

28
2 es.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

DESARROLLO DE UN METODO
ESPECTROFOTOMETRICO CONFIABLE PARA
CUANTIFICAR LA CANTIDAD DE SULFAMETAZINA
SODICA LIBERADA EN EL PROCESO DE
DISOLUCION DE BOLOS DE LIBERACION
CONTROLADA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
MARGOT GOMEZ MIRON

ASESORES: O.F.B. JOSE ANTONIO GARDUÑO ROSAS.
DRA. RAQUEL LOPEZ ARELLANO.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1998

TESIS CON
F

260663



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



ACADEMIA NACIONAL
DE ESPAÑA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Ratael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Desarrollo de un Método Espectrofotométrico Confiable para
Cuantificar la Cantidad de Sulfametazina Sódica Liberada en el
Proceso de Disolución de Bolos de Liberación Controlada

que presenta la pasante: Margot Gómez Mirón
con numero de cuenta: 8907811-0 para cotener el TITULO de:
Química Farmacéutica Biólga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 6 de enero de 1998

PRESIDENTE	<u>M.en C. Guadalupe Pérez Caballero.</u>	
VOCAL	<u>M.en C. Vicente Alonso Pérez.</u>	
SECRETARIO	<u>Q.F.B. José A. Garduño Rosas.</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Elia Granados Enriquez.</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>en C. Efrén Hernández Baltazar.</u>	

A TI DIOS, A MIS PADRES Y MIS HERMANOS,

**PORQUE SIEMPRE ESTÁN CONMIGO,
MI ETERNO AGRADECIMIENTO.**

**" SI TE ATRAE UNA LUCECITA, SÍGUELA. SI TE CONDUCE AL PANTANO
YA SALDRÁS DE ÉL. PERO SI NO LA SIGUES, TODA LA VIDA TE
MORTIFICARÁS PENSANDO QUE ACASO ERA TU ESTRELLA ".**

Séneca
Filósofo y escritor Hispanorromano.



AGRADECIMIENTOS.

**CON RESPETO Y ADMIRACIÓN A LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO y FUNDACIÓN UNAM;
que me otorgaron el beneficio de escalar un peldaño más en mi formación.**

A mis maestros de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, de manera muy especial a los profesores:

Enrique Ángeles, Guadalupe Sevilla, José Proal,
Marcela Hernández, Luisa Martínez, Ma. Eugenia Posadas;
por todo lo bueno que dejaron en mí

A mis asesores de tesis:

QFB José Antonio Garduño Rosas y Dra. Raquel López Arellano
por su confianza, apoyo y dirección.

A mis sinodales:

M. en C. Guadalupe Pérez Caballero, M. en C. Vicente Alonso Pérez,
QFB Elia Granados Enríquez, M. en C. Efrén Hernández Baltazar.
por sus valiosos consejos y el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo

A todos mis compañeros de la generación 19a de Q.F.B., en especial a:

Ma. Dolores Aguilar, Ana Belém Trujeque y Miguel Ángel Rafael;
por su compañía y apoyo en mi formación profesional y personal.

Un muy especial agradecimiento a:

Rocío Medina, David Esparza, Enrique Ramos, Angélica Mendoza,
Elizabeth García, Marina Álvarez, Sara Isidro, Cláudia Nieto, Mariela Narvaez,
profra. Martha García y prof. Efrén Hernández
*porque su amistad y sus consejos me dieron la fuerza que necesitaba,
¡ GRACIAS POR HACERME LA VIDA MÁS FELIZ !*

A todas aquellas personas que de una u otra forma ayudaron a la realización de este trabajo

RECONOCIMIENTOS.

Hacemos un especial reconocimiento a las siguientes organizaciones por su apoyo para la realización de este trabajo:

- **Fundación UNAM (FUNAM).**
- **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, Sección de Tecnología farmacéutica**
- **UNAM, a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT).**
- **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).**
- **Importadora y Manufacturera BRULUAR.**
- **HELM de México S. A.**
- **INTERNATIONAL CHEMICA CARTER.**

A todos ellos, MIL GRACIAS.



Índice.



ÍNDICE.

INTRODUCCIÓN.....	i
OBJETIVOS.....	iii
CAPÍTULO 1: "DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS."	
1) GENERALIDADES SOBRE EL DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	2
2) DESARROLLO DE PRUEBAS DE DISOLUCIÓN.	
2.1) ESTABLECIMIENTO DE PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS.....	5
2.2) MÉTODOS ANALÍTICOS DE CUANTIFICACIÓN	6
2.2.1) Métodos Espectrofotométricos UV-VIS.....	8
2.2.2) Métodos por espectrofotometría derivativa.....	10
2.2.3) Modelo de Mínimos Cuadrados Parciales.....	14
2.3) CONDICIONES PARA LAS PRUEBAS DE DISOLUCIÓN.....	20
2.4) LIBERACIÓN DE FÁRMACOS DE SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA (SLC) TIPO MATRIZ.....	25
2.5) ESTUDIOS DE DISOLUCIÓN DE SLC (BOLOS) EN RUMIANTES.....	27
3) VALIDACIÓN DE PRUEBAS DE DISOLUCIÓN.	
3.1) LA NECESIDAD DE LA VALIDACIÓN. DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	29
3.2) EL PROCESO DE VALIDACIÓN.....	29
3.3) CONSIDERACIONES EN MÉTODOS ANALÍTICOS.....	30
4) PROPIEDADES FISCOQUÍMICAS. DE LA SULFAMETAZINA.....	32

HIPÓTESIS.....	36
CAPÍTULO 2: “DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO”.....	38
1) EQUIPO Y REACTIVOS.....	
1.1) REACTIVOS.....	39
1.2) MATERIAL Y EQUIPO.....	40
2)PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS REALIZADOS PARA DESARROLLAR EL MÉTODO.....	41
3)CONDICIONES FINALES PARA EL ANÁLISIS.....	60
CAPÍTULO 3: “OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO”.....	61
1) OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO.....	63
1.1) LINEALIDAD DEL SISTEMA.....	63
1.2) LINEALIDAD DEL MÉTODO.....	66
1.3) PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO.....	71
1.4) CONDICIONES ÓPTIMAS.....	76
2) ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS.....	77
3) REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO.....	83
4) ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO.....	85
CONCLUSIONES.....	89
APÉNDICES.....	91
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y HEMEROGRÁFICAS.....	95

Introducción.



INTRODUCCIÓN.

Para el hombre la cabra constituye una de las especies domésticas más importantes, ya sea como fuente de alimento (carne y leche), para su vestimenta (pelos y pieles) así como para el control de las malas hierbas y como productores de abono orgánico de alta calidad y aún como animal de ornato, por lo que representa una parte importante de la economía de los ganaderos.

Estos animales como otros animales de engorda, pueden padecer coccidiosis, enfermedad infecciosa y contagiosa. En la ganadería mexicana, esta infección ha tenido un considerable impacto económico al ocasionar altos índices de morbilidad y mortalidad del ganado. Algunos de los costos adicionales a la enfermedad son: antibióticos, desinfectantes, equipo especial, salarios de profesionales de la salud, salarios de los vigilantes, costo de administración, entre otros.

Las sulfonamidas son agentes quimioterapéuticos activos que se han usado con éxito en las infecciones bacterianas y son de bajo costo. En el desarrollo de formas farmacéuticas y formulaciones que contengan éste fármaco se requiere como parte importante el establecimiento y uso de las pruebas de disolución ya que la cuantificación confiable del fármaco liberado, durante el proceso de disolución, proporciona ayuda para:

- ◊ Guiar el desarrollo del proceso/formulación y optimización.
- ◊ Monitorear el desempeño del proceso de manufactura durante el desarrollo y aprobación del producto
- ◊ Asegurar equivalencia de lote a lote.

En el presente trabajo se muestra la obtención de un método de análisis espectrofotométrico confiable para la cuantificación de sulfametazina sódica liberada durante el estudio de disolución "in vitro" de bolos para cabras.

En el capítulo 1 se da un panorama general sobre el proceso de desarrollo y validación de métodos analíticos así como de los modelos de análisis espectrofotométricos que se reportan como herramientas útiles en la cuantificación; también se mencionan las características fisicoquímicas de la sulfametazina y de su sal sódica.

En el capítulo 2 se muestran los análisis espectrofotométricos que permitieron el desarrollo del método por el modelo de Mínimos Cuadrados Parciales para la cuantificación de sulfametazina sódica liberada, mientras que en el capítulo 3 se muestran los procedimientos y pruebas realizados para evaluar la confiabilidad del método establecido.

Al final del capítulo 3 se señalan las conclusiones a las que se llegaron a través del presente trabajo.



Objetivos.



OBJETIVO GENERAL:

Desarrollar un método espectrofotométrico para cuantificar la Sulfametazina Sódica liberada de bolos.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- ◊ Establecer un modelo que permita determinar la cantidad de Sulfametazina Sódica liberada durante el proceso de disolución.
- ◊ Determinar las condiciones espectrofotométricas óptimas para la determinación de Sulfametazina Sódica liberada de bolos.
- ◊ Validar el método espectrofotométrico establecido.

CAPÍTULO I

Desarrollo y Validación de Métodos Analíticos para Pruebas de Disolución.



(1) GENERALIDADES SOBRE EL DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

Los productos farmacéuticos, para ser aceptados en el mercado, requieren de métodos analíticos y clínicos que garanticen la calidad, funcionalidad y cumplimiento de las especificaciones establecidas. Con la evolución de las tecnologías analíticas, el QFB cuenta con una serie de herramientas que facilitan el proceso de desarrollo de métodos y su validación.

El desarrollo de métodos analíticos se refiere a los experimentos realizados para obtener el(los) procedimiento(s) capaz(es) de identificar y/o cuantificar una sustancia dada. Para ello el QFB debe determinar previamente:

- *los objetivos del método,
- *el analito de interés y
- *si existen métodos que puedan ser adaptados u optimizados,

todo lo cual sirve como una guía inicial para el desarrollo del método analítico.

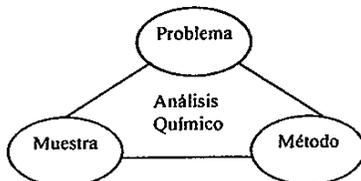
Una vez que ha sido determinado el método y su uso final, se puede empezar su desarrollo evaluando las propiedades físicas y químicas del analito en el sistema:

- 1) Propiedades fisicoquímicas relevantes
 - Solubilidad.
 - pKa.
 - Absortividad.
 - Coefficiente de absorptividad.
- 2) Estabilidad de las soluciones y muestras en diferentes condiciones ambientales (luz, temperatura, humedad).

Esto ayuda a definir si son necesarios solventes acuosos (ej. amortiguadores de pH), controles de temperatura, condiciones de luz reducida, etc.

Con todo esto, el analista elige las propiedades críticas del método y puede adicionalmente re-definirlo, o bien, puede optar por controlar dichas propiedades en los procedimientos del laboratorio (Riley C., 1994:316-367).

Finalmente, se debe tener siempre en mente que los tres componentes principales durante un proceso analítico son: el problema, la muestra y el método empleado; por lo que éstos deben permanecer conectados y optimizarse en conjunto (Eckschlager K., 1994:5-6):



Una vez que el método ha sido desarrollado, debe realizarse un estudio de validación antes de que el método pueda ser incluido en un documento regulatorio y sea usado. Las características del método que se evalúan en una validación varían dependiendo de los fines para los que fue creado dicho método.

En general el diseño de validación toma en cuenta algunos criterios como son:

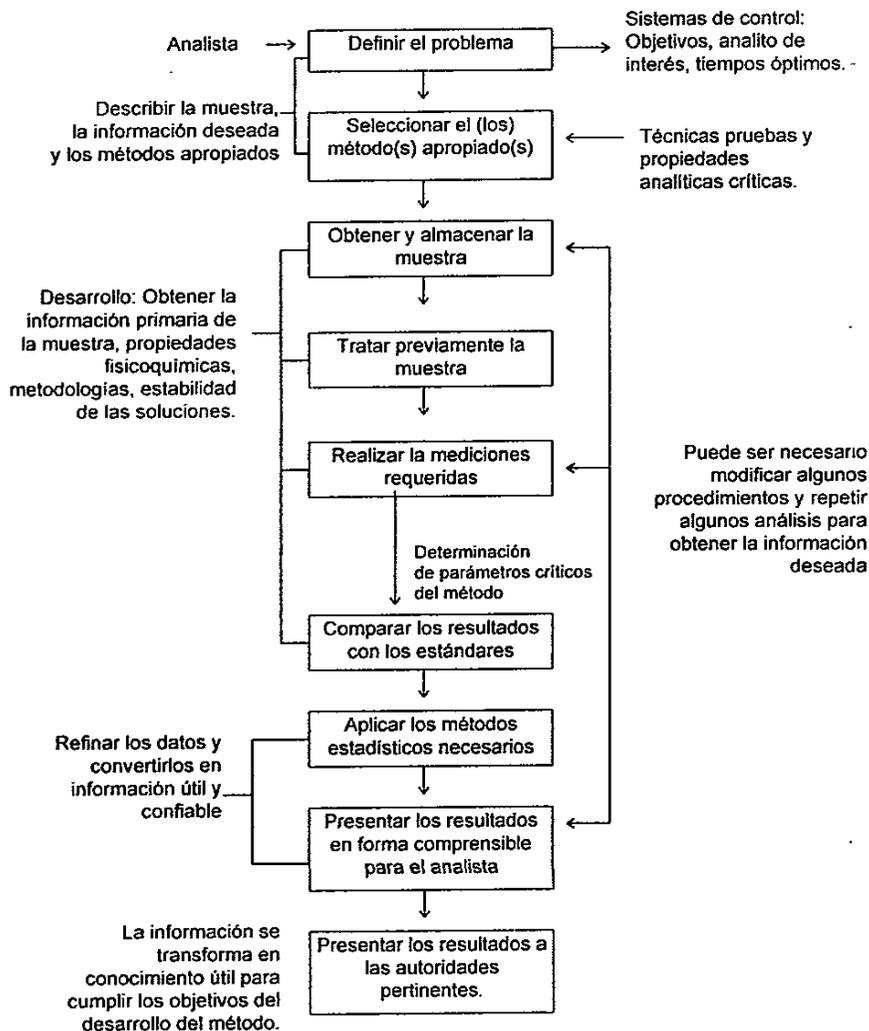
- que el método responda a los requerimientos regulatorios
- que genere la confianza requerida al incorporar el análisis estadísticos para evaluar sus cualidades (Riley C., 1994:316-367).

En el cuadro 1 se muestran algunas bases teóricas que pueden tomarse en cuenta durante el desarrollo de un método analítico, mientras que en el diagrama 1 se presentan las etapas principales en dicho desarrollo.

CUADRO I: Bases teóricas del análisis químico
(Eckschlager K., 1994:260).

FUNDAMENTOS GENERALES	FUNDAMENTOS ESPECÍFICOS
QUÍMICA. <ul style="list-style-type: none"> • Composiciones químicas. • Estructura de moléculas. 	MÉTODOS ANALÍTICOS <ul style="list-style-type: none"> • Basados en reacciones químicas. • Basados en interacciones físicas. • Basados en principios bioquímicos. • Basados en propiedades fisicoquímicas.
QUIMIOMETRÍA <ul style="list-style-type: none"> • Teorías de probabilidad. • Estadística. • Regresión y correlación • Análisis de datos. 	OPERACIONES ANALÍTICAS <ul style="list-style-type: none"> • Muestreo. • Separación. • Medición. • Estándares de calibración. • Procesamientos de señales.
	TÉCNICAS COMPUTACIONALES <ul style="list-style-type: none"> • Hardware. • Software.
	MANEJOS DE LABORATORIO, AUTOMATIZACIÓN.

DIAGRAMA 1: Etapas principales en el desarrollo de métodos analíticos (Willard H., 1991:5)



(2) DESARROLLO DE PRUEBAS DE DISOLUCIÓN.

(Skoug J., 1996:8-15)

El diseño y aplicación apropiada de las pruebas de disolución "in vitro" contribuyen en el desarrollo de un producto farmacéutico y forman parte del control de calidad del mismo ya que permiten:

- ◆ el seguimiento de los procesos de formulación,
- ◆ su optimización,
- ◆ el monitoreo del desempeño del proceso de manufactura,
- ◆ la disminución del riesgo de bioequivalencia de lote a lote y
- obtener la aprobación regulatoria del producto, entre otros⁽¹⁾

(2.1) ESTABLECIMIENTO DE PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS.

Como ya se mencionó, una de las primeras etapas en la selección y optimización de un método de cuantificación, es la recopilación de las propiedades físicas y químicas relevantes del compuesto de interés.

En el caso de las pruebas de disolución, algunas propiedades importantes son:

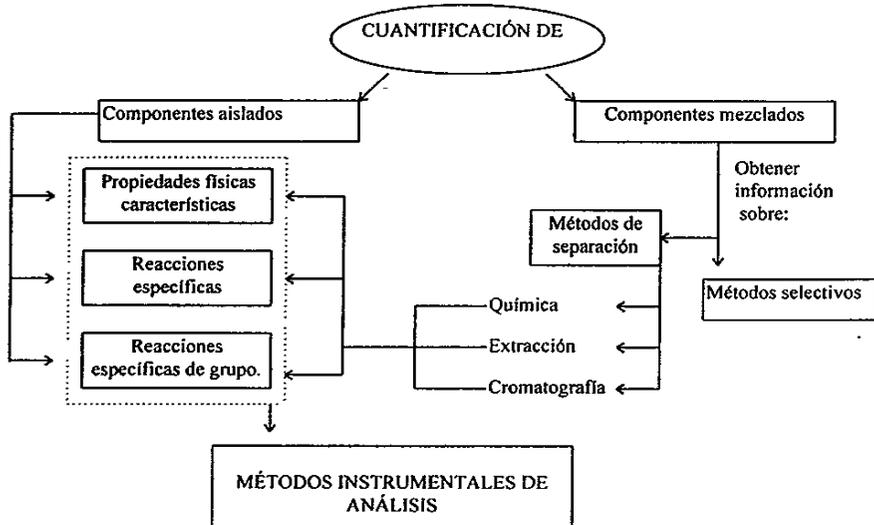
- *el pK_a ,
- *la solubilidad como una función del medio pH/tensoactivo,
- *la estabilidad de la solución muestra como una función del pH y
- *la estabilidad del fármaco en el medio de disolución.

Así por ejemplo, la presencia de impurezas más solubles que el fármaco de interés puede conducir a errores serios si se usa un ensayo no específico para determinar la cantidad disuelta; de igual forma la estabilidad de la solución muestra y del fármaco en el medio de disolución se deben considerar en el diseño de la prueba de disolución, ya que pueden limitar el intervalo de pH sobre el cual se optimiza la prueba (Skoug J., 1996:8-15).

En el diagrama 2 se sugieren algunos pasos previos al tratamiento de las muestras provenientes de una disolución para llegar a su cuantificación, ya sea que el analito de interés se encuentre formando parte de una mezcla (impurezas que generen interferencias o interacciones) o no.

(1) Idealmente, se recomienda que las pruebas de disolución se realicen en el sistema vivo. Sin embargo un sistema bien diseñado para pruebas de disolución "in vitro" puede proporcionar ventajas en el costo, tiempo y elaboración del análisis, en comparación con las pruebas "in vivo". (Banakar, 1992:16-17)

DIAGRAMA 2: Estrategias para el desarrollo de métodos y análisis químico
(Modificado de: Eckschlager K., 1994:46).



(2.2) MÉTODOS ANALÍTICOS DE CUANTIFICACIÓN

Una estrategia para escoger el método analítico consiste en seleccionar un conjunto de instrumentos que se encuentren disponibles en el laboratorio o con los que el analista esté familiarizado.

Los siguientes aspectos deben tomarse en cuenta:

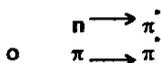
- ◆ La rapidez (duración del análisis).
- ◆ La confiabilidad (es decir que los resultados deben cumplir con las características adecuadas a la composición de la muestra y el propósito del análisis: precisión, exactitud, etc.).
- ◆ Los costos (el proceso completo debe ser económicamente ventajoso o al menos tolerable (Eckschlager K., 1994:160-168).

En la elección de un método para una prueba de disolución, se debe considerar la información relativa a las características espectrales, cromatográficas, electroquímicas y químicas del fármaco. El método debe ser lo suficientemente sensible para determinar el compuesto de interés en la muestra. Entonces y debido a la probabilidad de que las formulaciones cambien durante el desarrollo de un producto, se considera ventajoso emplear un procedimiento de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). Sin embargo, dada la facilidad de automatización y tiempos de análisis más rápidos, son más empleados los métodos de análisis espectrofotométricos para las pruebas de rutina de disolución de los productos. Así aunque existan cambios en la formulación, se considera que un programa de revalidación puede asegurar que no existan desviaciones provocadas por interferencias espectrales (traslapándose espectros o luz dispersa) durante el desarrollo del producto (Skoug J., 1996:8-15).

Los métodos de análisis espectrofotométricos, se basan en la medición de la radiación electromagnética absorbida o emitida por la materia. No se limitan al uso de la luz visible (VIS), si no que también incluyen a aquellas muestras que emplean energía radiante de otras regiones del espectro electromagnético, como la ultravioleta (UV) y el infrarrojo (IR).

Estas formas de radiación pueden describirse en función de dos modelos: el ondulatorio y el corpuscular. En el primer caso se describe a la radiación como ondas que viajan a la velocidad de la luz en el vacío (3×10^{10} cm/seg.), mientras que en el segundo caso se dice que la luz es un flujo de partículas (fotón) en donde cada una está asociada con una cantidad definida de energía.

La espectrofotometría UV es un método instrumental que mide las transiciones electrónicas en las moléculas y consiste en la transferencia de un electrón desde un orbital ocupado (n , σ , π) hasta otro de anti-enlace desocupado (σ^* , π^*). La cantidad de energía absorbida en la región ultravioleta del espectro depende de la estructura electrónica de la molécula, y corresponde a la promoción de los electrones desde orbitales en el estado basal a orbitales de energía en estado excitado.



La espectrofotometría analítica se basa en dos leyes fundamentales. La primera ley, atribuida a Bouger (1729), dice que la proporción de la luz absorbida en un medio es independiente de la intensidad de la luz incidente y que cada capa sucesiva del medio absorbe una fracción igual a la luz incidente. La segunda ley es la de Beer (1852) que introduce el concepto de número de entidades o moléculas absorbentes (la concentración).

La combinación de estos descubrimientos es conocida como la ley de Lambert-Beer, y es de gran uso en química analítica, quizás porque la dependencia de la absorbancia con la concentración es la que más se aplica.

La ecuación que describe a la ley de la absorción de la luz (Ley de Lambert-Beer) se expresa como:

$$A = \log (1/T) = \log (100/\%T) = K \cdot I \cdot C \quad (1)$$

donde

- A= absorbancia
- T= Transmitancia
- K= Coeficiente de absortividad
- I = Ancho de la celda⁽²⁾
- C= Concentración de la sustancia absorbente

El coeficiente de absortividad es una constante de proporcionalidad que varía con la longitud de onda de la radiación empleada y es una propiedad molecular de la especie que absorbe la luz.

La ley de Lambert-Beer presenta algunas limitaciones pues no toma en consideración los efectos del pH, temperatura e interacciones soluto-solvente, por lo que se aplica generalmente a soluciones diluidas en las que estas interacciones son insignificantes (Skoog D.A., 1986:160).

