

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA**

**“VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA DE  
LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR) PARA CUANTIFICAR UN  
AINE, EL  $C_{19}H_{23}N_3O$ , EN UNA SOLUCIÓN OROFARÍNGEA “**

**TESIS:**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**BERENICE MALINATZI VILLANUEVA ACOLT**

**MÉXICO, D.F.**

**2006**



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.

Jurado asignado:

Presidente: Prof. MARÍA DEL SOCORRO ALPIZAR RAMOS  
Vocal: Prof. RICARDO RODRÍGUEZ SAENZ  
Secretario: Prof. RAÚL LUGO VILLEGAS  
1er. Suplente: Prof. IVAN ALEJANDRO FRANCO MORALES  
2º. Suplente : Prof. KENNETH RUBIO CARRASCO

Lugar en donde se desarrolló el tema:

Boehringer Ingelheim Promeco  
Calle Maíz No 49 Barrio Xaltocán  
Xochimilco, México D.F.

Asesor del tema:

\_\_\_\_\_  
M.EN C. Maria del Socorro Alpizar Ramos

Supervisor técnico :

\_\_\_\_\_  
Q.B.P Homero Flores

Sustentante :

\_\_\_\_\_  
Berenice Malinatzi Villanueva Acolt

DEDICO ESTA TESIS ESPECIALMENTE A:

A MIS PADRES

**BLANCA Y ARTURO**

POR QUE SIEMPRE ESTUVIERON A MI LADO, DANDOME SU APOYO Y ENSEÑANDOME CON SU EJEMPLO QUE CON AMOR, PERSEVERANCIA Y ESFUERZO PODEMOS LOGRAR NUESTROS OBJETIVOS. POR QUE NADIE VA A VIVIR ESTE MOMENTO DE VER MI TESIS TERMINADA CON MAYOR ALEGRIA QUE ELLOS. "VA POR USTEDES"

A MIS HERMANOS

**VANESSA, ARTURO Y SANTINO**

POR CREER SIEMPRE EN MI Y HABERME DADO SU AMOR DE MANERA INCONDICIONAL.

**A MI TIA MARTHA (MAMA MARTHA)**

POR ESTAR PRESENTE EN TODOS LOS MOMENTOS IMPORTANTES EN MI VIDA.

A MI HIJO

**ERIC**

POR SER EL MOTIVO PRINCIPAL QUE ME IMPULSA A INTENTAR SER MEJOR CADA DIA Y POR QUE MUCHAS DE LAS HORAS AQUÍ INVERTIDAS SE LAS HE ROBADO A EL.

## AGRADECIMIENTOS

### **A TODA MI FAMILIA:**

QUE DE UNA U OTRA FORMA PUSIERON SU GRANITO DE ARENA CONTRIBUYENDO A LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

### **A MIS MAESTROS:**

POR TODAS SUS ENSEÑANZAS Y CONOCIMIENTOS COMPARTIDOS; EN ESPECIAL A LA PROFESORA MARIA DEL SOCORRO ALPIZAR POR SU PACIENCIA, PERMANENTE DISPOSICIÓN Y SU DESINTERESADA AYUDA PARA ACLARAR MIS DUDAS.

### **AL PERSONAL DE BOEHRINGER-INGELHEIM-PROMEKO:**

POR TODO EL APOYO QUE ME BRINDARON PARA PODER TERMINAR ESTE PROYECTO. EN ESPECIAL AL Q.B.P. HOMERO FLORES POR SUS SUBSTANCIALES SUGERENCIAS DURANTE LA REDACCION DE ESTA TESIS.

### **A MIS AMIGOS:**

POR TODOS AQUELLOS MOMENTOS DE CONVIVENCIA, POR DEPOSITAR SU CONFIANZA EN MI, POR SUS ENSEÑANZAS EN EL TERRENO DE LA VIDA, POR SOPORTAR MIS EXABRUPTOS...EN FIN POR SU AMISTAD, SOLO ME RESTA DECIRLES DE CORAZON "UN MILLON DE GRACIAS"

*CON LA ALEGRIA DE LLEGAR A LA RECTA FINAL, DESEO DEJAR CONSTANCIA DE MI AGRADECIMIENTO A TODAS Y CADA UNA DE LAS PERSONAS QUE DE UNA U OTRA FORMA HAN AYUDADO A QUE ESTO FUERA UNA REALIDAD.*

