI/vial}$
	Lote 2	34	28	35	25	
	Lote 3	28	30	26	28	
Focalización Isoeléctrica	Lote 1	5,99	6,04	6,12	6,03	$6,1 \pm 0,15$
	Lote 2	5,99	6,05	6,14	6,03	
	Lote 3	6,06	6,01	6,03	6,01	
Electroforesis	Lote 1	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Corresponde con el patrón
	Lote 2	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	
	Lote 3	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	
Western Blotting	Lote 1	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Corresponde con el patrón
	Lote 2	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	
	Lote 3	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	
Esterilidad	Lote 1	Cumple	-	-	Cumple	Estéril
	Lote 2	Cumple	-	-	Cumple	
	Lote 3	Cumple	-	-	Cumple	
Pirógenos	Lote 1	Cumple	-	-	Cumple	Apirogénico
	Lote 2	Cumple	-	-	Cumple	
	Lote 3	Cumple	-	-	Cumple	

En la electroforesis se comprobó la presencia de una única banda en el gel que corresponde con igual peso molecular que el patrón utilizado de 18 800 Da, no detectándose la presencia de agregados, manteniendo igual comportamiento que el reportado por Herman, Boone (7) en la

caracterización del NEUPOGEN® (FILGRASTIM). Este fue identificado contra un anticuerpo específico mediante Western Blotting.

A través de Focalización isoelectrica se obtuvo una banda mayoritaria a un punto isoelectrico que corresponde con valores entre $6,1 \pm 0,15$ en las muestras analizadas, cumpliendo con el criterio de aceptación especificado para este producto, además coincide con el valor obtenido para el Neupogen®. En la tabla 2 se observa un valor-P de la razón-F mayor o igual que 0,05, por lo que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre las medias obtenidas en cada tiempo ensayado, con un nivel del 95% de significación.

Tabla 2. Análisis de varianza para la focalización isoelectrica

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0130917	3	0,00436389	3,12	0,0882
Intra grupos	0,0112	8	0,0014		
Total	0,0242917	11			

Todas las determinaciones de concentración de proteínas realizadas a los tres lotes en estudio alcanzaron valores superiores a 1 mg/mL, cumpliendo con el límite planteado en la especificación, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los 4 tiempos para un nivel del 95% de significación (tabla 3).

Tabla 3. Análisis de varianza para la concentración de proteínas

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0044	3	0,00146667	0,05	0,9846
Intra grupos	0,239267	8	0,0299083		
Total	0,243667	11			

Durante los 12 meses el rG-CSF conservó la actividad biológica presentando en los tres lotes valores aceptables que cumplen con el criterio de aceptación, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los 4 tiempos con un nivel del 95% de significación (tabla 4).

Tabla 4. Análisis de varianza para la actividad biológica

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	10,9167	3	3,63889	0,31	0,8165
Intra grupos	93,3333	8	11,6667		
Total	104,25	11			

En los resultados de pH se muestra en la tabla 5 que no existieron diferencias estadísticamente

significativas entre las medias de los cuatro tiempos con un nivel del 95% de significación durante los 12 meses del estudio.

Tabla 5. Análisis de varianza para el pH

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0055	3	0,00183333	0,80	0,5265
Intra grupos	0,0182667	8	0,00228333		
Total	0,0237667	11			

En ambas cromatografías se obtuvo una banda que corresponde mayor al 95 % siempre en la misma posición y sin observar la presencia de picos adicionales en las muestras analizadas. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tiempos muestreados para un nivel del 95% de significación.

Discusión

Se comprobó e identificó la presencia del rG-CSF, sin existir desamidación, esta es una reacción muy probable que ocurra debido a cambios en el aminoácido glutamato por glutamina en la posición 68 de la cadena aminoacídica (7).

Con la cromatografía en fase reversa se demostró que no existió degradación de la proteína durante la conservación; no hubo presencia de agregados, ni modificaciones postraduccionales en la proteína durante la conservación lo que fue demostrado con el HPLC su estabilidad química.

De acuerdo a los resultados obtenidos se propone que el Ingrediente Farmacéutico Activo de rG-CSF se puede envasar en bolsas plásticas flexibles de etil vinil acetato a la temperatura de 2-8 °C durante 12 meses, ya que cumplió con los criterios de aceptación para los requisitos de calidad evaluados en los tres lotes, comprobándose que este envase lo mantiene apirogénico y estéril, conservando su actividad biológica y manteniéndose como un líquido transparente e incoloro.