Dentro del análisis de disolución, en muchas ocasiones no es posible separar la lectura del analito de interés del resto de las sustancias. Con el objeto de resolver mezclas de componentes, se han empleados diversos métodos de análisis espectrofotométrico. En algunos se ha propuesto medir a una longitud de onda en la cual no contribuya(n) el (los compuesto(s) interferente(s); en otros casos el problema se resuelve planteando un conjunto de ecuaciones de cuya solución se obtengan los resultados deseados.

(2.2.1) MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-VIS.

Los cambios en una molécula ocasionados por la absorción de la luz, pueden ser electrónicos (cambio en la energía de los electrones distribuidos alrededor de los átomos de la molécula), vibracionales (cambios en la separación promedio de los núcleos de dos o más átomos) y rotacionales (rotación de un dipolo químico).

Para efectuar transiciones electrónicas (cambios), se requiere aplicar radiación de energía más alta que para realizar transiciones rotacionales o vibracionales.

Por consiguiente, las transiciones electrónicas son ocasionadas por absorción de la luz VIS y UV, en tanto que los cambios rotacionales y vibracionales son ocasionados por la absorción de radiación IR o de longitudes de onda mayor.

Para el caso de las moléculas que absorben en la región de UV-VIS son importantes los siguientes tipos de electrones:

(2) El ancho de la celda se expresa en centímetros, y generalmente tiene valor de 1, por lo que en dichos casos se omite y la ecuación final generada es $A = KC$.

- 1) Electrones de enlaces sencillos σ . Estos electrones están enlazados fuertemente, por lo que se requiere de gran energía para promoverlos a orbitales desocupados, por consiguiente su absorción se observa en el UV lejano (175-200 nm).
- 2) Electrones en orbitales p presentes en los dobles y triples enlaces. Estos enlaces p son más débiles que los σ por lo que se requiere de menos energía para la excitación de sus electrones.
- 3) Electrones de no enlace, conocidos como electrones n . Éstos contribuyen potencialmente en los rasgos espectrales distintivos de las moléculas que los poseen (Harris, D.C., 1992:451-473).

La absorción de la radiación por las moléculas, a longitudes de onda específicas, se utiliza frecuentemente para el análisis cuantitativo debido a la relación directa existente entre absorbancia y concentración (ec. 1). En espectrofotometría de absorción el primer paso, al desarrollar el método cuantitativo para determinar la concentración desconocida de una especie dada, es escoger la banda de absorción a la cual se realizarán las mediciones de absorbancia. Se obtiene el espectro de absorción VIS o UV de las especies que se van a determinar y se selecciona una longitud de onda de absorción conveniente por medio de una inspección del espectro obtenido.

La banda de absorción no debe traslaparse con bandas de absorción del disolvente o de posibles contaminantes o sustancias interferentes, incluyendo los reactivos en exceso que pueden encontrarse en la muestra. Existen muchos compuestos orgánicos que absorben fuertemente, sin embargo sólo un número limitado de iones inorgánicos lo hacen, por lo que normalmente se agrega una especie reactiva a la solución del ión inorgánico para que reaccione con él y, durante el proceso, se provoque un cambio marcado en las características del espectro de absorción.

Se supone que la absorptividad de una especie química es una constante característica a una longitud de onda determinada. El valor numérico de la absorptividad determina la pendiente de la curva analítica y tiene influencia sobre el intervalo de concentración en el que pueden realizarse las determinaciones analíticas.

Aunque muy pocas reacciones son específicas para una sustancia en particular, muchas reacciones pueden hacerse selectivas mediante la introducción de agentes enmascarantes, el control del pH, la extracción con disolventes, el ajuste del estado de oxidación o la remoción previa de interferentes.

Tanto el reactivo encargado de desarrollar color como el producto absorbente deben ser estables por un periodo de tiempo razonable. Siempre es aconsejable preparar y analizar los estándares y las muestras problema de acuerdo a un programa de tiempo definido (Willard H., 1991:159, 166, 167).

(2.2.2) MÉTODO POR ESPECTROFOTOMETRÍA DERIVATIVA.

(Willar H., 1991:174-176), (Rodríguez G.,1997:9-17), (Haver T.C., 1976:312-318)

Las principales ventajas del método derivativo son el mejoramiento en la detectabilidad de las características espectrales menores (por ejemplo los llamados codos) y, en el caso del análisis cuantitativo, la reducción potencial del error causado por "sobreposiciones" de espectros interferentes en la banda espectral del analito.

En éste tipo de espectrofotometría, se registran derivadas de primer orden a partir de la absorbancia con respecto a la variación de la longitud de onda.

$dA/d\lambda$ para la primera derivada

$d^2A/d\lambda^2$ para la segunda derivada.

Siendo A= absorbancia y λ = longitud de onda.

Con base en lo anterior, se puede decir que la primera derivada de un espectro de absorción, es la representación gráfica de la pendiente de la curva de absorción en cada longitud de onda del intervalo medido, o sea:

$\Delta A/\Delta\lambda$ Cuando $\Delta\lambda$ tiende a cero,

Podemos decir también que la primera derivada de un espectro de absorción es la velocidad de cambio en la absorción con respecto al cambio en la longitud de onda, mientras que la segunda derivada de un espectro de absorción, es la aceleración de cambio de la absorción con respecto al cambio en la longitud de onda.

Algunos autores consideran que en los espectros de primera derivada existe un valor máximo y un valor mínimo, pero en realidad el número de máximos y mínimos dependerá del tipo de espectro de absorción en estudio.

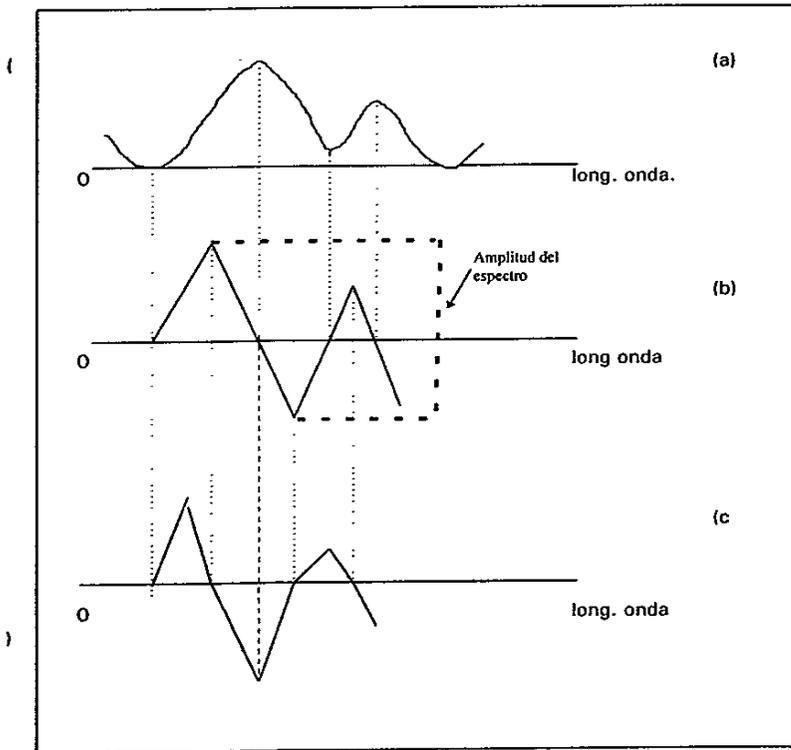
Si se supone que un espectro de absorción tiene un solo máximo y que cumple con las características de un pico Gaussiano (pico simétrico), al obtener la primera derivada del pico y la gráfica de dichos valores contra la longitud de onda, se observa que este espectro presenta un valor máximo y un valor mínimo para el primer pico. A la distancia vertical existente entre el máximo y el mínimo de la primera derivada, se le conoce con el nombre de amplitud del espectro de primera derivada. Esta distancia es proporcional a la concentración de la sustancia de estudio (fig. 1b).

Ahora, si se obtiene la segunda derivada del espectro de orden cero y se observa la gráfica con los valores de dicha derivada, se encuentra que el nuevo espectro presentará dos valores máximos y un valor mínimo (figura 1c). El valor mínimo de este espectro de derivada, se presenta a la misma longitud de onda a la cual se presenta el valor máximo de la absorción del espectro de orden cero.

La distancia vertical entre el valor mínimo y cualquiera de los valores máximos, siempre es proporcional a la concentración del analito en estudio.

FIGURA 1:

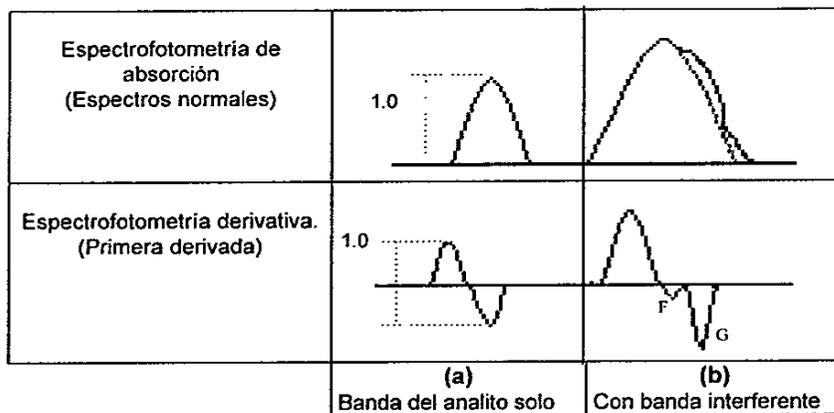
- (a) Espectro de orden cero, espectro común.
- b) Espectro de primera derivada.
- (c) Espectro de segunda derivada.



Además en el espectro de orden cero (**figura 2a**), se observa que éste puede constar de uno o más máximos de absorción; mientras que al analizar la primera derivada del espectro (**figura 2b**) vemos que hay un mayor número de características útiles en la cuantificación de dicha sustancia. Estas características están constituidas por las distancias verticales entre máximos y mínimos (EF, EG y FG).

De igual forma, en algunos casos al analizar la segunda derivada del espectro de absorción se observa que el número de características útiles para evaluar el analito se incrementan (aunque esto depende de la sustancia).

FIGURA 2: Espectrofotometría derivativa tanto para componentes solos como con sustancias interferentes



A partir de los componentes puros de la mezcla a analizar, se obtienen los valores absolutos de la derivada (ya sea de primer o segundo orden) y se realiza un análisis individual. Posteriormente se elige aquella longitud de onda a la cual el valor de derivada del componente cuya interferencia se desea evitar sea cero. Las medidas realizadas a esta longitud de onda en el espectro mezcla, podrán ser función solamente de la concentración del componente de interés (ver la figura 2). Ésto es particularmente útil cuando se presentan problemas de espectros de absorción de orden cero interferidos.

Para evaluar cuantitativamente la señal, una vez seleccionada la longitud de onda más adecuada, se compara la señal obtenida contra un estándar o se extrapola en una curva patrón obtenida de igual manera.

Cuando se emplea la técnica de espectrofotometría derivativa para la resolución de espectros traslapados (sobrepuestos), es de suma importancia considerar lo siguiente:

- La relación entre la altura de la banda que interfiere y la altura de la banda que se desea medir.
- La relación entre el ancho medio de la banda que interfiere y el ancho de la banda que se desea medir.
- Separación entre los máximos de absorción de los dos componentes en estudio.

Asimismo algunas de las ventajas que se obtienen con el empleo de la espectroscopia de derivadas son:

- a) Medida exacta de λ_{max} .
- b) Mejor resolución de los espectros.
- c) Análisis de muestras turbias.
- d) Determinaciones cuantitativas en sistemas de dos o más componentes.

(2.2.3.) MODELO DE MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES.

Como ya se ha mencionado los métodos espectrofotométricos frecuentemente presentan dificultades para encontrar las regiones de frecuencia donde el constituyente de interés absorbe o emite luz selectivamente. Sin embargo, con la técnica de Mínimos Cuadrados Parciales (MCP) la totalidad de los espectro pueden ser analizados simultáneamente, lo cual proporciona mayor selectividad y precisión en las determinaciones cuantitativas (Hagman A., 1990:2527-2545).

A continuación se da una introducción a ésta y otras técnicas que en conjunto forman los métodos conocidos como "Métodos de Multicomponentes"

La quimiometría se define como la aplicación de métodos matemáticos y estadísticos para el diseño o selección de procedimientos experimentales óptimos, a través del análisis de datos químicos.

Desde el punto de vista de la quimiometría, el proceso de análisis puede dividirse en dos etapas: 1) optimización/diseño experimental y 2) Análisis de multicomponentes.

A grosso modo, podemos decir que en el primer caso, se busca una alta eficiencia experimental al diseñar e implementar un análisis a partir de la recopilación de información útil.

El análisis de multicomponentes tiene una amplia aplicación dentro del análisis farmacéutico, el desarrollo de procesos y formulaciones; asimismo es una herramienta en la caracterización de partículas, el establecimiento de porcentajes de disolución y estudios de permeabilidad, entre otras aplicaciones (Hagman A., 1990:2527-2545), (Lindberg N., 1995:987-1007).

Es bien sabido que generalmente en el análisis cuantitativo se busca alguna relación lineal entre la variable independiente y la variable dependiente de un componente en particular. En espectrofotometría, como ya se ha mencionado, la ley de Lambert-Beer define la relación entre absorbancia y la concentración (ec 1).

Aunque la ecuación puede resolverse para una sola muestra siempre es recomendable analizar cierto número de muestras de distintas concentraciones, obtener la gráfica de los resultados (curva de calibración) y la línea recta que mejor explique los puntos ⁽³⁾.

Si la mezcla contiene dos componentes, es posible establecer una ecuación para cada uno a partir de la ley de Lambert-Beer (ec 1) produciendo las ecuaciones independientes para cada componente:

$$A_1 = C_1k_1 + E_1 \dots \dots \dots (2)$$

$$A_2 = C_2k_2 + E_2 \dots \dots \dots (2a)$$

(3) El método de mínimos cuadrados es la herramienta matemática a través de la cual se encuentra la ecuación de la recta donde el error total entre las variables dependientes es mínimo.

donde E_1 y E_2 son los errores residuales para cada muestra a partir de la línea ajustada por mínimos cuadrados y las absorbancias reales.

Es factible dar solución a cada ecuación de manera independiente mientras la absorbancia de un componente no interfiera con la absorbancia del otro (bandas bien resueltas).

Por otro lado, partiendo de la ley de Lambert-Beer y de que las absorbancias son aditivas, las ecuaciones también se pueden resolver simultáneamente manejando así el caso donde exista interferencia entre las dos absorbancias dentro de un espectro (bandas sobrepuestas):

$$A_1 = C_1 k_{11} + C_2 k_{21} + \dots + C_n K_{n1} + E_1 \quad (3)$$

$$A_2 = C_1 k_{12} + C_2 k_{22} + \dots + C_n K_{n2} + E_2 \quad (3a)$$

$$A_\lambda = C_1 K_{1\lambda} + C_2 K_{2\lambda} + \dots + C_n K_{n\lambda} + E_\lambda \quad (3b)$$

donde $\lambda =$ diferentes longitudes de onda (1,2,3,..... λ),

$n =$ número de componentes de la mezcla (1,2,3,..... n),

$A_\lambda =$ absorbancia de la mezcla a diferentes longitudes de onda,

$C_n =$ concentración de cada uno de los "n" componentes de la mezcla,

$K_{n\lambda} =$ coeficiente de absortividad de cada uno de los componentes a las diferentes longitudes de onda,

$E_\lambda =$ errores residuales⁽⁴⁾.

Sin embargo, solucionar ecuaciones simultáneas se convierte en algo tedioso cuando se trata de más de dos componentes. Además, como se observa, es factible medir la absorbancia a más de una longitud de onda para cada componente y resolver las ecuaciones respectivas, con lo cual crece aún más el número de evaluaciones

Un camino particularmente eficiente para resolver ecuaciones simultáneas es utilizar métodos matriciales, pues si bien implican numerosos cálculos, éstos pueden efectuarse por computadora. En términos matriciales, las ecuaciones anteriores pueden expresarse como sigue:

$$A_{(n,p)} = C_{(n,m)} K_{(m,p)} + E_{(n,p)} \quad (4)$$

en las que "n" es el número de soluciones patrón, "p" el número de valores de longitudes de onda y "m" el número de componentes.

(4) En este caso los errores residuales o también llamados errores de ajuste, son la diferencia entre la absorbancia experimental y la determinada a cada longitud de onda según el modelo.

Mediante álgebra matricial es fácil encontrar la solución de estas expresiones de multicomponentes al plantear la matriz de calibración (o matriz de coeficientes de absorptividad), que proporciona la mejor línea de los datos. Una vez resuelta, la matriz puede utilizarse para predecir concentraciones de muestras desconocidas.

Dentro del método de multicomponentes existen varias técnicas para resolver estos sistemas:

- Análisis o regresión del Componente Principal, ACP o RCP (Principal Component Analysis, PCA)
- Mínimos Cuadrados Clásicos, MCC (Classic Least Square, CLS)
- Mínimos Cuadrados Inversos, MCI (Inverse Least Square, ILS)
- Mínimos Cuadrados Parciales, MCP (Partial Least Square, PLS)

El método de MCC aplicado a espectrofotometría, es un método de espectro completo y proporciona una buena sensibilidad al promediar varios resultados; pero se requiere conocer la concentración de todos los componentes de la mezcla, algo que comúnmente no ocurre en la realidad. El método MCI tolera esta situación, pero no permite utilizar muchos puntos de análisis, ya que se encuentra limitado por el número de frecuencias del espectro que pueden ser incluidas en el análisis.

En el caso del ACP se descomponen los espectros independientes, luego se integran y se ajustan para obtener el espectro desconocido y, finalmente, se relaciona con la concentración de los componentes, por lo que para su uso se requiere de conocer a todos los componentes al igual que en MCC.

Por otra parte, el método de MCP ha sido aplicado exitosamente al análisis cuantitativo de datos provenientes de estudios en Ultravioleta, Infrarrojo, cromatografía y electroquímica. Este método hace uso conjunto de los métodos establecidos para MCC y MCI, de esta forma presenta algunas de las ventajas separadas de ambos métodos y mejora algunas del ACP, generando así un método de análisis de espectro completo en el que no se requiere conocer a todos los componentes de la mezcla y se analiza a un componente químico a la vez sin la necesidad de un proceso de separación.

El método de MCP consta de dos grandes etapas:

- Calibración.
- Predicción.

A) ETAPA DE CALIBRACIÓN.

En esta etapa, la relación entre las absorbancias obtenidas a diferentes longitudes de onda y la concentración del componente de interés se estima a partir de un conjunto de soluciones de referencia que presentan las posibles combinaciones de los componentes de la mezcla. Entonces de acuerdo al algoritmo de MCP establecido por Haalad D., 1988:1193-1202 y en Resendiz L. (éste último en proceso de impresión) se obtienen expresiones matriciales compuestas por valores de absorbancias a diferentes longitudes de onda y el número de soluciones (en columnas y filas respectivamente):

		Longitudes de onda: 1, 2, 3...n			
Número de soluciones a diferentes conc.: h, j, k...x	A_{1h}	A_{2h}	$A_{3h}.....$	A_{nh}	
	A_{1j}	A_{2j}	$A_{3j}.....$	A_{nj}	
	A_{1k}	A_{2k}	$A_{3k}.....$	A_{nk}	
	A_{1x}	A_{2x}	$A_{3x}.....$	A_{nx}	

Un aspecto importante en la etapa de calibración es el diseño del conjunto de soluciones patrón a partir de las cuales se obtienen el número de soluciones para la matriz; las soluciones deben ser representativas de las diferentes composiciones de las muestras que se esperan analizar en el estudio final. Un ejemplo de este diseño se muestra a continuación:

Concentración del componente de interés (por duplicado)	Cantidades adicionadas de soluciones de componentes interferentes			
A	X	Y	Z	n
B	X	Y	Z	n
C	X	Y	Z	n
D	X	Y	Z	n
E	X	Y	Z	n
Cada solución por duplicado.				

Al igual que en cualquier método cuantitativo, las muestras deben cubrir el intervalo de concentraciones esperadas en todo el estudio posterior. Por otra parte las cantidades adicionadas de las soluciones de los interferentes se establecen de acuerdo al número de éstos y según convenga para cada método o estudio.

Otro punto importante en el diseño de la serie de calibración, para el caso de métodos espectrofotométricos, es la elección de las longitudes de onda a las cuales se llevará a cabo el estudio. Se requiere que sean representativas del componente de interés de tal forma que los cálculos estén enfocados a dicha sustancia.

Una vez que se obtienen las matrices de calibración los datos deben centrarse y normalizarse⁽⁵⁾ para obtener una segunda matriz la cual se resuelve para convertir las señales analíticas (absorbancias a diferentes longitudes de onda en la banda del espectro) a términos respecto al valor promedio, los cuales pueden relacionarse con la concentración.

La elaboración del modelo establecido para MCP se logra resolviendo los datos de las matrices conforme al siguiente algoritmo:

CUADRO II: Algoritmo de MCP para la calibración

PASO 1: Pretratamiento de los datos.	
Centrar A y c Primer conjunto para h 1.	
PASO 2: Formación de los vectores cargadores de peso, w_h^s.	
Modelo:	$A = c w_h^s + E_A$
Solución por mínimos cuadrados (MC):	$w_h^s = A'c/c'c$ normalizar w_h^s
PASO 3: Formación del vector resolución (variable latente) t_h^s.	
Modelo:	$A = t_h w_h^{s'} + E_A$
Solución por MC:	$t_h^s = A w_h^s / w_h^{s'} w_h^s = A w_h^s$
PASO 4: Relación del vector resolución, t_h^s, con las concentraciones.	
Modelo:	$c = v_h t_h^s + e_c$
Solución por MC:	$v_h = t_h^{s'} c / t_h^{s'} t_h^s$
PASO 5: Formación de b_h^s, vector de carga de MCP para A	
Modelo:	$A = t_h^s b_h^s + E_A$
Solución:	$b_h^s = A' t_h^s / t_h^{s'} t_h^s$
PASO 6: Calculo de residuales en A y c.	
Residuales espectrales:	$E_A = A - t_h^s b_h^s$
Residuales de las concentraciones:	$e_c = c - v_h^s t_h^s$
PASO 7: Incrementar h, sustituir E_A por A y e_c por c en el paso 2 y continuar para decidir el número de vectores de carga.	

(5) Centrar: Distribuir los datos alrededor del valor medio.

Normalizar: Obtener la dispersión de datos respecto al valor medio.

Cuadro II, continuación.

Símbolo	
A=	Matriz de absorbancias centradas.
c =	Vector de concentraciones centradas.
h =	Número de iteraciones.
w _h =	Vector de cargadores de peso.
'	Valores transpuestos.
s	Valores estimados.
E _A	Valores residuales espectrales.
e _c	Valores residuales de concentración
t _h	Vector resolución.
v _h	Vector de carga de MCP para c (coeficiente de regresión de su modelo).
b _h	Vector de carga de MCP para A (coeficiente de regresión de su modelo).

B) ETAPA DE PREDICCIÓN.

En esta etapa, las respuestas analíticas de la matriz de calibración se usan para estimar los resultados (concentraciones) del componente de interés a partir del espectro obtenido para una muestra problema.

Así, el principio básico en MCP es la generación de "Residuales Espectrales", que no es más que minimizar la suma de cuadrados de las diferencias entre los valores espectrales estimados por el modelo y los valores espectrales medidos experimentalmente. Tales valores espectrales se refieren a los valores centrados, o los valores de residuales provenientes de un análisis anterior.