<b>ÍNDICE</b>	<b>PAGINA</b>
Capitulo 1 Objetivo general y objetivos específicos	05
Capitulo 2 Introducción	06
Capítulo 3 Generalidades	09
3.1. AINE	09
3.1.1. Efectos adversos de los AINEs	09
3.1.2. Mecanismo de acción de los AINEs	09
3.2. Monografía del principio activo de interés	11
3.2.1 Propiedades Químicas del $C_{19}H_{23}N_3O$	11
3.2.2. Propiedades Físicas del $C_{19}H_{23}N_3O$	11
3.2.3. Usos	12
3.2.4. Especialidades y formas Farmacéuticas	12
3.2.5. Efectos adversos	12
3.2.6. Propiedades Farmacológicas	13
3.3. Soluciones	15
3.3.1. Definición de solución	15
3.3.2. Propiedades de las soluciones	15
3.3.3. Tipos de soluciones	16
3.3.4. Consideraciones para la formulación de soluciones	16
3.3.5. Tipos de soluciones farmacéuticas	25
3.4 Validación de Métodos analíticos	29
3.4.1. Cromatografía	29
3.4.2. Clasificación de los métodos cromatográficos	29
3.4.2.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución CLAR	31
3.4.3. Parámetros cromatográficos	31
3.4.4. Instrumentación	34
3.4.5. Validación de métodos analíticos	36
3.4.5.1. Clasificación de los parámetros de validación	38
Capitulo 4 Desarrollo Experimental	41
Diagrama de flujo de actividades	41
4.1 Protocolo de validación	42
4.1.1. Parámetros de validación	42
4.1.1.1. Materiales, equipos y reactivos	42
4.1.2. Condiciones Cromatográficas	43
4.1.2.1. Procedimiento de identificación	43

4.1.2.2. Parámetros de operación	43
4.1.3. Preparación de soluciones	43
4.2. Especificidad	44
4.3. Linealidad del sistema	45
4.4. Exactitud	47
4.5. Presición y precisión intermedia	47
4.5.1. Presición (repetibilidad)	47
4.5.2. Presición intermedia	48
4.6. Tolerancia	48
4.6.1. Cambio en polaridad de fase móvil	48
4.6.2. Tolerancia a cambio de equipo	49
4.7. Estabilidad de estándares y muestras	50
4.8 Limite de detección y cuantificación	50
4.8.1. Limite de detección	53
4.8.2. Limite de cuantificación	53
Capitulo 5 Resultados, análisis de resultados y conclusiones	54
5.1. Especificidad	54
5.2. Linealidad del sistema	62
5.3. Exactitud	63
5.4. Precisión y Precisión Intermedia	64
5.4.1. Precisión	64
5.4.2. Precisión intermedia	65
5.5. Limite de detección y cuantificación	66
5.5.1. Limite de detección	66
5.5.2. Limite de cuantificación	66
5.6. Tolerancia	69
5.6.1. Cambios en la polaridad de la fase móvil	69
5.6.2. Estabilidad de estándares y muestras	73
5.6.3. Tolerancia a cambio de equipo	75
Resumen de validación de método analítico	76
5.7. Análisis de resultados	78
5.7.1. Especificidad y selectividad	78
5.7.2. Linealidad del sistema	78
5.7.3. Exactitud	79
5.7.4. Precisión y Precisión intermedia	80
5.7.4.1. Precisión	80

5.7.4.2. Precisión intermedia	80
5.7.5. Limite de detección y Limite de cuantificación	80
5.7.6. Tolerancia	80
5.7.6.1. Cambio en la proporción de la fase móvil	80
5.7.6.2. Cambio de Equipo	80
5.7.6.3 Estabilidad de estándares y muestras	80
5.8. Adecuabilidad	80
5.9. Conclusiones	81
Capitulo 6 Bibliografía	82