Literatura Citada

1. Li L, Qi X, Sun W, Abdel-Azim H, Lou S, Zhu H, et al. Am80-GCSF synergizes myeloid expansion and differentiation to generate functional neutrophils that reduce neutropenia-associated infection and mortality. *EMBO Molecular Medicine*. 2016;8(11):1340-59.
2. Averbuch D, Engelhard D, Pegoraro A, Cesaro S. Review on efficacy and complications of granulocyte transfusions in neutropenic patients: EBMT educational meeting from the severe aplastic anaemia and infectious diseases working parties, Naples, Italy, 2014. *Current Drug Targets*. 2016;17(10).

3. Rathore AS. Quality by Design (QbD)-Based Process Development for Purification of a Biotherapeutic. *Trends in Biotechnology*. 2016;34(5):358-70.
4. Liu W, Hsu JC, Bretz F, Hayter AJ, Han Y. Shelf-life and its estimation in drug stability studies. *Journal of Applied Statistics*. 2014;41(9):1989-2000.
5. Weitbrecht T, Kallmeyer G, Klotz U, Posset T, Mang A. Use of disposables in the pharmaceutical parenterals production. *Pharmazeutische Industrie*. 2013;75(11):1810-23.
6. ICH ICH Harmonised Tripartite Guideline. Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2). 2003: 18.
7. Herman AC, Boone TC, Lu HS. Characterization, formulation, and stability of Neupogen (Filgrastim), a recombinant human granulocyte-colony stimulating factor. *Pharmaceutical biotechnology*. 1996;9:303-28.
8. Pérez N, Cruz Y, Moya G, Costa L, Betancourt L, Besada V, et al. Structural characterization of granulocyte colony stimulating factor, Hebervital. *VacciMonitor*. 2014;23(1):3-10.
9. Chaviano MG, Naranjo NL, Vaquer AP, Castro ER. Estudio de Validación de un Sistema in vitro con Timidina Tritiada para la Evaluación Biológica del Factor Estimulador de Colonias Granulocíticas (ior® LeukoCIM). *Revista Cubana de Química*. 2007;19(1):26-8.
10. Nupur N, Singh SK, Narula G, Rathore AS. Assessing analytical comparability of biosimilars: GCSF as a case study. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2016;1032:165-71.
11. Shahbazi M, Tamaskany Zahedy E, Kiumarsi S, Hadi Soltanabad M, Shahbazi Azar S, Amini H. Determination of pegfilgrastim aggregates by size-exclusion high-performance liquid chromatography on a methacrylate-based column. *Biologicals*. 2017;46:153-8.
12. USP USP 24. The United States pharmacopeia. NF 19. The national formulary. Rockville. Us. United States Pharmacopeial Convention, Inc: United States Pharmacopeial Convention Inc.. Rockville; 2000.

Material Suplementario

Tabla 1: Resultados de la Focalización Isoeléctrica ($6,1 \pm 0,15$).

Lotes	T=0 meses	T= 4 meses	T= 8 meses	T= 12 meses
1	5,99	6,04	6,12	6,03
2	5,99	6,05	6,14	6,03
3	6,06	6,01	6,03	6,01

Resumen Estadístico

	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
0 Meses	3	6,01333	0,0404145	0,672082%	5,99	6,06	0,07
4 Meses	3	6,03333	0,0208167	0,345028%	6,01	6,05	0,04
8 Meses	3	6,09667	0,0585947	0,961093%	6,03	6,14	0,11
12 Meses	3	6,02	0,01	0,166113%	6,01	6,03	0,02
Total	12	6,04083	0,0469929	0,777921%	5,99	6,14	0,15

	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
0 Meses	1,22474	
4 Meses	-0,914531	
8 Meses	-1,06618	
12 Meses	0	
Total	1,70408	0,609631

Tabla 2: Resultados del ensayo de Concentración de proteínas (≥ 1 mg/mL).