De esta forma el método de MCP va relacionando 2 o más bloques de datos entre ellos mismos hasta obtener la menor suma de cuadrados. El algoritmo para la etapa de predicción se muestran en el siguiente cuadro:

CUADRO III: Algoritmo de MCP para predicción:

PASO 1: Centrar a usando los datos de la calibración escalada, juego de datos para h=1	
PASO 2:	$t_h = w_h^s a$
PASO 3:	$c_h = c_{h-1} + v_h^s t_h$
PASO 4:	$e_h = e_{h-1} - b_h^s t_h$
PASO 5:	Incremente h, sustituya e _h por a y repita con el paso 2 hasta h = r r= número de factores óptimos en el modelo a = vector de absorbancias centradas para cada muestra problema a todas las longitudes de onda evaluadas.

Se debe hacer notar que en este algoritmo de predicción w_h^s , v_h^s y b_h^s provienen de la calibración por MCP, también se emplea el valor de concentración promedio del analito de la calibración.

Finalmente, se puede decir que este método es considerado como una **HERRAMIENTA ESTADÍSTICA** de predicción (López A.P.L., 1996:34-44), (Haaland D. M., 1988:1203-1208) (Rodríguez G., 1997:14), y se cuenta con una amplia documentación que indican un algoritmo para aplicar esta herramienta matemática: Haaland D.M.-1988:1193-1202, Geladi P.-1986:1-17, Arcos M.J.-1997:63-77, Resendiz L.-en proceso de impresión.

(2.3) CONDICIONES PARA LAS PRUEBAS DE DISOLUCIÓN.

(Skoug J., 1996:8-15)

Una vez elegido el método analítico más conveniente, se deben estudiar el proceso óptimo de trabajo y las condiciones en las cuales el análisis tendrá su desempeño. Los principales factores que se necesitan investigar para realizar pruebas de disolución son el tipo de aparato, la velocidad de rotación y el medio de disolución principalmente.

En ausencia de datos de biodisponibilidad, la selección de las condiciones iniciales de la prueba son de alguna manera arbitrarias y se basan en las propiedades fisicoquímicas del fármaco, el diseño de la formulación y la dosis pretendida.

Se puede establecer que el porcentaje de disolución del fármaco y la velocidad pueden ser afectados por varios factores, los cuales pueden estar dentro de las siguientes 5 clases: (Banakar, 1992:133-181), (Goodhart F., 1974:1748-1751)

1) Factores relacionados con las propiedades fisicoquímicas del fármaco:

Características forma farmacéutica.

Polimorfismo.

Características de la partícula.

pKa.

2) Factores relacionados con la formulación del producto:

Excipientes y aditivos (tipo, cantidad y propiedades).

Tamaño de partícula.

3) Forma de dosificación:

Proceso de manufactura.
Interacción fármaco-excipientes.
Almacenamiento.

4) Mecanismos de la prueba de disolución:

Agitación.
Vibración.
Posición de la forma farmacéutica.

5) Condiciones de la prueba de disolución:

Temperatura
Medio de disolución (Gases disueltos, pH, composición del medio, viscosidad)

Cabe destacar que los factores que afectan la disolución in vitro de las formas farmacéuticas convencionales también afectan la disolución de los Sistemas de Liberación Controlada (SLC.)

CUADRO IV: Factores y condiciones típicos para el desarrollo de una prueba de disolución

FACTORES.	CONDICIONES.
Medio de disolución.	Depende de las propiedades fisicoquímicas del medicamento: amortiguadores de pH acuosos relevantes fisiológicamente, surfactantes, sales biliares, etc.
Medio de deaeración.	Sí, si es necesario
Aparatos.	Canasta rotatoria (USP 1). Paleta rotatoria (USP 2). Aparato de cilindro reciprocante (USP 3). Aparato para flujo continuo (USP 4).
Velocidad de Agitación.	50 r.p.m. en la paleta (25-100 r.p.m.). 100 r.p.m. en la canasta (50-150 r.p.m.).
Volumen del vaso y volumen del medio.	1000 ml (500-900 ml).
Temperatura.	37°C (36.5-37.5 °C).
Método de muestreo:	Manual: 15 ml (10-20 ml). Automatizado: <3 ml.
Volumen de filtración.	Filtro de membrana desechable ≤10 mcm tamaño de poro.
Método de análisis de muestras.	CLAR. Espectrofotometría.

A) MEDIO DE DISOLUCIÓN:

El medio y volumen de disolución, se seleccionan con base en los datos de solubilidad, la dosis y las condiciones SINK⁽⁶⁾.

Las características fisiológicas son un término que se utiliza frecuentemente en la elección de los medios de disolución. Idealmente las pruebas de disolución in vitro "imitarian" directamente al medio ambiente en el tracto gastro intestinal (GI). Independientemente de los avances en el entendimiento de la fisiología GI, probablemente no es factible imitar de forma confiable condiciones in vivo para la prueba de disolución. En ocasiones es más apropiado utilizar correlaciones empíricas entre los parámetros farmacocinéticos y de disolución.

Si una prueba de disolución se puede correlacionar con el desempeño in vivo y si dicha correlación es confiable, entonces las preocupaciones acerca de la relevancia fisiológica del medio son probablemente de importancia secundaria.

Sin embargo, en algunos casos para mejorar las posibilidades de correlación, se recomienda elegir medios que contengan soluciones amortiguadoras sobre el intervalo fisiológico (pH 1-8) con o sin tensoactivos, dependiendo de las características de solubilidad del fármaco. Entonces, los datos de solubilidad deben usarse como una guía para seleccionar racionalmente los medios que se probarán. Por ejemplo, no es útil investigar la disolución en medios en los cuales la solubilidad es baja (Skoug J., 1996:8-15).

B) EQUIPOS DE DISOLUCIÓN.

Si bien es cierto que para elegir las condiciones de trabajo se toman en cuenta los factores que afectan la liberación de fármacos a partir de sus formas farmacéuticas, también es importante recordar que existe una enorme demanda de tecnologías de disolución que sean capaces de reflejar las propiedades de la formulación.

Los datos de las pruebas de disolución in vitro, por si solos, no predicen el desempeño in vivo. Ésto es particularmente cierto para los SLC. Entonces las pruebas de disolución pueden ser empleadas y validadas como un proceso de control de calidad primario que muestra las diferencias entre varios lotes manufacturados, así como en los estudios de desarrollo de productos.

Con el surgimiento de los SLC, en 1982 aparecieron algunas políticas sobre los equipos de disolución, fueron introducidas por primera vez en compendios oficiales y se adoptaron como estándares oficiales. Al inicio se estableció que todos los productos estaban sujetos a los requerimientos de disolución específicos, empleaban 900 ml de medio de disolución y el aparato 1 y 2 de la USP a 100 y 50 r.p.m. respectivamente.

(6) En los modelos de difusión establecidos para formas farmacéuticas convencionales, el solvente es constantemente removido y reemplazado con solvente fresco, por lo que se conservan concentraciones bajas en el medio de disolución. De esta forma al tener una cantidad de fármaco disuelto menor o igual al 15% de su solubilidad, se dice que existen "Condiciones SINK".

Sin embargo con el crecimiento y desarrollo de los SLC, se han creado nuevos equipos destinados para el estudio de estas formas farmacéuticas (Banakar, 1992:133-181) (Wennergren B., 1989:35-41).

Inclusive ha sido necesario la adaptación y diseño de aparatos o equipos que satisfagan las necesidades propias de las muestras; tal es el caso de los estudios de formas farmacéuticas veterinarias, para los cuales se han adaptado los mecanismos de canasta de disolución de los compendios oficiales (Frazier W., 1976:1823-1826).

La USP XXI (Sanghvi P., 1994:961-980) reconoce 7 mecanismos para las pruebas de disolución. Tres de éstos fueron diseñados específicamente para parches transdérmicos (Aparato V, VI y VII). Los otros cuatro (Aparato I, II, III, IV) son destinados a la evaluación de todas las formas de dosificación, sin importar cual fármaco o tipo de formas farmacéuticas sea probada; así por ejemplo el aparato III (Cilindro recíprocante) ha sido recientemente incluido para las pruebas de liberación de fármacos en SLC como una alternativa a los métodos de paleta y canasta (Rohrs B., 1995:922-926).

La introducción de todos estos equipos genera una situación difícil ya que no se cuenta con estudios de disolución, comparativos, relativos a los resultados para un fármaco y/o forma farmacéutica usando estos instrumentos. Tampoco hay suficientes estudios que demuestren la necesidad de emplear diferentes mecanismos de disolución para diferentes formas de dosificación (Ver el cuadro V):

CUADRO V: Ventajas y limitaciones de los equipos para pruebas de disolución (Sanghvi P., 1994:961-980).

Equipo de disolución	Ventajas	Limitaciones
Equipos de disolución USP	Fácil de usar Poca perturbación mecánica de la forma farmacéutica.	Condiciones SINK limitadas para fármacos poco solubles. Distribución no uniforme de fármacos a bajas velocidades. Requerimiento de reposición del medio de disolución, por lo que se requiere un factor de corrección para determinar la concentración.
Equipo de botella rotatoria	Toda la muestra está provista de condiciones SINK y no se necesita de un factor de corrección pues se reemplaza la muestra.	Cambio del medio de disolución por cada cambio de muestra, consumo de tiempo, peligro potencial de pérdida de fracciones de la forma farmacéutica. La rotación física provoca daños en la forma farmacéutica.
Bio-Dis Tester	La contaminación entre muestras es mínima. El movimiento físico provee daños mínimos en la forma farmacéutica.	La programación de intensidad de agitación y tiempos de muestreo están limitados a la liberación del producto. Porciones de la forma farmacéutica pueden perderse a través de la sima de el tubo debido a la agitación.

Todos los equipos señalados en la tabla son resistentes y presentan facilidad en el control de la temperatura. Asimismo todos tienen la desventaja de que los cambios en la intensidad de la agitación alteran los perfiles de disolución, además de que el proceso de filtración puede permitir pérdidas de fármaco en el filtro.

C) CONDICIONES DE MUESTREO.

El comportamiento de disolución no se caracteriza completamente durante las etapas de evaluación preliminar, por lo que los perfiles se colectan comúnmente en el período de tiempo que abarque la disolución completa de la forma farmacéutica.

A medida que se gana más experiencia con la forma farmacéutica en estudio, el número de puntos de muestreo con respecto al tiempo se reducen según convenga o apoye las especificaciones requeridas del estudio. Los tiempos de muestreo importantes que deben cubrirse en las formas farmacéuticas de liberación inmediata son normalmente aquellos que cubren el 70% de fármaco disuelto, así los puntos apropiados de intervalos de tiempo pueden ser escogidos de tal manera que cubran al menos del 50-100% del porcentaje disuelto. (ver el cuadro VI).

Para caracterizar correctamente la proporción de fármaco liberado en los SLC, el número apropiado de puntos en un intervalos de tiempo, pueden ser determinados durante el desarrollo de dichos sistemas

El volumen de muestreo es usualmente de 10-15 ml, pero puede ser mucho menor si se utiliza el muestreo automatizado, como en el caso de pruebas para SLC (Skoug J., 1996:8-15).

CUADRO VI:
Especificaciones típicas para formas farmacéuticas
convencionales y SLC
(Skoug J., 1996:8-15).

Formas farmacéuticas de liberación convencional	SLC	Observación
	No menor de 20-25% en 1 hora.	Asegura la descarga por si ocurre una falta de dosis.
	No menor de 40% y No mayor de 60% en el tiempo especificado.	Asegura una liberación consistente. Uno o dos limites laterales pueden ser necesarios.
No menor de 70,75 u 80% en el tiempo especificado (Usualmente de 15 a 90 min.).	No menor de 80% en el tiempo especificado (Usualmente un intervalo de dosis entre 12-24 horas.	Asegura la liberación completa del medicamento.

(2.4) LIBERACIÓN DE FÁRMACOS DE SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA (SLC) TIPO MATRIZ.

En teoría, un sistema farmacéutico debe suministrar tanto la cantidad específica de fármaco en el sitio de acción, así como durante el tiempo y con la velocidad apropiados. Es por ello que el establecer los intervalos de dosificación y la eficacia terapéutica de los medicamentos se reconocen como factores importantes para el tratamiento exitoso de las enfermedades.

En la actualidad los fármacos se preparan en un vehículo denominado "sistema de liberación de fármacos"⁽⁷⁾. Dependiendo del modo de administración y de las necesidades terapéuticas, el vehículo presenta un estado, forma física o tipo de dosificación diferente (Won H, 1997:15-16). De este modo las características de liberación del fármaco se eligen en función del tiempo y/o las condiciones del sitio de disolución. Con el fin de optimizar la biodisponibilidad, se debe modular el tiempo que permanece la concentración terapéutica de fármaco en sangre (Banakar V., 1992:299-305). Por ello, durante el desarrollo y estudio de una forma farmacéutica es de suma importancia el estudio del transporte de masas en los sistemas farmacéuticos con el fin de obtener datos que contribuyan a la predicción del comportamiento del sistema⁽⁸⁾.

En un Sistema de liberación controlada (SLC), al igual que en cualquier otra forma farmacéutica sólida, la proporción de fármaco liberado depende del proceso de disolución y difusión. En el desarrollo de los SLC se emplean estos procesos en forma combinada o por separado según convenga (Banakar V., 1992:299-305).

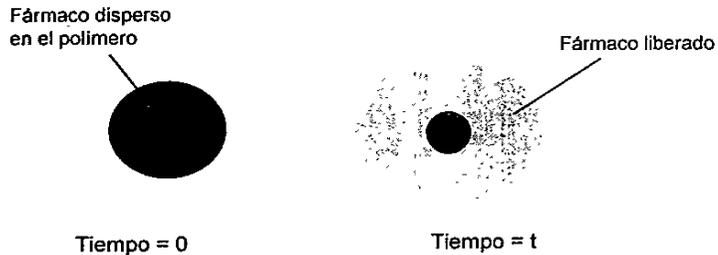
Los dispositivos de matriz, consisten en fármacos dispersos homogéneamente en matrices poliméricas, a través de las cuales el fármaco difunde desde el interior; el proceso continua con la formación de una interfase entre la solución y la superficie de la matriz.

Existen varios mecanismos a través de los cuales se lleva a cabo la liberación del fármaco en las matrices (Banker G., 1990:647-650):

(7) Existen aún algunos fármacos que se administran en su forma química pura (etanol y polvo de sulfatiazol)
(8) El transporte de masas en los sistemas farmacéuticos se lleva a cabo a través de los procesos de difusión y de disolución

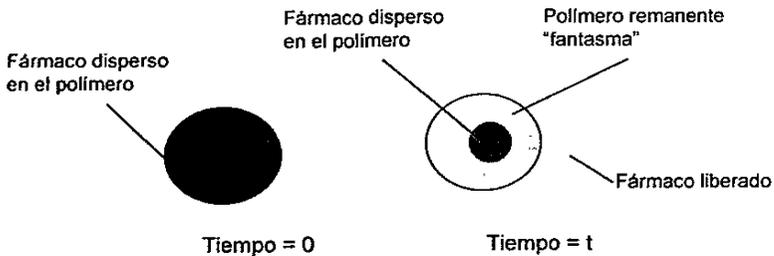
(1) cuando la matriz es soluble, la disolución de la misma, permite la liberación lenta del medicamento:

FIGURA 3: Sistemas de matriz soluble.



(2) En las matrices insolubles, la liberación del fármaco depende de la difusión del mismo a través de la matriz.

FIGURA 4: Sistemas de matriz insoluble.



Algunos factores que pueden complicar el uso de estos sistemas son:

- 1) Disolución parcial de las sustancias de la matriz,
- 2) Rompimiento simultáneo de la matriz,
- 3) Fármaco en la superficie de la matriz, el cual se libera más rápido que el fármaco interno (Banakar V., 1992:305).

(2.5) ESTUDIOS DE DISOLUCIÓN DE SLC (BOLOS) EN RUMIANTES.

(Evrard B., 1995:107-115), (Quiroz R., 1984:130,135).

Los rumiantes han desarrollado un órgano digestivo llamado rumenretículo (rumen), el cual funciona como sitio inicial para la ruptura de celulosa (fermentación realizada por bacterias simbióticas y protozoarios).

El rumenretículo es una especie de "tina de fermentación", tiene una capacidad de 100 a 200 litros en la vaca y de 10 a 15 litros en la oveja. Presenta una entrada que se conecta directamente con el final del esófago que controla la entrada del alimento y la saliva, así como la salida del esfínter a través del cual el contenido ruminal entra al abomaso o "estomago verdadero". El tracto digestivo restante es similar al de otros mamíferos monogástricos.

El rumen presenta un pH entre 5-7, cuando el animal está sano. Este valor varía dependiendo principalmente del tipo de dieta y de la especie o rasgos hereditarios del animal.

En el rumen se presenta un proceso conocido como regurgitación mediante el cual el contenido ruminal que ha sido colectado y tragado durante el pastoreo es remasticado. Aquel alimento o material, tragado por el animal, permanece en el rumenretículo cuando es de una densidad alta⁽⁹⁾ o presenta una geometría que impide su regurgitación (Martínez C., 1994), (Blood D.C., 1989:998).

Las características fisiológicas del tracto digestivo de los animales rumiantes dan la oportunidad de uso de SLC, especialmente al aprovechar la propiedad del rumen. Una forma farmacéutica retenida en este órgano puede ser capaz de liberar sus ingredientes activos por largos periodos de tiempo.

Como ya se mencionó a lo largo de este capítulo, cuando se desarrolla una forma farmacéutica se requiere establecer las pruebas de disolución apropiadas para evaluar la liberación del fármaco en estos sistemas. Existen varios reportes sobre el uso de matrices lipídicas para el desarrollo de estos sistemas así como las estrategias para elaborar los estudios de disolución.

(Ver el cuadro VII)

(9) La medida de los bolos puede ser hasta de 10 centímetros y llegar a pesar 40 gramos. Los bolos de 5 gramos han sido usados comúnmente para su administración en ovejas y becerros. Algunos estudios reportan que una densidad de 2.25 a 3.5 g/ml mantiene o previene la regurgitación de este dispositivo; para los rumiantes más pequeños se ha observado que una densidad de 1.8g/ml es suficiente, aunque este último valor también es aplicable a aquellos animales que reciben dietas finas ya que la actividad del rumen se ve disminuida por este factor.

CUADRO VII:
Condiciones para estudios de disolución en SLC que emplean matrices lipídicas.

Fármaco	Característica de la formulación	Método de disolución	Medio de disolución	Velocidad de agitación (r.p.m.)	Condiciones de pH	Método de análisis	Referencia
Sulfametazina (SMZ)	Matriz lipídica de cutina. 13 mm. diámetro. Peso: 1.0 gr.	Equipo de Paletas USP XXI	1 litro amortiguador de pH de fosfatos 0.1 N a 37°C	60	5.5	Espectrofotómetro de arreglo de diodos. 320 nm	Evvard B, 1995 Evvard B, 1996
SMZ	Matriz de gelatina 7.8 cm largo X 2.2 cm ancho	Canasta rotatoria para bolos veterinarios	Tanque de 20 litros con 18 kg. de medio de disolución (no especificado)	50	12	Espectrofotometría. 257 nm	Frazier W., 1976
Izoniazida, cafeína, nicotinamida	Matriz lipídica de cutina. 3 cm de diámetro	Método de paleta JP XII	900 ml de agua destilada a 37°C	100	--	Espectrofotometría Isoniazida: 290 nm Cafeína: 255 nm Fenilpropanolamina: 280 nm	Kato Y., 1994
Fenilpropanolamina	Matriz mezcla de grasas. Peso: 1.08g.	Aparato para disolución de tabletas USP XVIII	400 ml de HCl 0.1 N a 37°C	75	-	Oxidación por peróxido, lectura por espectrofotometría.	Goodhart F, 1974

(3) VALIDACIÓN DE PRUEBAS DE DISOLUCIÓN

El QFB, ya sea en el área de desarrollo, aseguramiento de la calidad, producción o regulación farmacéutica, debe familiarizarse con el siguiente axioma: "La calidad de un producto no se prueba, sino que se construye". Éste es un concepto importante ya que durante el aseguramiento de la calidad, el proceso de validación es una herramienta importante.

La validación de métodos analíticos se define como "el proceso a través del cual se establece evidencia documental, por estudios de laboratorio, que las características del método cumplen con los requerimientos para su aplicación analítica confiable"(USP XXII, 1990:1710-1712).

(3.1) LA NECESIDAD DE LA VALIDACIÓN EN EL DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

(Berry I., 1993: 167,411) (Manual de validación, CNQFB:I)

Existen varias razones por las cuales se debe validar el método analítico (durante el desarrollo y para el proceso de un producto farmacéutico):

- Aseguramiento de la calidad: Cumplir con las regulaciones establecidas (por ejemplo Buenas practicas de manufactura, BPM)
- Economía: Evitar el rechazo o retiro de lotes de producción
- Confiabilidad: por ejemplo en la uniformidad y reproducibilidad del producto.

Así, la validación del método analítico se considera una piedra angular en el desarrollo de nuevas formulaciones y en los procedimientos de control de calidad de la forma farmacéutica, ya que sin sistemas de predicción apropiados, no hay forma de asegurar que el método cumple o no con la función para la cual fue diseñado.

(3.2) EL PROCESO DE VALIDACIÓN.

(Berry I., 1993: 168)

Según ha sido reportado, hay cuatro elementos clave que forman las bases de un programa de validación:

- ◆ Definición de los atributos deseables en el producto farmacéutico o en el método analítico.
- ◆ Establecer las limitaciones o contratiempos que pueden presentar estos atributos.
- ◆ Determinación de los controles o características.
- ◆ Inicializar los estudios para establecer los controles o límites para aquellos atributos claves que afectan el proceso, desempeño y calidad del producto.

Estos criterios representan un proceso lógico de actividades que también se abarcan dentro del desarrollo del producto farmacéutico.

(3.3) CONSIDERACIONES EN MÉTODOS ANALÍTICOS PARA PRUEBAS DE DISOLUCIÓN).

Cuando se está validando un nuevo método analítico, se debe demostrar que no se ve afectado por errores sistemáticos.

En general el enfoque para la validación de un método de análisis para las pruebas de disolución, es similar a la de cualquier otro método analítico (Skoug J., 1996:8-15).

Debido a la existencia de una gran variedad de métodos analíticos, se deben considerar previamente las siguientes categorías:

CATEGORÍA 1: Métodos analíticos para la cuantificación de los compuestos principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservadores) en productos farmacéuticos terminados o finales.

CATEGORÍA 2: Métodos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en producto terminado. Pueden ser métodos cuantitativos o de prueba límite.

CATEGORÍA 3 Métodos analíticos para la determinación de características de desempeño, tales como viscosidad, pH, disolución, desintegración, etc (USP XXII).

Las características que deben evaluarse durante la validación de los métodos analíticos dependen tanto del tipo de método analítico, como del uso que se pretende dar a éstos (Ver el cuadro VIII y XIX). Sin embargo hay que destacar que "En la aplicación de los criterios de evaluación de un método analítico prevalece ante todo la experiencia y el criterio de la persona que lleva a cabo la validación".

CUADRO VIII Características consideradas al validar un método según su tipo (Val. Anal. Proc...,1993:3-7).