Lotes	T= 0 meses	T= 4 meses (5-02-07)	T= 8 meses (Abril-Mayo 2007)	T= 12 meses (13-07-07)
1	1,7	1,62	1,72	1,58
2	1,4	1,38	1,41	1,36
3	1,3	1,4	1,33	1,36

Resumen Estadístico

	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
0 meses	3	1,46667	0,208167	14,1932%	1,3	1,7	0,4
4 meses	3	1,46667	0,133167	9,07954%	1,38	1,62	0,24
8 meses	3	1,48667	0,205994	13,8561%	1,33	1,72	0,39
12 meses	3	1,43333	0,127017	8,86166%	1,36	1,58	0,22
Total	12	1,46333	0,148834	10,1709%	1,3	1,72	0,42

	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
0 meses	0,914531	
4 meses	1,19374	
8 meses	1,02023	
12 meses	1,22474	
Total	1,18975	-0,670021

Tabla 3: Resultados de la Actividad Biológica (30 ± 9 UI/vial).

Lotes	T= 0 meses	T= 4 meses (5-02-07)	T= 8 meses (Abril-Mayo 2007)	T= 12 meses (13-07-07)
1	30	30	26	31
2	34	28	35	25
3	28	30	26	28

Resumen Estadístico

	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
0 meses	3	30,6667	3,05505	9,96212%	28,0	34,0	6,0
4 meses	3	29,3333	1,1547	3,93648%	28,0	30,0	2,0
8 meses	3	29,0	5,19615	17,9178%	26,0	35,0	9,0
12 meses	3	28,0	3,0	10,7143%	25,0	31,0	6,0
Total	12	29,25	3,07852	10,5248%	25,0	35,0	10,0

	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
0 meses	0,6613	
4 meses	-1,22474	
8 meses	1,22474	
12 meses	0	
Total	0,807057	-0,160995

- Tabla 4: Resultados de las determinaciones de pH ($4 \pm 0,2$).

Lotes	T=0 meses	T= 4 meses (5-02-07)	T= 8 meses (Abril-Mayo 2007)	T= 12 meses (13-07-07)
G06IFA022	4,0	4,08	4,03	3,98
G06IFA023	4,1	3,99	4,06	4,05
G06IFA024	4,0	4,1	4,03	4,12

Resumen Estadístico

	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
0 Meses	3	4,00333	0,0057735	0,144217%	4,0	4,01	0,01
4 Meses	3	4,06	0,06245	1,53818%	3,99	4,11	0,12
8 Meses	3	4,04	0,0173205	0,428725%	4,03	4,06	0,03
12 MESES	3	4,05	0,07	1,7284%	3,98	4,12	0,14
Total	12	4,03833	0,0464823	1,15103%	3,98	4,12	0,14

	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
0 Meses	1,22474	
4 Meses	-0,914531	
8 Meses	1,22474	
12 MESES	0	
Total	0,843188	-0,557694

Fase reversa

Resumen Estadístico

	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
0 meses	3	99,0	0,519615	0,524864%	98,4	99,3	0,9
4 meses	3	98,6633	0,221886	0,224892%	98,46	98,9	0,44
8 meses	3	98,4633	0,179536	0,182338%	98,26	98,6	0,34
12 meses	3	98,0667	0,390043	0,397732%	97,62	98,34	0,72
Total	12	98,5483	0,464813	0,47166%	97,62	99,3	1,68

	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
0 meses	-1,22474	
4 meses	0,467233	
8 meses	-1,01864	
12 meses	-1,1348	
Total	0,0418401	0,52539

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,36937	3	0,456456	3,63	0,0645
Intra grupos	1,0072	8	0,1259		
Total (Corr.)	2,37657	11			

Fase normal

Resumen Estadístico

	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
0 meses	3	98,8333	0,568624	0,575336%	98,2	99,3	1,1
4 meses	3	98,2067	0,868581	0,884442%	97,44	99,15	1,71
8 meses	3	98,0233	0,505404	0,515596%	97,53	98,54	1,01
12 meses	3	97,9933	0,635164	0,648171%	97,47	98,7	1,23
Total	12	98,2642	0,663948	0,675676%	97,44	99,3	1,86

	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
0 meses	-0,85253	
4 meses	0,62043	
8 meses	0,146592	
12 meses	0,841927	
Total	0,383247	-0,95863

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,37582	3	0,458608	1,06	0,4196
Intra grupos	3,47327	8	0,434158		
Total (Corr.)	4,84909	11			