Característica del método	Tipo de método analítico (categoría)			
	Categoría 1 (Identificación)	Categoría 2 (Pureza)		Categoría 3 (Sólo medición)
		Cuantif.	Límite	
Exactitud	-	+	-	+
Repetibilidad	-	+	-	+
Precisión	-	+	-	+
Reproducibilidad	-	-(1)	-	-(1)
Especificidad	+	+	+	+(2)
Límite de detección	-	+	+	-
Límite de cuantificación	-	+	-	-
Linealidad	-	+	-	+

Simbología del cuadro VIII

- significa que esta característica normalmente no es evaluada
- + significa que esta característica normalmente se evalúa
- (1) puede ser necesario en algunos casos
- (2) Puede no ser necesario

CUADRO IX
Características a evaluar según el uso del método
(Manual de validación, CNQFB:54)

Característica	Control de calidad	Indicadores de estabilidad		Biodisponibilidad	Revalidación del método.	
		Baja Conc.	Alta Conc.		Cambio en condición de operación	Sin cambio en condición de operación
Linealidad y precisión del sistema	X	X	X	X	X	X
Límite de detección		X		X		
Límite de cuantificación		X		X		
Exactitud y repetibilidad al 100%	X	X	X	X	X	X
Linealidad del método	X	X	X	X	X	X
Reproducibilidad	X	X	X	X		X
Especificidad (control de calidad)	X	X	X	X	X	X
Estabilidad		X	X			
Tolerancia del sistema		X	X	X		X
Estabilidad de la muestra	X	X	X	X		

(4) PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LA SULFAMETAZINA.

(Florey K.,1978:400-420), (Clarck's, 1986:984,985)

DESCRIPCIÓN.

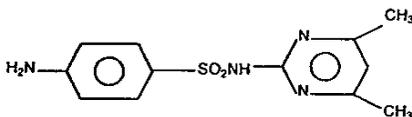
Función terapéutica: antimicrobiano. Uso veterinario: infecciones bacterianas en puercos, becerros, ganado.

Nombre genérico: sulfadimerazina, sulfadimidina, sulfamidin, sulfadimetilpirimidina.

Nomenclatura: N¹-(4-metil-2-pirimidinil) sulfanilamida; 4-amino-N-(4-metil-2-piramidinil) bencensulfonamida.

Peso molecular: 278.33 g/mol

Estructura química y fórmula : C₁₂H₁₄N₄O₂S



Apariencia, color y olor:

La Sulfametazina se presenta como polvo cristalino blanco o ligeramente amarillento. Puede oscurecerse por exposición a la luz, tiene un ligero sabor amargo y es inoloro. Cuando se expone al aire absorbe bióxido de carbono y se vuelve menos soluble en agua (Clarck's, 1986:984,985).

En su forma sódica es un polvo altamente higroscópico que puede oscurecerse ligeramente por exposición a la luz. En exposición prolongada a aire húmedo, absorbe bióxido de carbono y es menos soluble.

PROPIEDADES FÍSICAS

Solubilidad.

La Sulfametazina es casi insoluble en agua (150 mg/100 ml a 29°C, 192 mg/100 ml a 37°C y pH 7.0) (Index Merck, 1968); soluble 1 en 120 de etanol, 1 en 2500 de éter y 1 en 600 de cloroformo; soluble en ácidos minerales diluidos y en soluciones acuosas de álcali (hidróxidos y carbonatos).

La sal sódica presenta características de solubilidad de 1 en 2.5 partes de agua y 1 en 60 de etanol. (*Index Merck*, 1968) y su solubilidad en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M con pH de 5.5 es de 600mcg/ml (Evrard B., 1996:111-118).

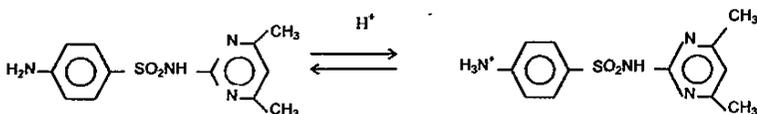
Temperatura de fusión.

La temperatura de fusión citada en la USP XIX es de 197 a 200°C.

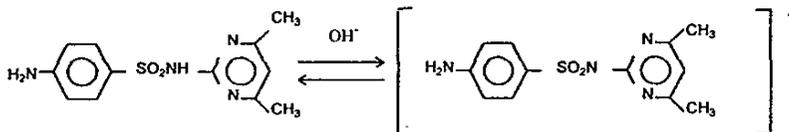
Constante de disociación

El valor de pKa reportado es 2.66 ± 0.2 para el equilibrio #1 y de 7.4 ± 0.2 para el equilibrio #2.

Equilibrio #1:



Equilibrio #2:



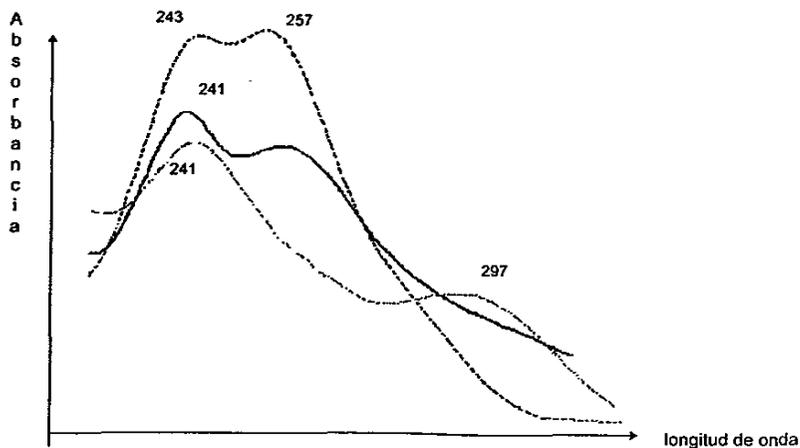
Espectro ultravioleta.

El espectro de absorción de la Sulfametazina en solución acuosa (pH 6.6), exhibe un máximo de absorción a 241 nm ($E^{1\%1cm} = 670$).

Por otro lado, el espectro en NaOH 0.1 N muestra dos picos de absorción a 243 y 257 nm ($E^{1\%1cm} = 765$ y 776 , respectivamente).

Cuando se disuelve el fármaco en HCl 0.1N, se observan dos picos de absorción a 241 y 297 nm ($E^{1\%1cm} = 560$ y 266 respectivamente).
(ver la fig. 5)

FIGURA 5
Espectro UV en diferentes soluciones acuosas:
(.....) en HCl 0.1N, (—) en NaOH 0.1N, (—) en agua .



Propiedades de luminiscencia,

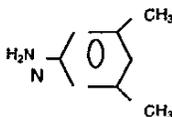
La Sulfametazina no presenta actividad fluorescente en soluciones acuosas a ningún pH, sin embargo muestra un pico de fosforescencia a 410 nm cuando existe a 310 nm a 77°K, en estas condiciones su tiempo de vida es de 0.8 segundos.

Estabilidad y degradación,

Al refluxar 10 gramos de Sulfametazina en 135 mililitros de HCl por 6 horas, se obtiene ácido sulfanílico (I) y 2-amino-4,6-dimetil (-pirimidina) (II).



(I)



(II)

MÉTODO DE ANÁLISIS COLORIMÉTRICO.

Uno de los métodos más ampliamente utilizados para la determinación de sulfonamidas es la prueba de Bratton- Marshall, la cual se basa en la diazotización y complejación con N-(1-naftil-etilendiamina dihidroclórica).

Las aminas aromáticas, como las sulfonamidas, son capaces de reaccionar con una solución ácida de ácido nitroso o nitrito de sodio para formar sales de diazonio; esta sal de diazonio es altamente reactiva y se puede hacer reaccionar con compuestos que posean un átomo de carbono con alta densidad electrónica (agente acomplejante) para generar un compuesto diazo altamente conjugado (Bratton y Marshall en 1939, sugirieron que el mejor agente de acoplamiento es la N-(1-naftil-etilendiamina dihidroclórica) (Connors K., 1980:518).

Hipótesis.



HIPÓTESIS:

- ◊ El método de Análisis de Multicomponentes de Mínimos Cuadrados Parciales (MCP) permite la cuantificación de analitos en muestras donde no solo un componente presenta propiedades de absorbancia; entonces el análisis espectrofotométrico por MCP se puede usar para cuantificar la Sulfametazina Sódica (SMZ-Na) liberada de bolos en un estudio de disolución.

- ◊ La confiabilidad del método de MCP depende de las condiciones del ensayo que se establezcan; si las condiciones son las adecuadas, entonces el método que se desarrollo será lineal, preciso, exacto y reproducible bajo tales condiciones.

CAPÍTULO II

Desarrollo del Método Analítico.



Para desarrollar un método analítico por MCP es primordial elegir la banda del espectro en la cual se realizan las mediciones de absorbancia que presentan los rasgos espectrales característicos de la sustancia de interés.

En este capítulo se presentan los materiales, equipos, soluciones y pruebas generales que permitieron desarrollar el método analítico por MCP para cuantificar SMZ-Na liberada desde bolos.

(1) EQUIPO Y REACTIVOS.

(1.1) REACTIVOS.

SUSTANCIA.	PROVEEDOR.	No. DE LOTE.
Ácido Clorhídrico	UNAM 35.88% p-p, 1.178g/ml	
Ácido Sulfanílico	J. T. Baker Chemical.	0-21.
Agua purificada.	8 micro ohm.	Equipo MiliQ. Marca Watters
Cutina HR (Rilanit Especial).	Henkel Mexicana.	160257.
Estearato de Magnesio	Alanit.	Ex-E13.
Fosfato de Potasio Dibásico.	Química Monterrey.	002013.
Hidróxido de Sodio (lentejas).	Merck.	6002106498.
Hierro Reducido.	Janssen Chimica.	66992/1.
Nitrito de Sodio.	Química Monterrey.	4490.
N-naftil etilen diamina	Merck	6237.0005.
Sulfamato de Amonio.	Sigma de México.	0.1190C.
Sulfametazina (SMZ-base).	Química Cártter Internacional.	
Sulfametazina sódica (SMZ-Na).	Química Cártter Internacional.	9506061319
2amino4-6dimetilpirimidina (prod. base)	Obtenido según Cap. 1 secc. 4	

(1.2) MATERIAL Y EQUIPO.

Balanza:	Marca OHAUS, mod. AP250D-0, # serie 1115481240.
Computadora con electrodo	Interfase PASCO Scientific, Serie 6500 para uso de electrodo medidor de pH
Disolutor:	Marca ELECSA, modelo DIE 25-250
Espectrofotómetro:	Marca Varian, modelo Cary 13.E.
Mezclador de cubo:	Marca Erweca, modelo AR400.
Papel filtro:	Marca Whatman, malla #41, diámetro de poro 110.
Prensa:	Carver Press, modelo C.
Sistema purificador de agua:	Marca Watters, MilliQ, 18mΩ.
Tamizador:	Marca Erweca, modelo AR400, malla: 14.
Termobalanza:	Marca Mettler Toledo, Modelo HR73.
Vermier.	

(2) PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS REALIZADOS PARA EL DESARROLLO DEL MÉTODO.

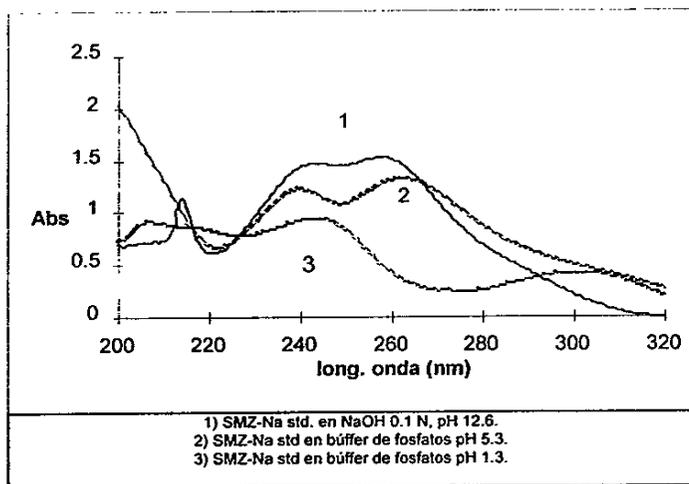
La disolución de los bolos de sulfametazina sódica (SMZ-Na) se efectuó en un litro de agua desionizada (18 mΩ y pH 6.6) como medio de disolución a 37°C de acuerdo al método de paleta de la USP XXII a 60 r.p.m.

A continuación se muestran los barridos espectrofotométricos que se obtuvieron para establecer las condiciones y realizar el análisis para el método de MCP. Cabe señalar que todos los espectros que se comparan en una misma figura se encuentran a la misma concentración.

Barridos característicos de SMZ-Na.

En la figura 6 se observan los espectros característicos de SMZ-Na a diferentes pH. El análisis de muestras se realizó en pH alcalino empleando NaOH 0.1N, ya que además de que a dicho pH tenemos presente una sola especie química de SMZ-Na, los rasgos del espectro son más definidos que a pH ácido.

FIG. 6: Barrido de SMZ-Na estándar en diferentes condiciones de pH.



Barridos de soluciones que contienen el medio de disolución con los componentes disueltos del bolo.

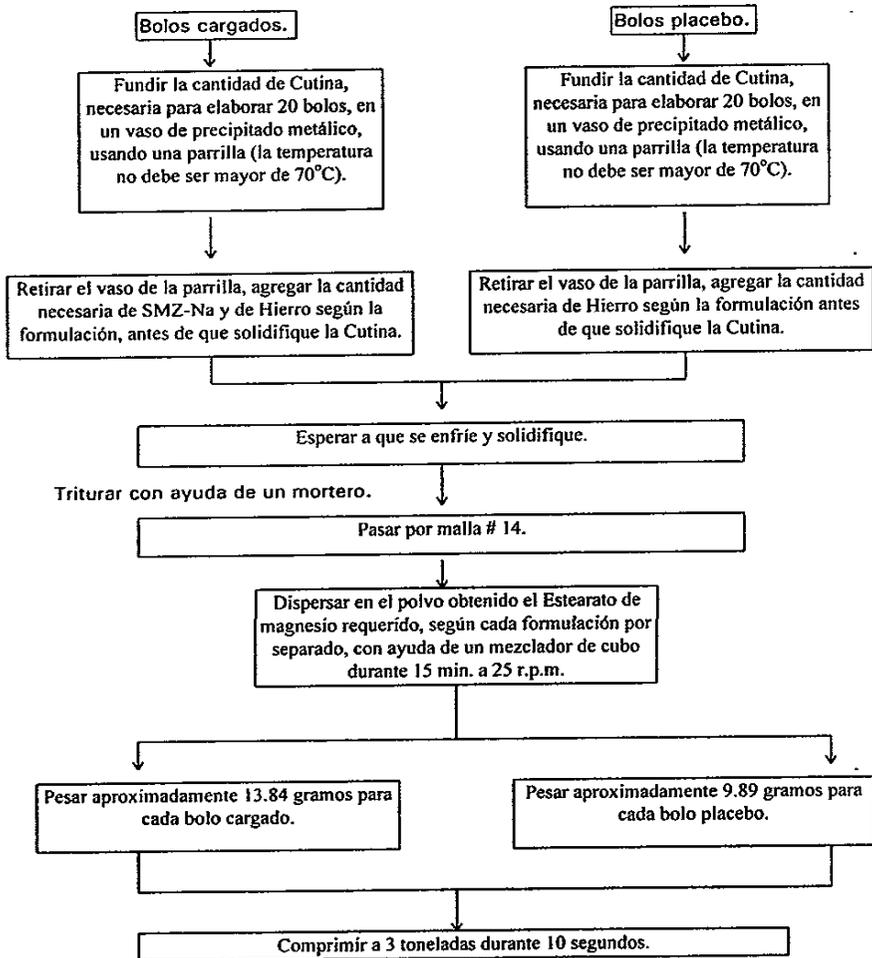
Con el fin de observar la posible interferencia de los demás componentes del bolo en el espectro de la SMZ-Na, se colocó un bolo placebo en el medio de disolución y se tomó una muestra de 10 ml a las 24 horas, una vez filtradas se diluyó 1 ml en 25 ml de NaOH 0.1N (pH 12.5) y se efectuó su barrido. Este proceso se repitió con muestras de 48 horas de disolución (ver figura 7).

Las especificaciones de los bolos utilizados en el estudio así como el proceso de preparación de los mismos se muestran en la tabla 1 y el diagrama 3 respectivamente.

Tabla 1: Características generales de los bolos empleados para el estudio.
(Amador E., en proceso de publicación).

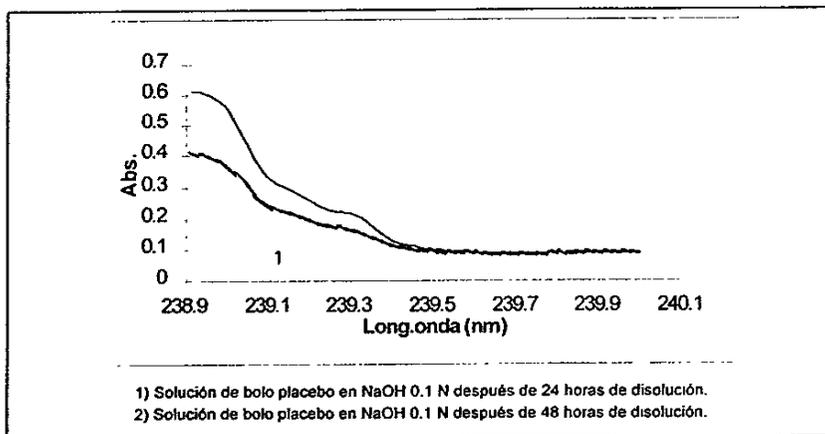
	BOLOS PLACEBO.		BOLOS CARGADOS.	
	Sustancia.	Porcentaje	Sustancia.	Porcentaje
Formula- ción	Cutina HR Hierro Reducido Estearato de Magnesio.	25 46 0.5	Cutina HR. Hierro Reducido. Estearato de Magnesio. Sulfametazina Sódica.	25 46 0.5 28.5
Peso final.	9.89 gramos		13.84 gramos	
Ancho promedio	16.41 mm.			
Largo promedio	39.00 mm.			

DIAGRAMA 3: Proceso de fabricación de bolos placebo y bolos cargados.



Como se observa en la figura 7 los componentes del bolo placebo presentaron respuesta tanto a 24 como a 48 horas de disolución en toda la banda de longitudes de onda, además, la cantidad de excipientes disueltos aumento conforme paso el tiempo de disolución.

FIG. 7: Barridos de bolo placebo.



Con el fin de observar la forma en que afectaba al espectro de SMZ-Na la respuesta de los componentes del bolo, así como elegir las longitudes de onda, se realizaron los barridos descritos en la figura 8a y 8b

En ambas figuras se observó que, cuando los excipientes del bolo se encontraban en la máxima cantidad esperada, el espectro de la mezcla continuaba siendo similar al de la SMZ-Na con las respuestas aumentadas, por lo cual se reafirma el hecho de que las absorbancias obtenidas no correspondían sólo a la SMZ-Na.

FIG. 8a: Comparación de soluciones estándar de SMZ-Na.

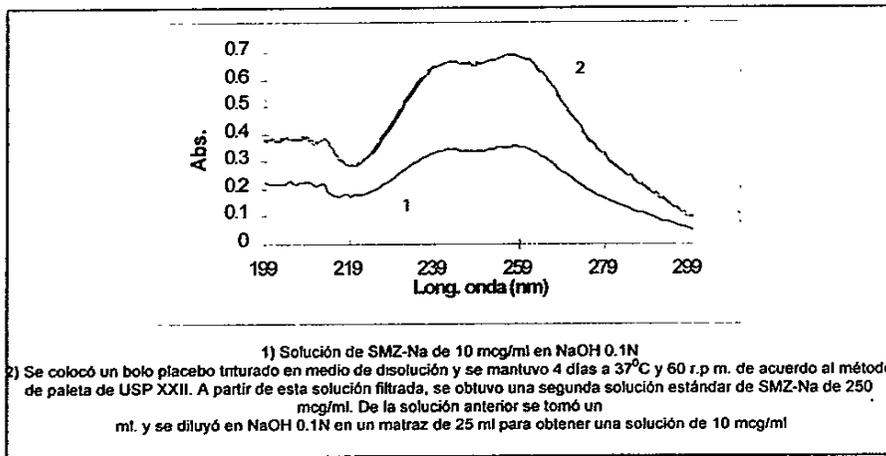
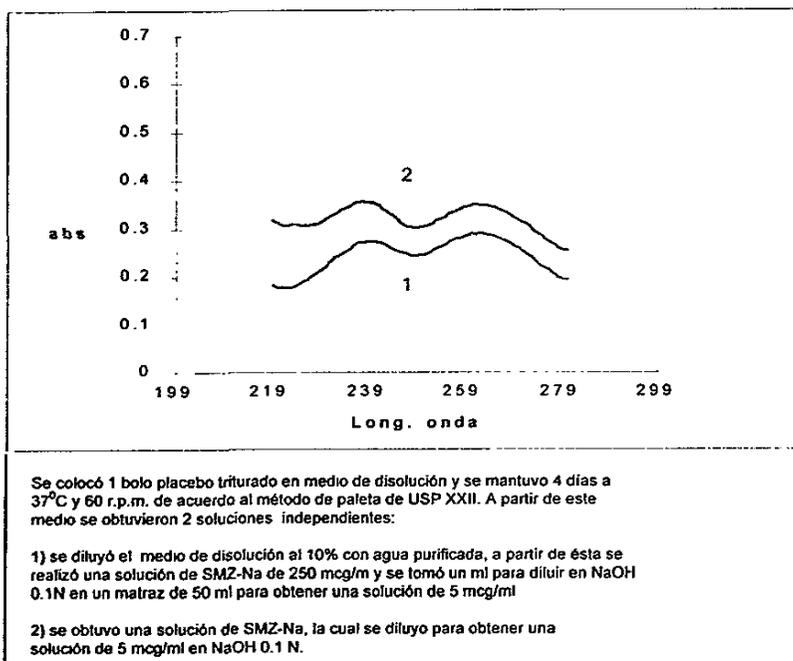


FIG. 8b: SMZ-Na en presencia de diferentes cantidades de medio de disolución con bolo placebo.



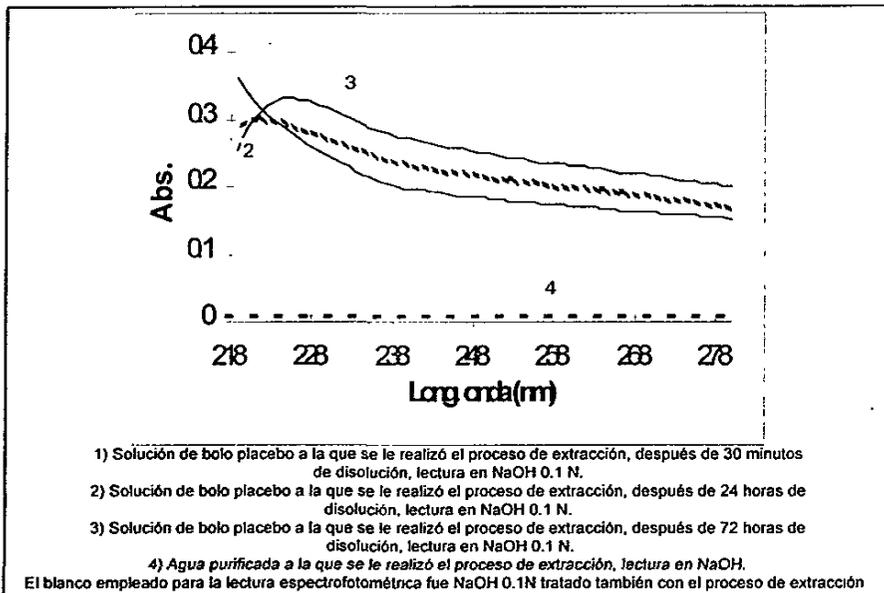
Proceso de extracción de los excipientes del bolo en solución.

Núñez A., reporta que al triturar el bolo y realizar una extracción con cloroformo es posible separar a los excipientes del bolo en solución y la SMZ-Na empleando como fase acuosa NaOH 0.1 N.

Este proceso se usó para tratar de eliminar la interferencia producida por los excipientes disueltos en el medio. En éste caso no se trituro el bolo, sino que se realizó la limpieza de la muestra del medio de disolución de un "bolo placebo" mediante el proceso de extracción de los componentes disueltos. Se observó (figura 9) que este proceso no es eficaz y que conforme aumenta el tiempo de disolución el espectro de la solución cambia.

Este comportamiento puede deberse a que durante la disolución los componentes del bolo se degradan, por lo que el proceso de extracción de dichos componentes no es el adecuado para las muestras.

FIG. 9: Espectros obtenidos después de extraer los componentes presentes en la solución del bolo placebo con cloroformo.



Ensayo para la estimación de las concentraciones de SMZ-Na liberada.

Debido a las características de los espectros antes observados y que el analito no presenta absorción selectiva, la cuantificación de SMZ-Na se realizó por el método de MCP.

Previamente al establecimiento del método para aplicar el modelo empírico de MCP fue necesario realizar una curva de calibración (por duplicado) usando el método colorimétrico de Bratton-Marshall, de tal forma que se obtuvo una curva de calibración apropiada.

En la **diagrama 4** se describe el procedimiento para la obtención del compuesto colorido y en la **diagrama 5** se muestra el procedimiento para realizar la curva de calibración. Así mismo, los resultados obtenidos de la evaluación de la curva de calibración se muestran en la **tabla II**.

DIAGRAMA 4: Procedimiento para la formación del compuesto colorido característico de sulfonamidas y cuantificable por espectrofotometría visible (Adams R., 1958:3-34).

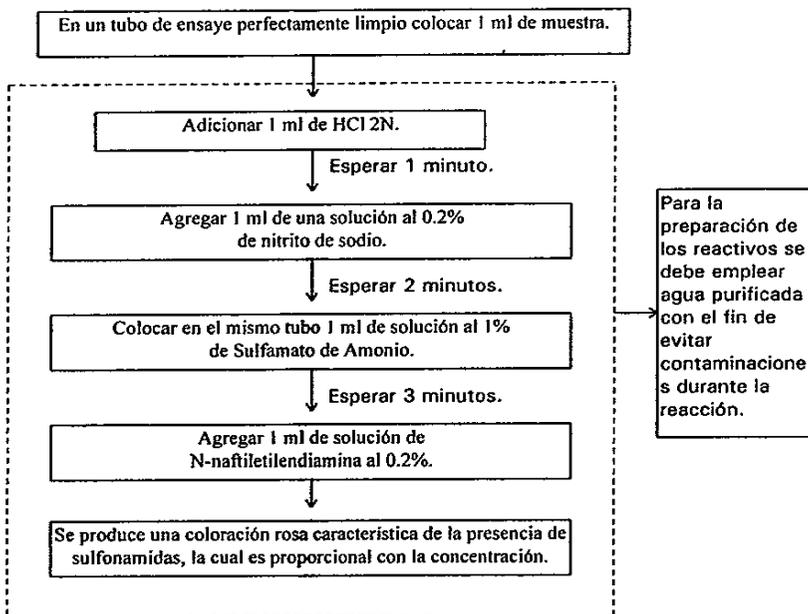


DIAGRAMA 5: Preparación de la curva de calibración empleando el método colorimétrico.

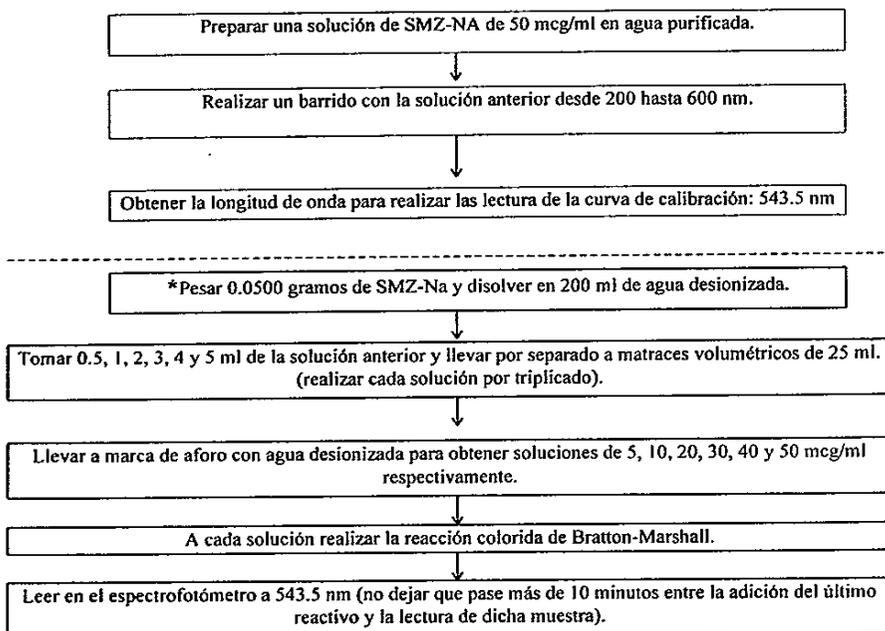


TABLA II: Datos de la evaluación de resultados obtenidos para las curvas de calibración.

	Curva de calibración 1.	Curva de calibración 2.
CV %	1.90	1.47
Coefficiente de determinación (r^2).	0.9991	0.9974
Pendiente (m).	0.9943	1.0710
Ordenada al origen (b)	0.02878	0.029131

La estimación de las concentraciones que se emplearon al desarrollar y validar el método de cuantificación de SMZ-Na por MCP se obtuvieron a partir del siguiente ensayo: Se realizó el proceso de disolución (por duplicado)m empleando "bolos cargados" y se determinaron las concentraciones de SMZ-Na liberada a diferentes tiempos de disolución empleando el Método colorimétrico de Bratton-Marshall y la curva de calibración antes descrita.

El **diagrama 6** señala el procedimiento general de obtención de las muestras para la determinación de la concentración de SMZ-Na liberada durante la disolución, mientras que en la **tabla III** se muestran las concentraciones determinadas.

DIAGRAMA 6: Procedimiento para la determinación de concentraciones de SMZ-Na durante la disolución (método de Bratton-Marshall).
Se realizó la disolución por duplicado.

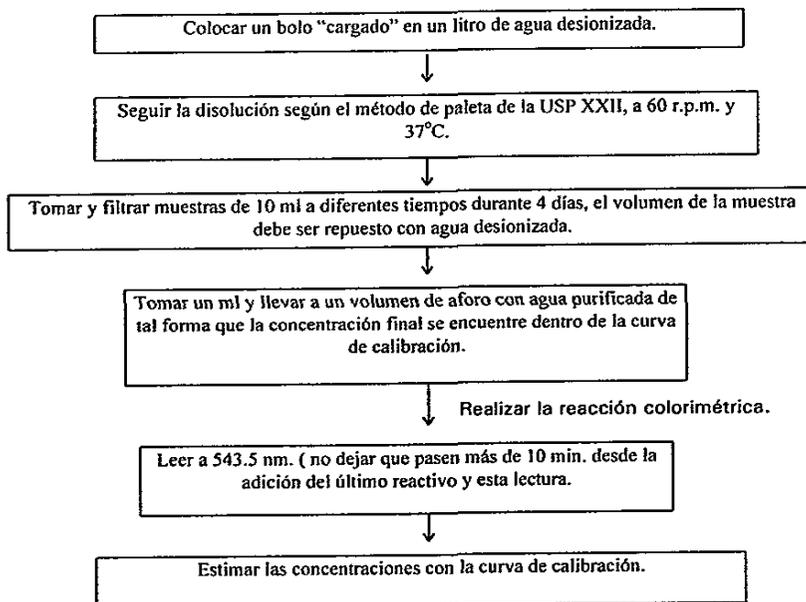


TABLA III: Datos de disolución obtenidos.

Tiempo de disolución (horas).	Bolo 1.		Bolo 2.	
	Factor de dilución.	Porcentaje disuelto.	Factor de dilución.	Porcentaje disuelto.
0.25	50	3.59	50	3.61
0.5	50	6.14	50	6.85
1	50	9.59	50	10.99
2	50	16.01	50	10.42
3	50	20.18	50	20.92
4	50	25.16	50	23.43
5	50	25.41	50	23.50
6	50	23.22	50	24.89
7	100	30.36	100	25.18
9	100	31.29	100	27.14
12	100	40.93	100	37.91
24	100	46.75	100	50.30
48	100	73.21	100	73.45
54	100	77.93	100	77.58
58	100	81.78	100	84.50
74	100	81.54	100	83.30
79	100	92.47	100	98.27

Cabe mencionar que aunque el método colorimétrico ayudó a estimar las concentraciones de SMZ-Na, no fue el más adecuado para el estudio de las cantidades liberadas del fármaco, pues si bien los excipientes liberados del bolo placebo no presentan lectura en la banda de 400-600 nm (figura 10) el uso de este método implicaría:

- ◊ Incremento en costos de análisis,
- ◊ mayor tiempo de análisis,
- ◊ establecer el tiempo de estabilidad del compuesto colorido, (el cual podría cambiar muy fácilmente para las muestras dependiendo del tiempo de disolución y almacenaje).
- ◊ Si la SMZ-Na se degrada, sus productos pueden producir interferencia (fig. 11), por lo cual sería necesario establecer previamente si existe la degradación de ésta.

FIG. 10: Barrido de las solución de bolos placebo siguiendo el mismo procedimiento de análisis que para las muestras con SMZ-Na.

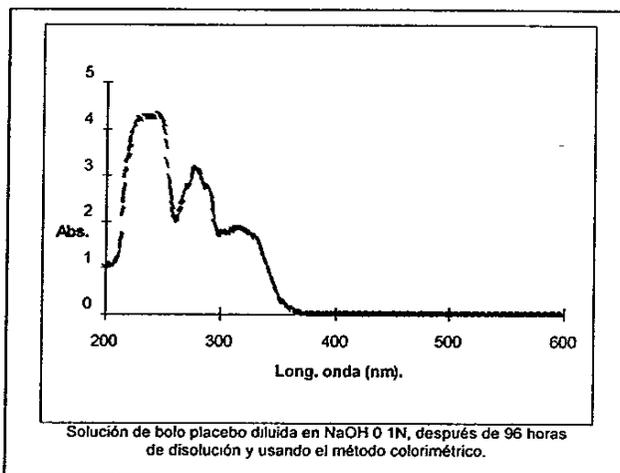
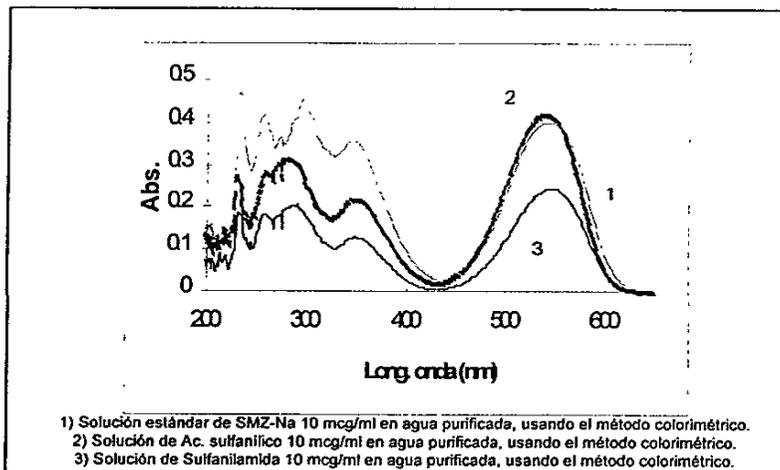


FIG. 11: Barridos de soluciones de diferentes sulfonamidas usando el método de Bratton-Marshall.



Desarrollo del modelo MCP.

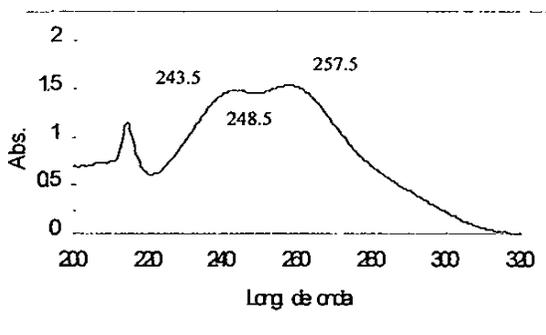
Recordando lo mencionado en el capítulo 2, una parte importante en el método matricial de MCP es la elección de la banda de longitudes de onda para realizar las lecturas espectrofotométricas de las muestras y su tratamiento matemático. Si bien el modelo de MCP es de "análisis de espectro completo", por cuestiones del funcionamiento del equipo espectrofotométrico con el que se cuenta, sólo se eligieron 8 longitudes de onda por lo que el criterio de selección de longitudes de onda se realizó tomando en cuenta los puntos de inflexión del espectro puro principalmente ya que son representativos de las tendencias del espectro.

De acuerdo al barrido de la solución de SMZ-Na (figura 12), se eligieron las longitudes de onda donde se encuentran los rasgos espectrales característicos de este analito:

225, 230, 243.5, 248.5, 257.5, 268, 280 y 292.

A partir de estas longitudes se analizó si el método de MCP era capaz de predecir la concentración de SMZ-Na aún en presencia de los demás componentes disueltos del bolo y sin analizar todas las respuestas a lo largo de la banda espectral completa.

FIG. 12: Barrido de la solución estándar de SMZ-Na en NaOH 0.1 N.



Preparación de las soluciones cuyas respuestas de absorbancia forman la matriz de calibración.

Durante el estudio de disolución las cantidades de componentes disueltos cambian, para establecer el modelo de MCP se empleó un conjunto de soluciones de referencia que representaron las posibles combinaciones de las mezclas de análisis. Para obtener los datos de absorbancias a diferentes longitudes de onda que formaron la matriz se hicieron soluciones agregando diferentes cantidades de medio de disolución del bolo placebo de tal forma que se obtuvieron diferentes "niveles de concentración de excipientes" como se indica a continuación:

Para obtener las soluciones que conformaron la calibración se tomaron en cuenta los volúmenes de dilución empleados en el estudio de disolución. Entonces, para realizar las soluciones de SMZ-Na se decidió agregar 1 ml de medio de disolución del bolo placebo en 25 ml de NaOH 0.1N para tener presentes la mayor cantidad de excipientes disueltos que pudieran interferir con la respuesta de la SMZ-Na.

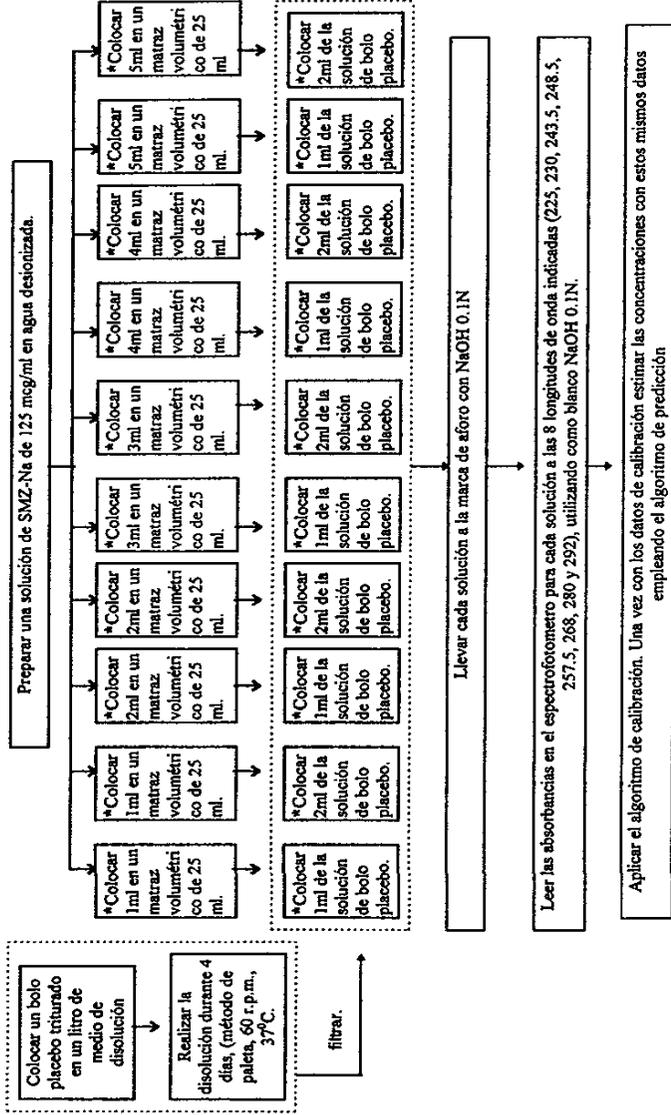
En el **diagrama 7** se indica el procedimiento que se siguió para obtener las soluciones que formaron la matriz de calibración, mientras que en la **tabla IV** se muestra el número de sistemas obtenidos para la misma

TABLA IV: Sistemas obtenidos al elaborar las soluciones para obtener los datos de absorbancia para la matriz de calibración.

Concentración de SMZ-Na (mcg/ml).	Nivel cero de excipientes presentes		Nivel 1 de excipientes presentes.		Nivel 2 de excipientes presentes.	
	sist. 1	sist. 2	sist. 3	sist. 4	sist. 5	sist. 6.
5	sist. 1	sist. 2	sist. 3	sist. 4	sist. 5	sist. 6.
10	sist. 7	sist. 8	sist. 9	sist. 10	sist. 11	sist. 12
15	sist. 13	sist. 14	sist. 15	sist. 16	sist. 17	sist. 18
20	sist. 19	sist. 20	sist. 21	sist. 22	sist. 23	sist. 24
25	sist. 25	sist. 26	sist. 27	sist. 28	sist. 29	sist. 30

Nivel cero: sin medio de disolución del bolo placebo.
 Nivel 1: un ml. de medio de disolución del bolo placebo según el procedimiento del diagrama 7.
 Nivel 2: dos ml de medio de disolución del bolo placebo según el procedimiento del diagrama 7.

DIAGRAMA 7: Procedimiento para obtener los datos de la matriz de calibración.



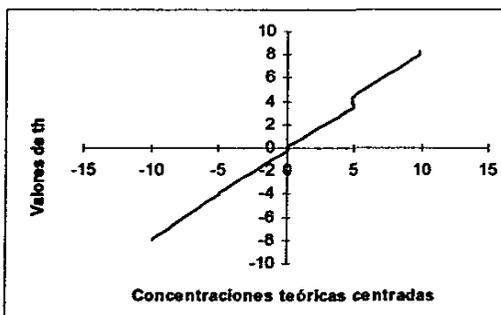
(*Realizar por duplicado).
Este mismo procedimiento se sigue pero sin agregar medio de disolución para obtener los sistemas de nivel de excipientes CERO.

De igual forma se observa que los valores de t_h son una imagen directa de las concentraciones:

TABLA VI: Valores de T_h obtenidos a partir de los W_h para cada concentración de SMZ-Na real (matriz de calibración 1).

Concentraciones reales según la solución estándar.	Concentraciones centradas	Vectores de carga de marcadores (t_h).	Concentraciones reales según la solución estándar	Concentraciones centradas.	Vectores de carga de marcadores (t_h).
4.9352	-9.8704	-8.28	14.8056	0	0.09
4.9352	-9.8704	-7.89	14.8056	0	0.11
4.9352	-9.8704	-8.01	14.8056	0	0.09
4.9352	-9.8704	-7.97	19.7408	4.9352	3.27
4.9352	-9.8704	-7.91	19.7408	4.9352	3.88
4.9352	-9.8704	-7.89	19.7408	4.9352	3.87
9.8704	-4.9352	-3.98	19.7408	4.9352	3.97
9.8704	-4.9352	-3.93	19.7408	4.9352	4.11
9.8704	-4.9352	-4.01	19.7408	4.9352	4.33
9.8704	-4.9352	-3.98	24.676	9.8704	7.85
9.8704	-4.9352	-3.87	24.676	9.8704	7.94
9.8704	-4.9352	-3.83	24.676	9.8704	7.88
14.8056	0	-0.27	24.676	9.8704	7.98
14.8056	0	-0.09	24.676	9.8704	8.16
14.8056	0	-0.01	24.676	9.8704	8.31

FIG. 14: Gráfica de valores obtenidos de t_h contra las concentraciones teóricas centradas.



Para evaluar la capacidad de predicción de los valores obtenidos del modelo y para establecer el número de iteraciones (h) requeridas del algoritmo, se determinaron las concentraciones de las mismas soluciones con los cuales se formó la calibración (Wh, Vh.Bh).

En la tabla VII se muestran los valores estimados para cada curva de calibración y en la tabla VIII se muestra el análisis de las concentraciones determinadas con la matriz de calibración respectiva (Conc. determinada/ Conc. real).

TABLA VII: Valores estimados para h= 4 y h= 7

Curva de calibración 1		Curva de calibración 2	
Concentraciones estimadas (cuatro repeticiones).	Concentraciones estimadas (siete repeticiones).	Concentraciones estimadas (cuatro repeticiones).	Concentraciones estimadas (siete repeticiones).
4.8990	4.9242	4.8551	4.8466
5.0738	5.0086	5.0599	5.0613
5.0096	4.9563	5.0334	5.0656
4.9494	4.9113	4.7415	4.7419
5.0463	5.1148	4.9839	4.9753
4.9131	4.9036	5.0456	5.0582
10.0518	10.0964	9.8374	9.8067
9.8072	9.8332	9.9061	9.9011
9.9210	9.9544	9.9205	9.9209
9.8911	9.7814	9.8122	9.7942
9.9629	9.9302	9.8914	9.9076
9.8168	9.8187	9.9890	9.9846
14.6659	14.6039	14.7594	14.7101
14.9806	14.9991	14.9325	14.9148
14.6245	14.7026	14.4849	14.5185
14.6235	14.7141	14.7863	14.8081
14.7233	14.6716	14.8455	14.8416
14.6319	14.6745	14.6892	14.7081
19.2569	19.3308	19.6316	19.6358
19.7483	19.7295	19.7303	19.7282
19.7675	19.7923	19.7222	19.7188
19.7394	19.7070	19.6298	19.6566
19.7551	19.8266	19.6153	19.5858
19.6563	19.6829	19.8339	19.8348
24.7751	24.7098	24.5965	24.6173
24.8807	24.8278	24.9391	24.9403
24.6613	24.7586	24.6168	24.6425
24.6929	24.7261	24.7548	24.7293
24.7726	24.6546	24.7136	24.6779
24.8691	24.8216	24.6652	24.6902

TABLA VIII: Evaluación de las concentraciones determinadas
(Conc. determinada/Conc. real).

	Número de repeticiones del modelo matricial (th obtenidos).	% de CV para la Calibración 1.	% de CV para la Calibración 2.
	1	1.61	1.40
	2	1.70	1.49
	3	1.10	1.03
	4	1.07	1.09
	5	1.01	1.132
	6	1.00	1.09
	7	0.99	1.08
Hasta th 4.	r ²	0.99960	0.99974
	b	0.005922	0.0382
	m	0.99960	0.99974
Hasta th7.	r ²	0.99966	0.99975
	b	0.004099	0.00369
	m	0.9996	0.99975

Como se observa en la tabla anterior para obtener los datos de th, Wh, Vh y Bh que estimen las concentraciones de muestras desconocidas no es necesario hacer más de 4 repeticiones (h=4) del proceso matemático establecido en el algoritmo.

Por lo tanto el modelo establecido para MCP, el diseño de las soluciones para obtener los datos de la matriz de calibración, las condiciones de análisis y las longitudes de onda seleccionadas producen matrices de calibración adecuadas para la estimación de concentraciones desconocidas de SMZ-Na a través del algoritmo señalado para MCP

(3) CONDICIONES FINALES PARA EL ANÁLISIS.

- Emplear el método de disolución de paletas USP XXII, a 60 r.p.m. y 37°C, usando un litro de agua desionizada (18 mΩ) como medio de disolución. Cualquier muestra que provenga de este medio de disolución debe filtrarse.
- El modelo matricial establecido para el método de MCP debe realizarse según el algoritmo establecido (Haaland, 1988:1193-1202), con 4 repeticiones de los cálculos de t_h para estimar las concentraciones de SMZ-Na de muestras desconocidas.
- Las muestras de análisis deben estar en NaOH 0.1N y leerse en el espectrofotómetro a 225, 230, 243.5, 248.5, 257.5, 268, 280 y 292 nm.
- Todas las soluciones de NaOH empleadas para los estudios deben estar preparadas con agua desionizada (18 mΩ).
- Las matrices de calibración deben provenir de soluciones diluidas en 25 ml de NaOH 0.1 N.
- La formulación y peso de los bolos empleados para el estudio se muestra en la tabla I de este capítulo.

(CAPÍTULO III)

***Optimización y Validación
del Método Analítico.***



Ya que durante el proceso experimental la validación fue del tipo concurrente, en este capítulo se muestran tanto los estudios realizados para mejorar las características del método (optimizar) como la validación del mismo; la optimización se realizó conjuntamente con la determinación de la linealidad del sistema, linealidad del método, precisión y exactitud, y consistió básicamente en elegir las longitudes de onda para formar la matriz de calibración cuya solución proporcionase las mejores estimaciones de las concentraciones.

El material y equipo empleado fue el descrito en la **sección 1 del capítulo 2**. De igual forma, el método desarrollado y las condiciones de trabajo (medio de disolución, tratamiento de muestras, temperatura, lecturas de longitud de onda), ya han sido mencionados en la **sección 3 del capítulo 2**.

Por otro lado, las características del método, así como los valores de los criterios especificados, para establecer la confiabilidad se muestran en la **cuadro X**.

CUADRO X: Especificaciones para la evaluación de las características del método (Manual de validación, CNQFB:1-11).

CARACTERÍSTICA A EVALUAR	CRITERIO DE EVALUACIÓN	ESPECIFICACIÓN (Criterio de aceptación)
Linealidad del sistema.	Coefficiente de variación (CV).	Menor o igual a 2.00%
	Coefficiente de determinación (r^2)	Mayor o igual a 0.98
	Coefficiente de correlación (r).	Mayor o igual a 0.99
Calibración del método (linealidad del método).	CV	Menor o igual a 3%
	r^2	Mayor o igual a 0.98
	r	Mayor o igual a 0.99
Precisión.	CV.	Menor o igual a 3.00%
Exactitud.	Prueba "t de student".	El valor calculado de "t" debe ser menor al valor tabulado bajo el nivel de significancia de 0.05.
Especificidad.	Prueba "t de student".	El valor calculado de "t" debe ser menor al valor tabulado bajo el nivel de significancia de 0.05.
Reproducibilidad.	*Modelo Factorial Jerárquico o Producto Simbólico Simple.	Se debe establecer que no hay diferencia significativa con soporte estadístico (No rechazar la hipótesis nula, Ho).
Estabilidad.	**Diferencia Mínima Significativa (DMS)	Se debe establecer que no hay diferencia significativa con soporte estadístico (No rechazar la hipótesis nula, Ho).
* Para los cálculos ver el apéndice 1.		
** Para los cálculos ver el apéndice 2		

(1) OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO.

(1.1) LINEALIDAD DEL SISTEMA.

La linealidad del sistema es la capacidad del mismo para asegurar que las respuestas analíticas son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo determinado de concentraciones.

La linealidad del sistema se evaluó construyendo y resolviendo una matriz de calibración a dos "niveles de concentración de excipientes", dichos niveles se establecieron como se indicó en el desarrollo del método, capítulo 2.

Cabe señalar que con el fin de evaluar las longitudes de onda que dan mejores resultados al resolver la matriz de calibración, se evaluaron los sistemas en 2 diferentes grupos de 8 longitudes cada uno:

Grupo A de 225,230, 243.5, 248.5, 257.5, 268, 280, 292 nm.

Grupo B de 215, 220, 225, 230, 243.5, 248.5, 257.5, 292 nm.

El grupo A está constituido por las longitudes de onda empleadas en el capítulo 2; la elección de las longitudes del grupo B se basan en el mismo criterio que se tomó para el grupo A (selección de puntos de inflexión), sólo que en este caso se incluyeron más longitudes menores de 243.5 (primer máximo), ya que en la banda de 210-240 nm se observó que la presencia de los excipientes disueltos se manifestaba más fácilmente (Ver las figuras 7 y 12, capítulo 2).

Los sistemas obtenidos así como su elaboración se muestran en la tabla IX y el diagrama 8 respectivamente.

DIAGRAMA 8: Procedimiento experimental para obtener las soluciones cuyas absorbancias forman la matriz de calibración del sistema.

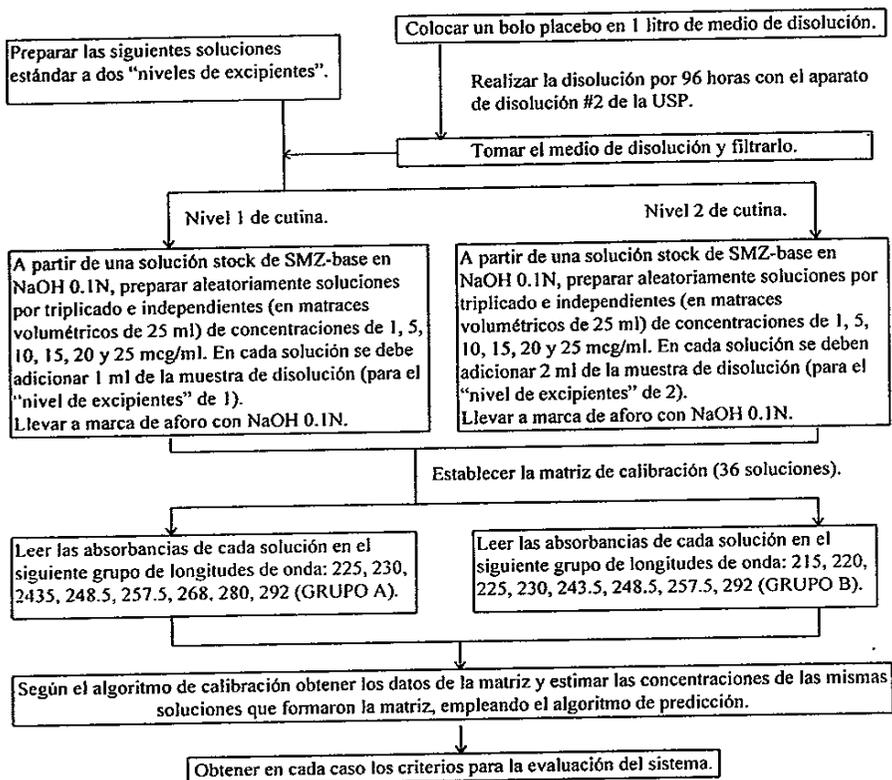


TABLA IX: Sistemas que se obtienen en cada grupo de longitudes para evaluar la linealidad del sistema según el procedimiento del diagrama 8 (llevar a marca de aforo con NaOH 0.1 N).

Conc. SMZ-Na (mcg/ml).	Nivel de excipientes 1			Nivel de excipientes 2		
	sist 1	sist 7	sist 13	sist 19	sist 25	sist 31
1	sist 2	sist 8	sist 14	sist 20	sist 26	sist 32
5	sist 3	sist 9	sist 15	sist 21	sist 27	sist 33
10	sist 4	sist 10	sist 16	sist 22	sist 28	sist 34
15	sist 5	sist 11	sist 17	sist 23	sist 29	sist 35
20	sist 6	sist 12	sist 18	sist 24	sist 30	sist 36

En la sig. tabla (tabla X) se muestran los resultados de las concentraciones estimadas para los sistemas elaborados de acuerdo al grupo de longitudes empleadas.

TABLA X: Resultados obtenidos de concentraciones estimadas (recuperadas).

Concentración real.	Concentración estimada.		Concentración real.	Concentración estimada.	
	Grupo de longitudes A.	Grupo de longitudes B.		Grupo de longitudes A.	Grupo de longitudes B.
1.0126	1.0876	1.1252	15.1902	15.0733	16.0351
1.0126	0.9648	1.1296	15.1902	15.1510	15.7439
1.0126	1.0726	1.0869	15.1902	15.0748	15.8326
1.0126	0.9964	1.1184	15.1902	15.1274	15.9086
1.0126	1.0294	1.0633	15.1902	14.9681	15.7646
1.0126	1.0166	1.0533	15.1902	14.9973	15.8015
5.0634	5.0927	5.4238	20.2536	20.1802	21.2372
5.0634	5.0648	5.4205	20.2536	20.0432	21.4389
5.0634	5.1121	5.3110	20.2536	20.0857	21.5408
5.0634	5.0578	5.2945	20.2536	20.0996	21.5817
5.0634	5.1774	5.3650	20.2536	20.1686	21.2279
5.0634	5.1312	5.3412	20.2536	20.3272	21.3122
10.1268	10.1218	10.7441	25.3170	25.2356	26.9765
10.1268	9.9535	10.4653	25.3170	25.3155	26.8451
10.1268	9.9686	10.6662	25.3170	25.4271	26.5222
10.1268	9.8884	10.6606	25.3170	25.1038	26.6405
10.1268	9.9678	10.5200	25.3170	25.1724	26.8893
10.1268	10.1105	10.7041	25.3170	25.3413	26.9116

Una vez que se obtuvieron las concentraciones estimadas de SMZ-base se hizo el análisis de regresión (Conc. real en función de la Conc. estimada), y se obtuvieron los valores de porcentajes de CV. Estos datos se muestran en la siguiente tabla:

TABLA XI: Resultados de la evaluación de la linealidad del sistema.

	Evaluación de los resultados cuando se empleó el grupo de longitudes A.	Evaluación de los resultados cuando se empleó el grupo de longitudes B.
CV.	2.03%	1.77%
r^2	0.99988	0.99977
r	0.99993	0.99988
m	1.00046	1.05541
b	-0.0089	-0.2653
*Prueba del intercepto, valor de "t calculada", ($t_{TAB} = 2.0301$)	0.0134	-0.01731

* Ver el apéndice 3 para su calculo.

Como se observa, cuando se emplea el grupo de longitudes A para realizar la matriz, el valor del CV es ligeramente mayor del 2% (2.03), mientras que los coeficientes de correlación son mayores a 0.99 en ambos grupos, por lo que al resolver la matriz para el grupo de longitudes A o B la estimación de las concentraciones se considera buena.

Ésto último también se observa en el coeficiente de determinación, el cual muestra que la curva es lineal en el intervalo de concentración de 1 a 25 mcg/ml. Con estos mismos datos se realizó una prueba adicional (prueba del intercepto); en ambos grupos de longitudes se observa que el valor de t calculada es menor que el valor de t tabulada (t tabulada con valor de 2.0301, a un nivel de significancia de 0.05), por lo cual se considera que las matrices de calibración pasan por el origen con lo que se dice que ambas curvas presentan buena propiedad de linealidad.

(1.2.) LINEALIDAD DEL MÉTODO.

La linealidad del método es la capacidad del mismo para asegurar que la relación establecida entre la cantidad de activo adicionada y la cantidad de activo determinada son directamente proporcionales en un intervalo de concentraciones determinado.

Al emplear SMZ-Na en base seca ésta absorbía muy fácilmente la humedad del ambiente, lo cual dificultaba realizar las pesadas adecuadamente y se producía mayor variación entre cada medición, por ello fue necesario usar SMZ-Na en base húmeda; la siguiente ecuación permite hacer la corrección en cuanto a peso y concentración según el Porcentaje de Humedad (%H) que presente el analito:

$$\text{Concentración teórica} \times \frac{(100-\%H)}{100} = \text{Concentración teórica real}$$

Con el fin de tener una matriz de calibración óptima que incluyera las posibles combinaciones que se presentan durante la disolución, (alta cantidad de excipientes disueltos con baja liberación de SMZ-Na, baja cantidad de excipientes disueltos con alta liberación de SMZ-Na, ambos en baja cantidad, ambos en alta cantidad), se obtuvieron muestras del medio de disolución con placebo a diferentes tiempos en un intervalo de 4 días. De ésta forma se preparan soluciones estándar equivalentes a 20, 40, 60, 80, 100 y 120% disuelto del contenido de SMZ-Na en el bolo cargado. Estos porcentajes se eligen en base a la prueba de disolución realizada en el capítulo 2, (al igual que en la Linealidad del Sistema, se evaluaron los 2 grupos de longitudes de onda).

En la **diagrama 9** y la **tabla XII** se muestra el procedimiento para la obtención de las muestras, cuyas respuestas produjeron la matriz de calibración.

DIAGRAMA 9: Procedimiento para crear la matriz de calibración del método

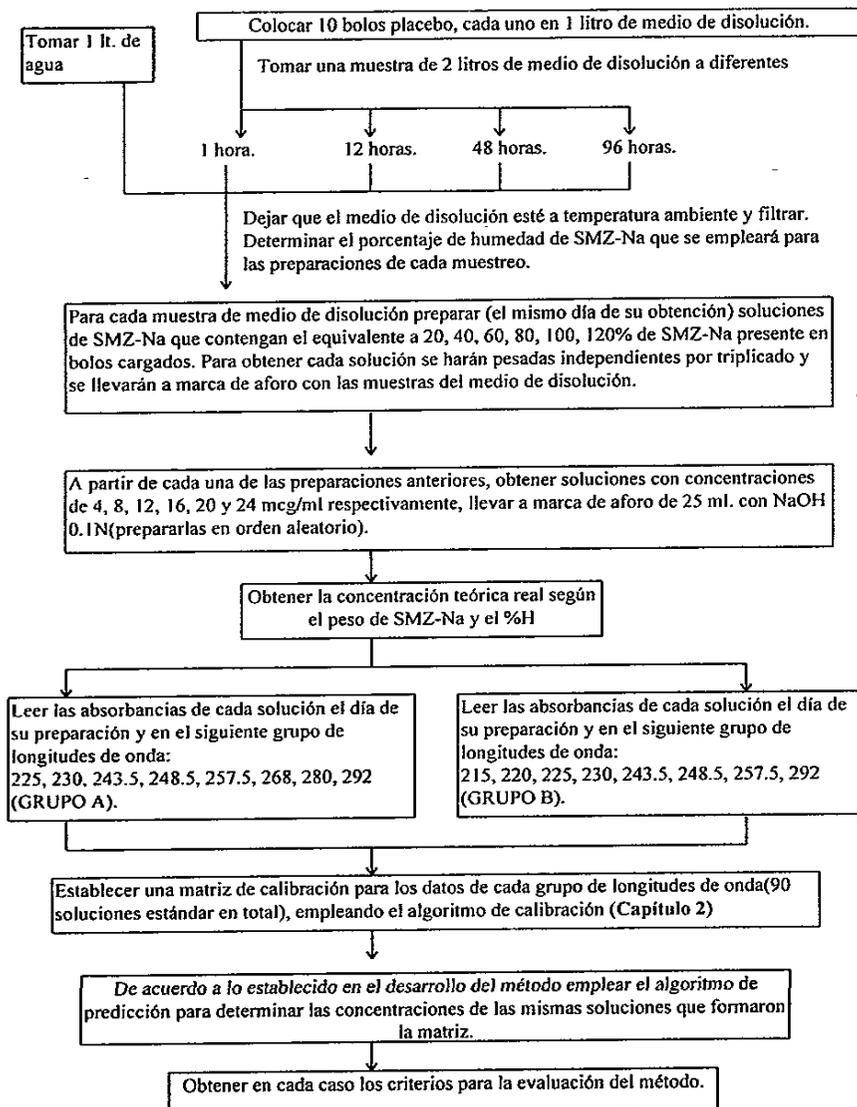


TABLA XII: Sistemas y datos de humedad obtenidos.
 Estos sistemas se evaluaron tanto en el grupo de longitudes de onda A como en el grupo B.

Tiempo de muestreo (horas).	Concentraciones teóricas (por triplicado).	*Porcentaje de humedad de SMZ-Na	Tiempo de muestreo (horas).	Concentraciones teóricas (por triplicado).	*Porcentaje de humedad de SMZ-Na
0	4	6.70	48	4	6.40
	8			8	
	12			12	
	16			16	
	20			20	
	24			24	
1	4	6.60	96	4	5.57
	8			8	
	12			12	
	16			16	
	20			20	
	24			24	
12	4	6.28		4	
	8			8	
	12			12	
	16			16	
	20			20	
	24			24	

* Cabe señalar que por cuestiones de planeación, la evaluación no se realizó en orden ascendente de tiempo de muestreo, lo cual explica que los %H no aumenten con el tiempo y no sean iguales para el tiempo de 0 y 1 hora.

Una vez que se obtienen las calibraciones respectivas para cada grupo de longitudes de onda y, de acuerdo a lo establecido en el desarrollo del método, se empleó el algoritmo de predicción para determinar las concentraciones de las mismas soluciones que formaron la matriz, en la **tabla XIII** se observan los resultados de la determinación de concentraciones de las soluciones.

TABLA XIII: Resultados de concentraciones estimadas (determinadas) para el grupo de longitudes A y B.

Conc. teórica corregida con % H	Conc. Estimada Gpo. A	estimada Gpo. B	Conc. teórica corregida con % H	Conc. estimada Gpo. A	Conc. estimada Gpo. B
4.0595	3.7592	3.5800	15.2190	14.7940	14.8681
4.4308	4.1639	4.0923	15.0480	14.7790	14.7665
4.2200	3.9488	3.7652	15.2220	14.7660	14.7641
8.1526	7.8320	7.7536	18.8100	18.5090	18.5664
8.0033	7.8670	7.6239	18.8200	18.3550	18.4090
7.7336	7.5142	7.3424	19.1940	18.8470	18.8815
11.3750	11.3060	11.1880	22.6870	22.5550	22.7174
11.3840	11.2300	11.0672	22.7190	22.3160	22.4652
11.6000	11.3620	11.1920	22.6850	22.3030	22.5795
15.5770	15.3630	15.1958	4.3655	3.9412	3.57771
15.1720	15.0540	14.9565	4.6332	4.1656	4.0558
15.2150	14.9390	14.9755	4.2045	3.6267	4.1320
18.9640	18.8520	18.7906	7.9841	7.4659	7.6215
18.8410	18.5860	18.3845	7.7604	7.2150	7.2235
19.2540	19.0200	18.9693	7.6677	7.0289	7.2942
22.9280	22.5120	22.3182	11.8060	11.2370	11.2593
22.4960	22.2420	22.0420	11.7470	11.2990	11.4466
23.1790	22.8970	22.9059	11.4760	11.0010	11.2001
3.85870	3.8214	3.72958	15.2430	14.7340	15.1946
4.5598	4.2916	4.20402	15.4240	14.8540	15.0475
4.3263	4.1390	4.10786	15.4500	15.0190	14.6527
8.0548	7.8932	7.84811	19.3240	18.8520	18.8901
7.9269	7.6214	7.58211	19.5950	19.4420	19.1726
8.3051	8.0628	7.97501	19.0000	18.5510	18.6938
11.4040	11.1630	11.0553	22.6430	22.1980	22.7119
11.4590	11.1160	11.0864	22.7340	22.2030	23.2518
11.4390	11.2450	11.0182	22.9950	22.6060	23.4023
15.7720	15.3740	15.2837	4.1077	3.8888	4.15155
15.0980	14.8270	14.6820	4.2069	3.8035	4.46834
15.6770	15.3120	15.2422	3.8499	3.5037	4.48907
18.8730	18.7680	18.6029	7.9161	7.5066	7.88130
19.3670	19.1480	19.0849	8.0388	7.5074	7.93215
19.1200	18.8820	18.5808	7.9198	7.6329	7.91046
23.0230	22.7850	22.4716	11.4760	11.0860	11.6621
22.9160	22.5390	22.4881	11.5030	11.1120	11.9054
23.3170	23.2220	23.0265	11.3970	10.9720	11.6960
4.48170	4.1255	3.9473	15.7760	15.4430	16.3518
4.0899	3.7789	3.5945	15.1990	14.8350	15.9419
4.0506	3.7312	3.7481	15.6370	15.2780	15.9965
7.5585	7.1769	7.1565	19.3130	18.8330	19.8795
7.5295	7.1950	7.1299	19.6490	19.3240	20.3805
7.6091	7.3838	7.2861	19.3500	18.9710	20.0111
11.3840	10.9930	11.0822	23.0860	22.9480	24.8588
11.4600	11.2320	11.1720	23.1010	22.6270	24.9065
11.2640	11.0030	10.9225	23.2870	22.6160	24.2967

A partir de los valores de concentraciones determinadas y las teóricas se obtuvieron los criterios de evaluación para esta característica del método; los resultados de estas pruebas se muestran en la **tabla XIV**.

TABLA XIV: Resultados de los criterios de evaluación

	<i>Matriz de Calibración para el Grupo de longitudes A.</i>	<i>Matriz de calibración para el Grupo de longitudes B.</i>
CV	2.6816	2.9376
r^2	0.9995	0.9995
r	0.9997	0.9997
b	-0.3268	-0.3844
m	0.9995	0.9995
*Pba. del intercepto, valor de "t calculada". ($t_{TAB} = 1.9860$)	1.9093	1.9668
* Ver el apéndice 3 para su cálculo		

Al analizar la **tabla XIV** se observó que para ambos grupos de longitudes de onda los valores de CV, r , r^2 y t calculada son adecuados (valor de t tabulada a un nivel de significancia de 0.05 tiene un valor de 1.9860). Además los criterios evaluados presentan valores más aceptables para el grupo A que para el B, aunque la diferencia no es muy marcada. Por lo tanto las concentraciones determinadas por el método, bajo las condiciones establecidas, cumplen con la características de linealidad del método al emplear las absorbancias de cualquiera de los dos grupos de longitudes de onda, ya que generan una curva lineal en el intervalo de concentraciones de 4 a 24 mcg/ml.

(1.3.) PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO.

La precisión es el grado de concordancia de un conjunto de resultados analíticos del método respecto al valor medio de los mismos datos; mientras que la exactitud se define como el grado de concordancia entre un valor medio determinado a través de resultados analíticos del método y el valor de referencia.

Con el fin de brindar mayor confiabilidad de que los resultados obtenidos son cercanos a los reales, no se emplearon bolos placebo para el estudio sino los bolos cargados (con SMZ-Na) y se realizó el estudio a través de adiciones patrón de una solución de SMZ-Base.

Para el estudio de estas características del método se tomaron muestras de 1, 48 y 96 horas de tiempo de disolución del bolo cargado. A partir de cada muestra se prepararon soluciones de aproximadamente 8, 15 y 20 mcg SMZ-Na/ ml en NaOH 0.1N por sextuplicado (de acuerdo a las estimaciones de cantidades disueltas, capítulo 2). Estas soluciones se preparan nuevamente pero se les adiciona una cantidad conocida de SMZ-Base (proveniente de una solución stock en NaOH) antes de llevar a la marca de aforo.

Tanto de las soluciones de SMZ-Na (mtra.) como sus correspondientes soluciones con SMZ-Base (mtra.+std.) y las soluciones estándar de SMZ-Base (std.) se obtuvo su lectura de absorbancia a los 2 grupos de longitudes de onda señalados en la linealidad del método. Cabe mencionar que las concentraciones de las soluciones se estimaron en la matriz de calibración respectiva al grupo de longitudes de onda empleado (obtenidas en la linealidad del método).

Los procedimientos antes descritos se desglosan en el **diagrama 10** y la **tabla XV**.

Cabe señalar que las soluciones de SMZ-Na, SMZ-Base y SMZ base con SMZ-Na, se identifican como mtra, std y mtra+std respectivamente

DIAGRAMA 10: Procedimiento para obtener las muestras y respuestas para realizar el análisis.

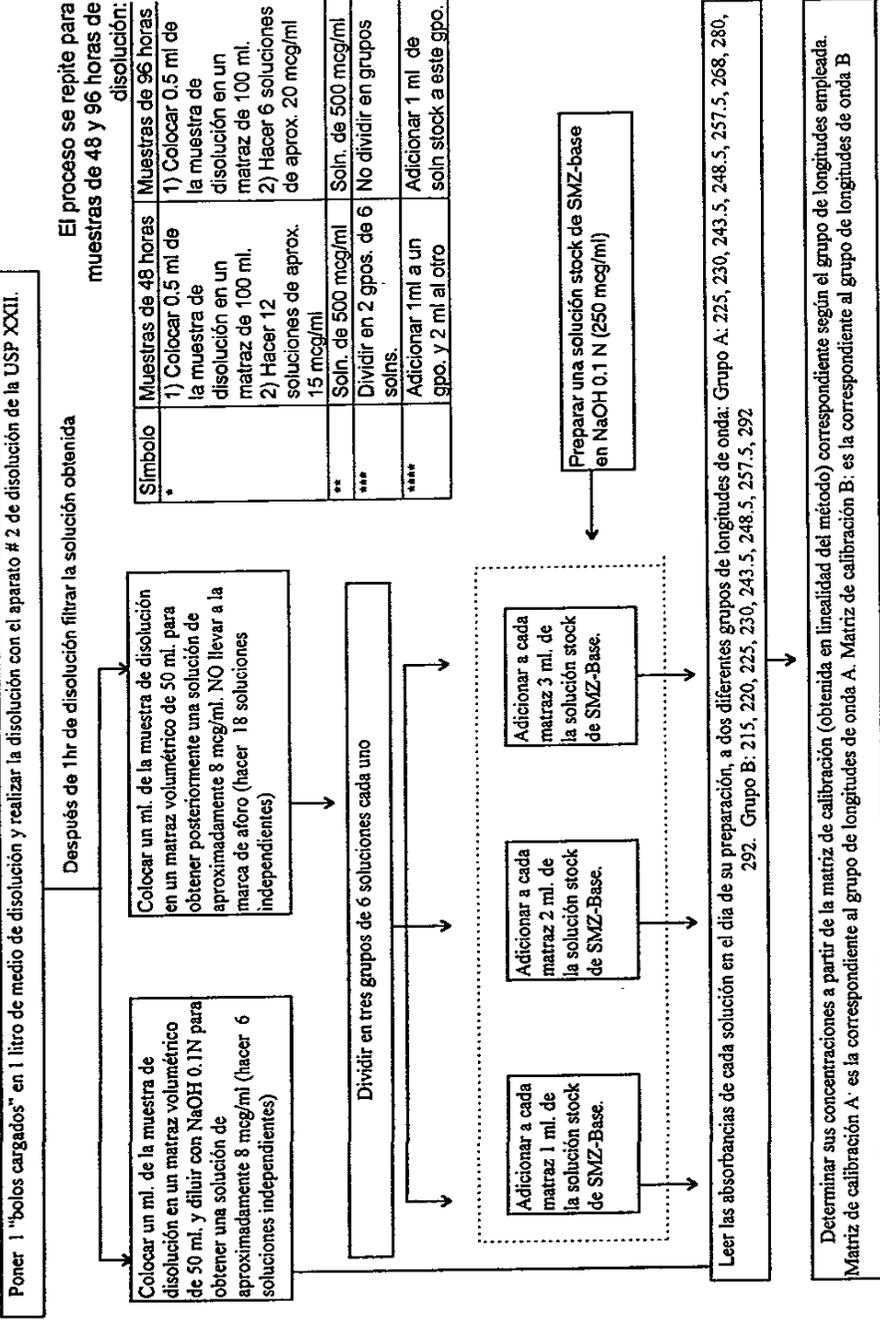


TABLA XV: Sistemas evaluados tanto para el grupo de longitudes A y B

Tiempo de muestreo (horas).	*Conc. final aproximada de solns. de SMZ-Na de la muestra de disolución. (mcg/ml)	Conc. final de la soln. std. de SMZ-base (mcg/ml)	Concentraciones finales de mtra+std aproximadas.		
			std = 5mcg/ml	std=10 mcg/ml	std=15 mcg/ml
1	8	5 10 15	13	18	23
48	15	5 10	20	25	-
96	20	5	25	-	-

*Las posibles concentraciones de SMZ-Na en el medio de disolución se basan en el estudio de disolución realizado en el capítulo 2. A partir de estos datos se hacen los cálculos de volúmenes requeridos para preparar las soluciones finales en NaOH 0.1N.

Una vez que se obtuvieron las concentraciones de las muestras se realizó la evaluación a partir de la concentración determinada de Sulfametazina base por:

$$\text{Conc. (mtra+std)} - \text{Conc. (mtra)} = \text{Conc determinada de SMZ-base,}$$

y se calcularon los % de CV de estos datos con respecto a la concentración de SMZ-Base real para cada concentración y cada día. De igual forma los valores estadísticos de t se obtuvieron a través de la ecuación:

$$t_{\text{calc.}} = \frac{\bar{X}_{\text{Conc.determinada SMZ-Base}} - \mu_{\text{Conc. teórica SMZ-Base}}}{S_{(\text{Conc.determinada de SMZ-Base.})}}$$

En la tabla XVIa y XVIb se muestran los resultados obtenidos.

TABLA XVIa: Concentraciones estimadas al emplear las matrices de calibración A y B.

Matriz de calibración A.					
Tiempo de muestreo (hrs.)	*Tipo de muestra.	Conc. Promedio determinada.	Desviación estándar.	CV%	t calculada
1	std1	5.5240			
	std2	11.0089			
	std3	16.2550			
	(m+std1)-m	5.5779	0.1159	2.07	0.46
	(m+std2)-m	11.0928	0.1059	0.95	0.79
	(m+std3)-m	16.7411	0.1518	0.90	3.20
48	std1	5.6346			
	std2	10.9667			
	(m+std1)-m	5.4743	0.1993	3.64	-0.80
	(m+std2)-m	11.0553	0.3372	3.05	-0.26
96	std1	4.8420			
	(m+std1)-m	4.7555	0.3215	6.76	-0.26
Matriz de calibración B					
1	std1	5.3566			
	std2	10.6652			
	std3	15.9667			
	(m+std1)-m	5.5273	0.1648	2.98	1.03
	(m+std2)-m	11.1149	0.1482	1.33	3.03
	(m+std3)-m	16.6831	0.1816	1.09	3.94
48	std1	5.6391			
	std2	11.2477			
	(m+std1)-m	5.5765	0.1001	1.64	-0.68
	(m+std2)-m	11.2001	0.3202	2.61	-0.16
96	std1	4.8526			
	(m+std1)-m	4.9522	0.1566	2.89	0.63

* El valor de t de tablas es de ± 2.5706 para un nivel de significancia de 0.05 y 5 g.l.
std1, std2 y std3 simbolizan las muestras estándar de 8, 15 y 20 mcg/ml respectivamente
m: muestra.

TABLA XVIIb: Resumen de resultados para contrastar los criterios de evaluación obtenidos para cada grupo de datos.

	Tiempo (hr)	Datos obtenidos a partir de la Matriz de calibración A	datos obtenidos a partir de la Matriz de calibración B
CV%	1	2.07	2.98
		0.95	1.33
		0.90	1.09
	48	3.64	1.64
		3.05	2.61
		6.76	2.89
t calculada (t tablas = ± 2.5706).	1	0.46	1.03
		0.79	3.03
		3.20	3.94
	48	-0.80	0.68
		-0.26	0.16
		-0.26	0.63

Como se observa en la tabla XVIIb, los resultados obtenidos con la matriz de calibración B son más precisos (CV menor de 3%) que aquellos obtenidos con la matriz A.

Por otra parte, al evaluar la exactitud del método, ambos conjuntos de datos presentan desviaciones en las muestras de una hora de disolución. Lo anterior puede deberse a que las cantidades liberadas de SMZ-Na no son uniformes, lo cual puede conducir a un mayor número de variaciones en la determinación de las concentraciones en comparación con las determinaciones para las muestras de 48 y 96 horas de disolución.

Además de ello, hay que considerar que dichas desviaciones se presentaron a concentraciones de 10 y 15 mcg/ml, las cuales son poco probables de obtenerse a éste tiempo de disolución (3.59% de SMZ-Na total disuelta).

Por otra parte se debe recordar que los criterios de aceptación para evaluar las características del método pueden variar y están determinados por los objetivos del método. Así entonces el análisis de la desviación de los valores permite evaluar la incertidumbre en la estimación de la media de los valores reales. De este modo se reporta que la magnitud del analito y la complejidad de la matriz resultan importantes para el análisis, pudiendo tomar como aceptable, para muestras de concentraciones pequeñas, una desviación del 5-10%.

Se decidió determinar adicionalmente el porcentaje de desviación de la concentración estimada con respecto al valor real, para las muestras de una hora de disolución (ver tabla XVII), empleando la fórmula:

$$(\text{valor estimado} - \text{valor real}) / \text{valor real}.$$

Como se observa en dicha tabla, en términos prácticos, no resulta significativa la desviación observada por lo que se afirma que el método es exacto.

TABLA XVII: Desviaciones de las concentraciones estimadas después de 1 hr. de muestreo. (matriz de calibración B)

CONCENTRACIONES (mcg/ml)	PORCENTAJE DE DESVIACIÓN.	PROMEDIO. (%)
5	4.68 5.06 3.89 3.17 6.27 2.38	4.24
10	3.57 6.05 4.71 1.59 5.04 4.34	4.21
15	2.52 4.82 4.45 4.08 6.38 4.68	4.48

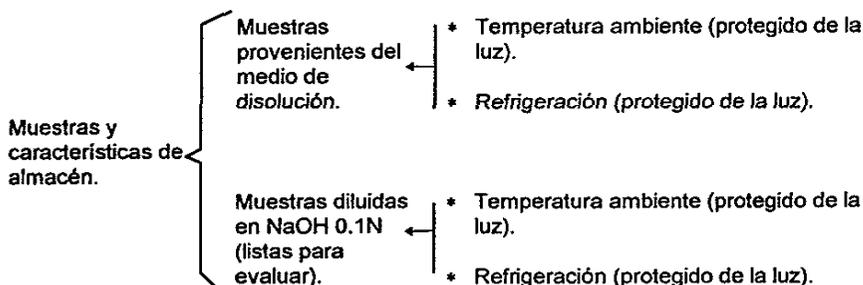
(1.4) CONDICIONES ÓPTIMAS.

Como se menciona en los tres apartados anteriores, se estableció que la **MATRIZ DE CALIBRACIÓN ÓPTIMA** es aquella que contempla las longitudes de onda 215, 220, 225, 230, 243.5, 248.5, 257.5 y 292, ya que no importa cuánta SMZ o excipientes han sido liberados el método es capaz de hacer la predicción confiablemente, por lo cual estas longitudes de onda son las que se emplearon para determinar la absorbancia de las muestras durante el resto del estudio.

(2) ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS.

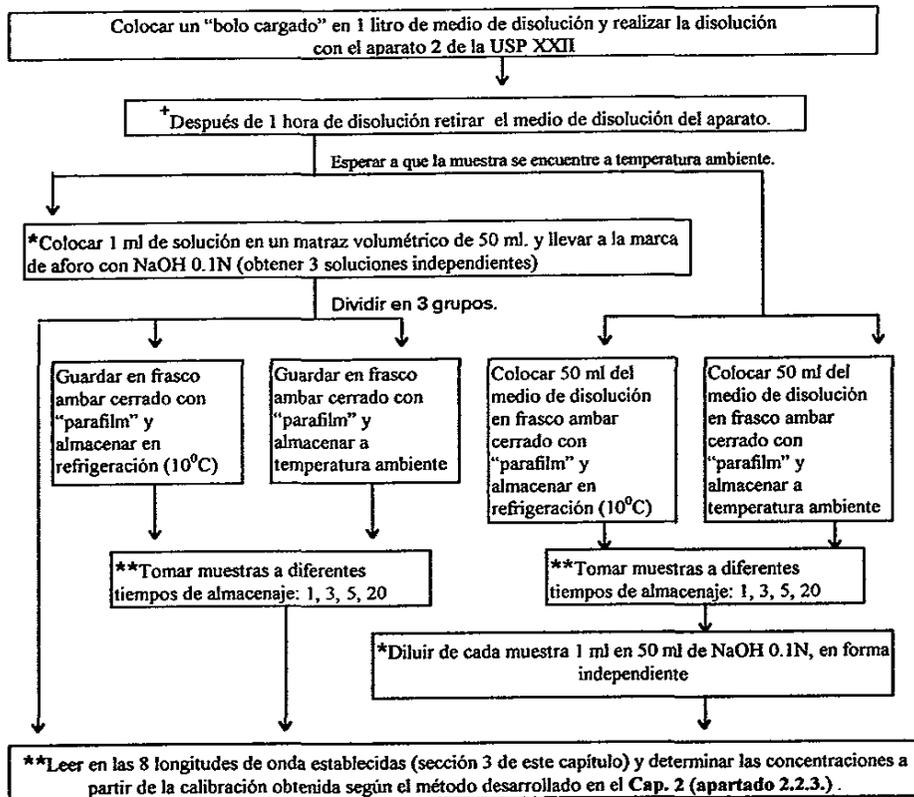
A través de la prueba de estabilidad se determina el tiempo y las características de almacenaje en los cuales no se presentan cambios significativos de la concentración de las muestras analizadas.

Los tiempos de almacenaje elegidos para el estudio fueron 0, 1, 3, 5 y 20 días , mientras que las características de almacenaje se muestran a continuación:



Además con el fin de evaluar la estabilidad de las muestras cuando se tienen diferentes cantidades de SMZ-Na y excipientes disueltos, se realizó el estudio de estabilidad a partir de muestras de 1, 48 y 96 horas de disolución (en la **diagrama 11** se muestra el procedimiento para realizar el estudio).

DIAGRAMA 11: Procedimiento experimental para la prueba de estabilidad.
 †(EL PROCEDIMIENTO SE REPITE PARA TIEMPOS DE DISOLUCIÓN DE 48 Y 96 HORAS)



* En el caso de 48 y 96 horas de muestreo tomar 0.5 ml de muestra y diluir en 100 ml de NaOH 0.1N, en forma independiente.

** Las muestras que se leen para cada tiempo de almacenaje no deben regresarse al frasco del cual provienen, es decir, deben desecharse.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Una vez que se determinaron las concentraciones de las muestras (tabla XVIII), se estableció si existía diferencia significativa entre los resultados de 1, 3, 5 y 20 días de almacenaje con respecto a los valores obtenidos a 0 días de almacenaje. Cabe señalar que esta determinación se realizó en forma separada para cada tiempo de disolución establecido (1, 48 y 96 horas) empleando el análisis de Diferencia Mínima Significativa, DMS (ver el apéndice 2 para su cálculo); si los valores absolutos de las diferencias entre medias de cada muestreo son menores a los valores correspondientes de DMS se considera que la diferencia "es no significativa".

En la tabla XIX se muestran los resultados de la prueba de DMS.

En general se puede decir que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores obtenidos al tiempo 0 y los de 1, 3 y 5 días de almacén. Si bien se observan algunas desviaciones durante las mediciones de las muestras obtenidas en la primera hora de disolución, éstas pueden atribuirse a que durante el tiempo de disolución la liberación de SMZ-Na no es uniforme, además que las concentraciones son bajas por lo que el ruido que se presenta en la respuesta puede ser más significativo, (como se indicó en el apartado anterior, 1.3)

TABLA XVIII: Concentraciones resultantes de las muestras analizadas.

Tiempo de disolución (hrs).	Condición de almacén.	Medio en que se almacena la muestra.	Tiempo de almacén (días)					
			0	1	3	5	20	
1	Refrigeración.	MD	7.83	7.67	7.90	7.90	8.74	
			7.90	7.78	7.98	7.91	8.73	
			7.93	7.79	7.88	7.89	8.79	
		NaOH	7.83	7.59	9.91	9.67	12.03	
			7.90	7.51	9.05	9.05	12.65	
			7.93	7.25	10.00	8.56	11.12	
	Ambiente.	MD	7.83	7.73	7.62	7.67	8.36	
			7.90	7.46	7.83	7.81	8.33	
			7.93	7.85	7.88	7.96	8.32	
		NaOH	7.83	8.00	8.61	9.27	13.73	
			7.90	7.41	8.59	12.52	13.27	
			7.93	7.42	8.35	9.84	13.26	
48	Refrigeración.	MD	10.41	10.67	21.20	10.88	13.32	
			10.40	10.88	21.66	10.31	13.69	
			10.42	10.64	19.75	10.75	13.28	
		NaOH	10.41	10.92	12.11	13.88	16.67	
			10.40	11.03	11.67	12.84	16.02	
			10.42	11.84	13.92	14.68	18.87	
	Ambiente.	MD	10.41	10.21	21.72	11.51	18.01	
			10.40	10.60	21.45	11.23	17.63	
			10.42	10.78	22.13	11.07	17.97	
		NaOH	10.41	10.77	12.69	12.87	17.77	
			10.40	11.15	11.64	11.91	16.81	
			10.42	11.58	11.23	11.49	15.08	
	96	Refrigeración.	MD	14.55	14.30	14.40	14.31	14.90
				14.59	14.47	14.47	14.02	14.80
				14.48	14.57	14.14	14.56	14.90
			NaOH	14.55	15.71	15.62	15.57	15.70
				14.59	15.70	15.45	15.32	23.75
				14.48	15.26	15.44	15.25	15.51
Ambiente.		MD	14.55	15.44	15.16	14.57	16.40	
			14.59	14.58	14.64	14.47	16.99	
			14.48	14.09	15.15	14.78	16.44	
		NaOH	14.55	14.76	15.55	15.87	18.63	
			14.59	15.45	15.47	15.86	18.97	
			14.48	15.36	15.64	15.74	15.89	

MD = Medio de disolución.

TABLA XIX: Resumen de ANADEVa para la prueba de DMS.

Tiempo de disolución (hrs).	Condición de almacén.	Medio en que se almacena la muestra.	Comparaciones entre días de almacén.	Resultado según el valor de DMS	
				Con los datos de 20 días	Sin los datos de 20 días.
1	Refrigeración	MD	0-1	S	S
			0-3	NS	NS
			0-5	NS	NS
			0-20	S	-
	NaOH	0-1	NS	NS	
		0-3	S	S	
		0-5	NS	S	
		0-20	S	-	
	Ambiente	MD	0-1	S	NS
			0-3	NS	NS
			0-5	NS	NS
			0-20	S	-
NaOH	0-1	NS	NS		
	0-3	NS	NS		
	0-5	S	S		
	0-20	S	-		
48	Refrigeración	MD	0-1	NS	NS
			0-3	NS	NS
			0-5	NS	NS
			0-20	S	-
	NaOH	0-1	NS	NS	
		0-3	S	S	
		0-5	S	S	
		0-20	S	-	
	Ambiente	MD	0-1	NS	NS
			0-3	S	S
			0-5	S	S
			0-20	S	-
NaOH	0-1	NS	NS		
	0-3	S	S		
	0-5	S	S		
	0-20	S	-		
96	Refrigeración	MD	0-1	NS	NS
			0-3	NS	NS
			0-5	NS	NS
			0-20	S	-
	NaOH	0-1	NS	NS	
		0-3	NS	NS	
		0-5	NS	NS	
		0-20	NS	-	
	Ambiente	MD	0-1	NS	NS
			0-3	NS	NS
			0-5	NS	NS
			0-20	S	-
NaOH	0-1	NS	S		
	0-3	NS	S		
	0-5	S	S		
	0-20	S	-		

(NS = No Significativo, S = Significativo, MD = Medio de disolución)

Con el fin de obtener mayores datos sobre el porcentaje de desviación entre las concentraciones, se calcularon los CV y desviaciones estándar (σ) por cada grupo de datos para realizar otra evaluación. Al observar la **tabla XX** se puede afirmar que las muestras deben almacenarse en el medio de disolución, siendo preferible que se mantengan en refrigeración (10°C) y protegidas de la luz. Por otra parte sin importar el tiempo de disolución que se estudie NO es conveniente almacenar las muestras por más de 5 días bajo las condiciones establecidas.

TABLA XX: Resumen de valores de CV % y σ a partir de las concentraciones determinadas para cada condición de almacenaje.

	Tiempo de disolución (horas)	MD _R	NaOH _R	MD _{TA}	NaOH _{TA}	
Al incluir los datos de 20 días de almacén.	1	4.52 0.36	17.71 1.63	3.19 0.25	23.62 2.26	CV% σ
	48	10.60 1.18	19.16 2.50	23.44 2.86	18.08 2.24	CV% σ
	96	1.67 0.24	13.54 2.14	5.44 0.82	8.08 0.38	CV% σ
Sin incluir los datos de 20 días de almacén.	1	1.03 0.081	11.09 0.94	1.77 0.13	15.70 1.35	CV% σ
	48	2.64 0.27	12.02 1.44	3.48 0.37	7.01 6.42	CV% σ
	96	1.21 0.17	2.84 0.43	2.34 0.34	3.35 0.65	CV% σ

MD_R = muestra almacenada en medio de disolución y refrigerada.

NaOH_R = muestra almacenada en NaOH y refrigerada.

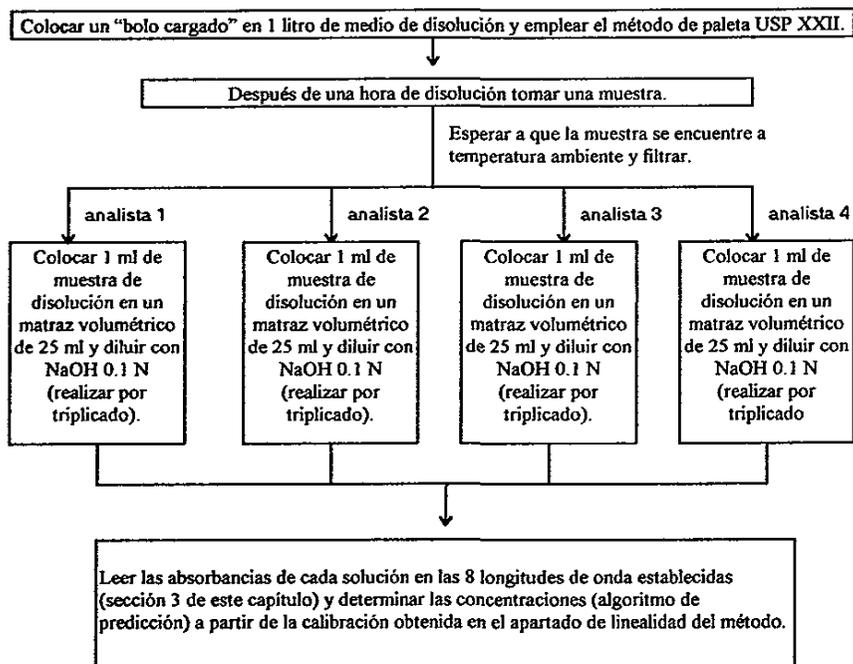
MD_{TA} = Muestra almacenada en medio de disolución y a temperatura ambiente.

NaOH_{TA} = Muestra almacenada en NaOH y a temperatura ambiente.

(3) REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO.

La reproducibilidad se define como el grado de concordancia entre determinaciones repetidas cuando se han introducido variaciones en las condiciones de trabajo. De esta forma se puede evaluar la reproducibilidad entre analistas, equipo, laboratorios, días, etc., por lo cual se requiere que la muestra de la cual se obtienen los datos sea homogénea (por ejemplo, que provengan del mismo lote). En el **diagrama 12** se muestra el procedimiento experimental en forma más detallada.

DIAGRAMA 12: Procedimiento para la determinación de la reproducibilidad del método.
(El procedimiento deben repetirlo los mismos analistas al día siguiente).



Para evaluar las concentraciones determinadas por los diferentes analistas en dos días diferentes (**tabla XXI**) se empleó el ANADEVa a través del Producto Simbólico Simple o Modelo factorial Jerárquico que es comúnmente usado en este tipo de estudios (consultar el **apéndice 1** para su cálculo).

TABLA XXI: Concentraciones determinadas.

Analista.	Conc. Día 1.	Conc. Día 2.	Sumatoria por día 1	Sumatoria por día 2	Sumatoria total por analista
1	14.3599 14.6116 14.5376	17.3888 14.9356 14.7641	43.5093	47.0886	90.5979
2	14.5291 14.5966 14.5931	14.9529 14.9219 14.8212	43.7189	44.6960	88.4149
3	14.9986 15.0500 15.0371	14.5444 14.5156 14.5668	45.0858	43.6269	88.7128
4	15.2974 15.1961 15.120061	15.2244 14.9768 14.9808	45.6136	45.1821	90.7957

Como se observa en la tabla XXII, el valor de F calculada (0.38) es menor que F tabulada (± 7.76), entonces se puede afirmar con un 95 % de confianza que no existe diferencia estadística significativa entre las concentraciones obtenidas por cada analista en diferentes días, por lo que el método es reproducible bajo los factores analizados.

TABLA XXII: Resumen de ANADEV- Modelo Factorial Jerárquico, para un nivel de significancia (α) de 0.05

	gl.	SC.	MC.	F calculada.	F tabulada.
Analista	3	0.7688	0.2562	0.3825	7.76
Día	4	2.6801	0.6700		
Error	16				

(4) ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO.

La especificidad se define como la capacidad del método analítico para obtener una respuesta debida sólo a la sustancia de interés; esta característica del método puede determinarse analizando la respuesta de la sustancia de interés en presencia de los demás componentes de la formulación que no son de interés analítico así como con los posibles productos de degradación (PDD).

En el caso que nos ocupa, no es necesario evaluar las posibles interacciones y o interferencias del analito con los excipientes disueltos pues, como se observa, al estar la SMZ-Na presente en el bolo su respuesta no cambia con respecto a la esperada (evaluación de linealidad del método, adición de SMZ-Na y en la evaluación de precisión y exactitud por adiciones patrón).

Como se mencionó en el capítulo 1 existen 2 posibles productos de degradación de la SMZ los cuales se obtienen en condiciones experimentales extremas: ácido sulfanílico (nombrado como PDD-A) y 2-amino-4,6-dimetil-pirimidina) (nombrado como PDD- B), donde ambos se forman al mismo tiempo por una hidrólisis en la molécula original.

Es conveniente realizar la prueba de especificidad para dar mayor confiabilidad, aunque el medio y la temperatura de disolución no representan condiciones drásticas de experimentación, además el hecho de que el bolo se encuentre por periodos prolongados de tiempo en disolución podría provocar la presencia de estos productos aunque en un porcentaje mínimo por lo que en esta prueba se pretende establecer el porcentaje de productos de degradación bajo los cuales el método no fuese específico.

Los porcentajes de PDD que se estudiaron en este caso fueron: 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 %. Con el fin de evaluar estos porcentajes en conjunto con las diferentes cantidades de SMZ-Na y excipientes disueltos, el estudio se realizó en muestras de 1, 48 y 96 horas de disolución. Debido a ésto las concentraciones de PDD variaron (aunque no cambie la proporción) según la cantidad teórica disuelta de SMZ-Na a cada tiempo de muestreo.

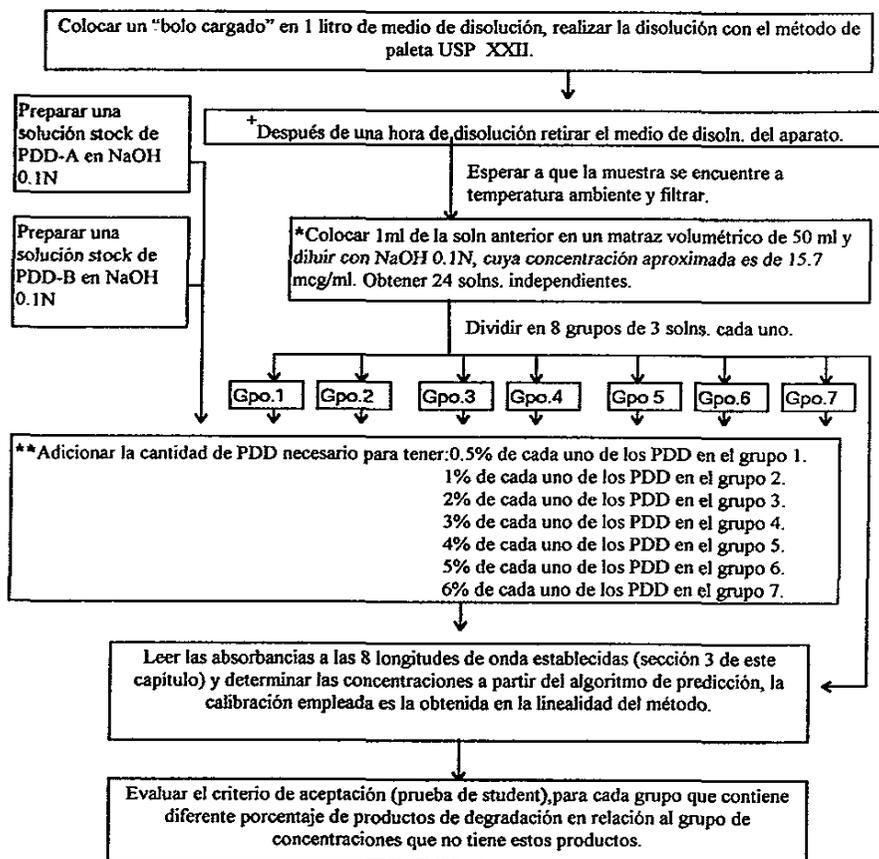
Por ejemplo:

Para una muestra de 48 horas de disolución, con un factor de dilución 1/100 se espera tener una concentración de 8 mcg/ml, entonces en proporción se establece la concentración respectiva para cada porcentaje, posteriormente y en base a pesos moleculares se establece la concentración de los productos de degradación equivalentes.

En el diagrama 13 se observa el procedimiento experimental en forma general.

DIAGRAMA 13: Procedimiento para la determinación de especificidad del método.

† (EL PROCEDIMIENTO SE REPITE PARA TIEMPOS DE DISOLUCIÓN DE 48 Y 96 HORAS)



* Para los tiempos de muestreo de 48 y 96 horas se colocan 0.5 ml de la solución de disolución en un matraz volumétrico de 100 ml.

** Porcentajes respecto a la cantidad de SMZ-Na que se espera se libere del bolo.

Finalmente en la tabla XXIII se muestran los valores obtenidos (por grupo de porcentajes de degradación y tiempos de disolución) para el valor de t calculado según la ecuación:

$$t_{\text{calc.}} = \frac{\bar{X}_{\text{Conc. de sists. con PDD.}} - \mu_{\text{Conc. de sists. sin PDD.}}}{S_{\text{Conc. del sistema con PDD}}}$$

TABLA XXIII: Resultados de concentraciones estimadas y valores de t calculada.

Tiempo de muestreo (horas)	% de degradación total.	Concentración promedio determinada	Desviación estándar muestral	valor de t calculada.	
1	0	7.8940	-	-	
	1	8.0246	0.2223	-0.5874	NS
	2	7.9815	0.0113	-7.7433	S
	4	8.1535	0.1983	3.2324	NS
	6	8.2566	0.0327	11.0880	S
	8	8.2994	0.0176	23.0300	S
	10	8.2165	0.1509	2.1371	NS
	12	8.2327	0.0718	4.7126	S
48	0	10.4139	-	-	
	1	10.4003	0.2600	-0.05	NS
	2	10.3334	0.0214	-3.76	NS
	4	10.3731	0.0805	-0.506	NS
	6	10.4395	0.1266	0.2022	NS
	8	10.4554	0.0759	0.5461	NS
96	0	14.8657	-	-	
	1	14.4692	0.1106	-3.58	NS
	2	14.4615	0.0361	-11.1966	S
	4	14.7035	0.1314	-1.234	NS
	6	14.9698	0.0462	2.2532	NS
	8	14.8746	0.0862	0.1032	NS
	10	15.018	0.04515	-17.82	S
	12	15.1894	0.0871	3.7160	NS

Valor de t tabulada con un nivel de significancia de 0.05 = ±4.3027, g.l.= 3
 NS= No significativa
 S= Significativo

Al analizar los valores de la tabla anterior se observó que cuando ha transcurrido 1 hora de disolución, la presencia del 2, 6, 8 y 12% de PDD provocan desviaciones significativas, sin embargo esta tendencia no es lógica ya que en presencia de 1, 4 y 10% de PDD las desviaciones NO SON SIGNIFICATIVAS. Esta misma tendencia se observó en las muestras de 96 horas de disolución, donde la presencia del 2 y 10% de PDD totales son SIGNIFICATIVAS. por otra parte, en las muestras de 48 horas de disolución NINGUNO de los porcentajes de PDD fueron significativos.

Lo anterior puede deberse a que después de 1 hora de disolución las concentraciones de SMZ-Na son bajas por lo que la presencia de PDD resulta ser muy elevada para las condiciones de la muestra, esto puede haber provocado las desviaciones presentadas; además los volúmenes adicionados de PDD provenían de más de un proceso de dilución lo cual también produce variaciones en la determinación. En este caso también vale la pena señalar que cuando ha transcurrido 1 hora de disolución es poco probable la existencia de PDD y de acuerdo a los resultados la presencia de 1% de PDD NO ES SIGNIFICATIVA.

En el caso de la tendencia observada para las muestras de 96 horas de disolución podemos observar que al tener concentraciones elevadas de SMZ-Na se requieren igualmente proporciones de PDD muy altas, lo cual pudo haber ocasionado las variaciones registradas (valores significativos) dentro del método

Con lo que respecta a las muestras de 48 horas de disolución se puede decir que tanto la concentración de SMZ-Na como la de los PDD se encuentran en un nivel óptimo por lo que la presencia de PDD no es significativa en la cuantificación.

Es recomendable elaborar nuevamente la prueba con un mayor número de muestras para establecer si las variaciones se deben al método estadístico o a la presencia de niveles inadecuados de PDD en el caso de las muestras de 1 y 96 horas de disolución

Conclusiones.



CONCLUSIONES.

Los excipientes del bolo disueltos durante la disolución interfieren en la cuantificación de SMZ-Na al emplear métodos *espectrofotométricos convencionales*; el *modelo empírico* de MCP es una herramienta útil para cuantificar SMZ-Na sin necesidad de emplear un proceso de separación, generar compuestos coloridos característicos del analito o conocer la(s) sustancia(s) interferentes ni su cantidad, por lo que se puede economizar en:

Horas hombre.
Gasto de reactivos.
Tiempo de análisis.

Aunque el método de MCP se considera un método de análisis de espectro completo, demostró ser confiable en este estudio al emplear 8 longitudes de onda características del espectro de SMZ-Na

El método desarrollado para la cuantificación de SMZ-Na liberada de bolos, bajo las condiciones de análisis establecidas en el estudio, es:

- lineal, (con un CV global de 2.93%),
- preciso (en un intervalo de concentración de 5-25 mcg/ml y con un CV global de 2.09%),
- exacto, y
- reproducible (a un nivel de significancia de 0.05, al evaluar la diferencia entre analistas y día),

Las muestras para análisis son estables durante 5 días de almacenaje en el medio de disolución, a 10°C y protegidas de la luz.

Apéndices.



APÉNDICE 1.

FÓRMULAS PARA EL CÁLCULO DEL PRODUCTO SIMBÓLICO SIMPLE O MODELO FACTORIAL JERÁRQUICO.

MODELO $Y_{ijk} = \mu + A_i + D_j(i)$

i = analista, i = 1 a
 j = día, j= 1 d
 k = replica, k = r

$A_i, A = y-1$
 $D_j(i), D=(j-1)i$
 $E_k(ij), E = (k-1)ij$

$Y_{ijk} = \Sigma Y^2$

$SC_A = \frac{(\Sigma Y_i)^2}{dr} - \frac{(Y)^2}{adr}$

$SC_D = \frac{(\Sigma Y_{ij})^2}{r} - \frac{\Sigma Y_i^2}{dr}$

$SC_E = \frac{(\Sigma Y_{ij})^2}{r} - \frac{\Sigma Y_{ij}^2}{r}$

- PSS: Producto Simbólico Simple.
- PSD: Producto Simbólico Derivado.
- gl: grados de libertad.
- SC: Suma de Cuadrados.
- MC: Cuadrado Medio.
- E: error.
- A: Analista.
- D: Día.

	PSS	PSD	gl	SC	MC	Fcalculada
A	i-1	i-1	a-1	SC _A	SC _A /gl _A	MC _A /MC _D
D	(j-1)i	ij-i	(d-1)a	SC _D	SC _D /gl _D	MC _D /MC _E
E	(k-1)ij	ijk-ij	(r-1)ad	SC _E	SC _E /gl _E	

APÉNDICE 2.

(Ruiz S., 1995:57)

FÓRMULAS PARA EL CÁLCULO DE LA DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA (DMS).

Diferencia mínima que podría existir entre dos medias de muestras significativamente diferentes.

MODELO:
$$DMS \pm [t_{(\alpha/2, gl\ error)} ((2CMER/T)^{1/2})]$$

$$SCTR = \left[\frac{(\sum \text{de cada } T)^2}{rT} \right] - C$$

$$C = \frac{(\text{Gran total})^2}{rt}$$

$$SCER = SCTL - SCTR.$$

$$SCTL = (\text{Gran total})^2 - C$$

gl: grados de libertad.

T: tratamientos.

SCTR: Suma de cuadrados del tratamiento.

SCER: Suma de cuadrados del error.

SCTL: Suma de cuadrados total.

E: error.

TL: total.

SC: Suma de cuadrados.

MC: Cuadrado Medio.

Fuente de variación.	gl	SC	CM
T	T-1	SCTR	SCTR/glT
E	(r-1)T	SCER	SCER/glE
TL	rT-1	SCTL	

El valor de t tabulada debe estar dentro del intervalo obtenido para el modelo.

APÉNDICE 3.

(Anderson R., 1987:99,107)

FÓRMULAS PARA EL CÁLCULO DE LA PRUEBA DEL INTERCEPTO.

Establecer que la curva de calibración pasa a través del origen

Ho: a = 0.

$$t = \frac{|a - A|}{S_{yx} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\sum \Lambda^2}{\sum x^2 - (\sum x)^2/n}}}$$

$$S_{yx} = \sqrt{\frac{n-1}{n-2} (Sy^2 - b^2 Sx^2)}$$

 Λ = Media muestral

x = Valores de la variable independiente.

y = Valores de la variable dependiente.

A = 0.

a = Valor del intercepto calculado por regresión.

b = Valor de la pendiente calculada por regresión

S = desviación estándar.

***Referencias Bibliográficas y
Semerográficas.***



REFERENCIAS.

- Amador González E.** (En proceso de publicación) *"Fabricación de un Bolo de Liberación Prolongada con Sulfametazina Sódica para el tratamiento de la coccidiosis en cabras"* TESINA: Especialidades en Farmacia Industrial, UNAM, FES-Cuautitlán, FES-Zaragoza.
- Anderson Robert L.** (1987), *"Practical Statistics for Analytical Chemists"*, Ed. Van Nostrand Reinhold, E.U:A., pp.316.
- Arcos M. Julia,** (1997) *"Genetic-Algorithm-Based Wavelength Selection in Multicomponent Spectrometric Determinations by PLS: Application on Indomethacin and Acemethacin Mixture"*, Analytical Chimica Acta, p.63-77.
- Banakar Umesh V.,** (1992) *"Pharmaceutical Dissolution Testing"* en *"Drugs and the Pharmaceutical Sciences"*, Vol. 49, Ed. Marcel Dekker, USA., pp. 437.
- Banker Gilbert,** (1990) *"Modern Pharmaceuticals"* en *"Drugs and the Pharmaceutical Sciences"*, Vol. 40, 2a. edición, Ed. Marcel Dekker, USA, p. 643-650.
- Berry Ira R.,** *"Pharmaceutical Process Validation"* en *"Drug and the Pharmaceutical Sciences"*, Vol. 57, 2a. edición, Ed. Marcel Dekker INC., pp.602 .
- Blood D.C.,** (1989) *"Veterinary Medicine"*, Ed. Bailliere Tndall, 7a. edición, Inglaterra, pp. 998
- Clark's,** (1986) *"Isolation and Identifications of Drugs"* 2a. edición, Ed. The Press Great Britain, Inglaterra, pp. 1223
- Connors.K,** (1980) *"Curso de Análisis Farmacéutico"*, Ed. Reverte, Barcelona España, pp. 678.
- Eckschlager Karel y Danzer Klaus,** (1994) *"Information Theory in Analytical Chemistry"* en *"Chemical Analisis"*, Vol. 128, Ed. John Wiley and Sons, USA, pp. 275.
- Evrard B., Delattre L.,**(1996) *"In Vitro Evaluation of Lipid Matrices for the Development of a Sustained-Release Sulfametazine Bolus for Lambs"*, Drug Development and Industry Pharmaceutic, 22(2), p. 107-118.
- Evrard B., Delahaet P.,** (1995), *"Biopharmaceutical Aspects of the Development of a Sulfamethazine Oral Sustained Release Bolus for Lambs"*, Journal of Controller Release, Vol. 35, p. 107-115.
- Florey Klaus,** (1978) *"Analitical Profiles of Drug Substances"*, Vol. 7, Ed. Academic Press, E.U., p. 200-420.

Frazier William F., (1976) "Correlation of Absorption of Sulfamethazine Boluses with Dissolution Using a New Dissolution Apparatus for Veterinary Tablets", Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 65 No. 2, diciembre, p.1823-1826.

Geladi Paul, (1986) "Partial Least Square Regression: A tutorial" Analitical Chimica Acta, Vol. 185, p.1-17.

Goodhart Frank W., (1974) "Release of Water Soluble Drug from a Wax Matrix Timed Release Tablet", Journal of Pharmaceutical Sciences, 63(11), p. 1748-1751.

Haaland David M., (1988) "Partial Least Squares Methods for Spectral Analyses. 1. Relation to Other Quantitative Calibration Methods and the Extraction of Qualitative Information", Analitical Chemistry, 60(11),junio, p. 1193-1202.

Haaland David M., (1988) "Partial Least Squares Methods for Spectral Analyses. 2. Application to Simulated and Glass Spectral Data", Analitical Chemistry, 60(11) ,junio, p.1193-1202.

Hagman Anders, (1990) "Applications of Chemometrics for Characterization of Macromolecules", Drug Development and Industrial Pharmacy, 16(17), p.2517-2545.

Harris D.C., (1992) "Análisis Químico Cuantitativo", Ed. Iberoamericana, México, p. 451-473

Haver T.C., (1976) "Numerical Error Analysis of Derivative Spectrometry for the Quantitative Analisis of Mixtures", Analitical Chemistry, 48(2), febrero, p. 312-318.

"Index Merck", (1968) Ed. Merck and Company INC, 8a. edición, Estados Unidos de América, pp. 1712

Lindberg N. O., (1995) "Application of Multivariate Analysis in Pharmaceutical Development Work", Drug Development and Industrial Pharmacy, 21(9), p. 987-1007.

López de Alba P. L., (1996) "Métodos de Calibración Multivariante", Sociedad química de México, 41(1), p. 34-44.

Manual de Validación, (1994) publicado por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos (CNQFB), pp. 73.

Núñez Iracheta Armando, (en proceso de publicación), "Desarrollo y Validación de un Método Analítico para la Cuantificación de Sulfametazina Sódica en Bolos por CLAR", TESIS, UNAM-FES-Cuautitlán.

Kato Yasutomi, (1994) "Sustained Release Mechanisms of Wax Matrix System for Controlled Release", Chem. Pharm. Bull, 42(8), p.1646-1650

Quiroz R.H., (1984) "Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos", Ed.Limusa, México, p. 130,135.

Resendiz T. Laura y García V. Rogelio (En proceso de publicación) *"Determinación Espectrofotométrica de Sulfametoxazol y Trimetoprim por Medio de los Métodos de Razones de Absorbancia y Mínimos Cuadrados Parciales"*, TESIS, FESC-UNAM, Q.F.B.

Riley Christopher M., (1994) *"Pharmaceutical and Biomedical Applications of Liquid Chromatography"* en *"Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis"*, Vol. 1, Ed. Pergamon, Gran Bretaña, p. 313-367.

Robinson Joseph R., (1987) *"Controlled Drug Delivery"*, en *"Drugs and the Pharmaceutical Sciences"*, Vol. 29, 2a. edición, Ed. Marcel Dekker, USA.

Rodriguez Barron G., (1997) *"Espectrofotometría de Derivadas en la Determinación de Cafeína en Productos de Café"*, TESIS QFB, UNAM-FESC, Estado de México, pp. 71.

Rohrs Brian R., (1995) *"USP Dissolution Apparatus 3 (Reciprocating Cylinder): Instrument Parameter Effects on Drug Release from Sustained Release Formulations"*, Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 84, No. 8, agosto, p. 922-926.

Ruiz Silva Ana María, (1995), *"Estudio Comparativo de Perfiles de Disolución de Productos Farmacéuticos que Contienen Ibuprofeno como Fármaco"*, TESIS, UNAM-FESC, QFB, pp. 69.

Skoog, D.A., (1986) *"Análisis instrumental"* 2a. edición, Ed. Interamericana, México, p.806.

Skoug J. W., (1996) *"Estrategias Para el Desarrollo y Validación de Pruebas de Disolución para Formas Sólidas Orales"*, Pharmaceutical Technology (En Español), diciembre, p. 8-15.

United States Pharmacopea XXII, (1990) Ed. United State Pharmacopeial Convention INC., U.S.A., pp. 2067.

Wennergren Bo, (1989) *"A Collaborative in Vitro Dissolution Study: Comparing the Flow-Through Method with the USP Paddle Method Using USP Prednisone Calibrator Tablets"*, International Journal Of Pharmaceutics, 53, p. 35-41.

Willard Hobart H., (1991) *"Métodos Instrumentales de Análisis"*, Ed. Grupo Editorial Iberoamericana, México, pp. 880.

Won Jun H., (1997) *"Las Funciones de los Sistemas de Liberación de Fármacos en la Farmacoterapéutica"*, Pharmaceutical Technology (En español), enero-marzo, p.15-19.