## Lista de figuras

Figura 1 Caracterización de la enzima COX-1	10
Figura 2 Caracterización de la enzima COX-2	10
Figura 3 Formula desarrollada del $C_{19}H_{23}N_3O$	11
Figura 4 Representación de número de moléculas eluidas con respecto al tiempo	31
Figura 5 Componentes de un CLAR	34
Figura 6 Flujo de actividades	41
Figura 7 Blanco	54
Figura 8 Fase móvil	55
Figura 9 Estándar	55
Figura 10 Placebo + Estándar + AF1259	56
Figura 11 Placebo + Estándar + AF956	56
Figura 12 Placebo + Estándar + AF1346	56
Figura 13 Placebo + Estándar + AF1086	57
Figura 14 Placebo + Estándar + AF1316	57
Figura 15 Placebo + Estándar + AF2973	57
Figura 16 Placebo + Degradaciones	58
Figura 17 Placebo + Estándar + Degradaciones	58
Figura 18 Muestra + AF1259	58
Figura 19 Muestra + AF956	59
Figura 20 Muestra + 1088	59
Figura 21 Muestra + AF1346	59
Figura 22 Muestra + AF1316	60
Figura 23 Muestra + AF2973	60
Figura 24 Muestra + Degradaciones	60
Figura 25 Blanco	66
Figura 26 Cromatograma del Límite de detección.	67
Figura 27 Cromatograma del Límite de cuantificación	68
Figura 28 Fase móvil (+ 50mL de fase orgánica )	70
Figura 29 Estándar (Fase móvil :+50mL de fase orgánica)	71
Figura 30 Muestra (Fase móvil:+50mL de fase orgánica)	71
Figura 31 Fase móvil: - 50 mL de fase orgánica	71



Figura 32 Estándar (Fase móvil: + 50mL de fase orgánica)	72
Figura 33 Muestra (Fase móvil: - 50 mL de fase orgánica)	72
Figura 34 Gráfica de Linealidad del Sistema	78

#### Lista tablas

Tabla 1 Productos de degradación	13
Tabla 2 Composición del producto	14
Tabla 3 Clasificación de métodos analíticos por categorías	37
Tabla 4 Listado de materiales , equipos y reactivos	42
Tabla 5 Condiciones de operación	43
Tabla 6 Resultados de Especificidad	61
Tabla 7 Resultados de Linealidad del $C_{19}H_{23}N_3O$	62
Tabla 8 Resultados de Exactitud del $C_{19}H_{23}N_3O$	63
Tabla 9 Resultados de Precisión	64
Tabla 10 Resultados de Precisión intermedia del $C_{19}H_{23}N_3O$	65
Tabla 11 Resultados Crudos de Cambios en la proporción de la fase	69
Tabla 12 Resumen resultados en cambios proporción fase móvil	70
Tabla 13 Resultados de Estabilidad de estándares $C_{19}H_{23}N_3O$	74
Tabla 14 Resultados de Estabilidad de muestras $C_{19}H_{23}N_3O$	75
Tabla 15 Resultados de Comparación entre equipos	76

## **CAPITULO 1**

### **OBJETIVO GENERAL**

Validar el método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para cuantificar un antiinflamatorio no esteroideo ( AINE) , el  $C_{19}H_{23}N_3O$ , en una solución oro faríngea.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- ✓ Realizar el montaje del método analítico por CLAR en los Laboratorios Boehringer-Ingelheim – Promeco.
- ✓ Identificar y controlar, si es el caso, las variables instrumentales o de método que determinen la estabilidad y optimización del método analítico.
- ✓ Determinar de manera experimental y para las condiciones del laboratorio, los valores de los parámetros analíticos que servirán como criterios de confianza para la determinación del el  $C_{19}H_{23}N_3O$ , en una solución oro faríngea por CLAR; tales parámetros de validación son linealidad, especificidad y selectividad, límite de detección y límite de cuantificación, exactitud, precisión, y Tolerancia.
- ✓ Generar el registro documental de los resultados obtenidos en los ensayos de cada prueba, así como los informe final de la validación del método, con el fin de que el laboratorio pueda demostrar mediante el aporte de evidencia objetiva que se cumplen los requisitos particulares para el uso específico del método.

## CAPITULO 2

### INTRODUCCION

En las últimas décadas la industria farmacéutica ha avanzado continuamente en el desarrollo de nuevos medicamentos, lo que conlleva a la implementación de nuevos métodos analíticos para asegurar la calidad intrínseca de los productos. A su vez, una de las preocupaciones más importantes para la mayoría de las industrias, es cumplir con las normas de regulación sanitaria establecidas por cada país en donde se produzca, empaque y/o venda el producto. Por lo que en la actualidad es necesario contar con métodos analíticos validados. Pero definamos primero a que se refiere el término validación; el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos define validación como “ el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada” . La NOM 073-SSA1-2005, “Estabilidad de fármacos y medicamentos”, define validación como: “Evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y atributos de calidad establecidos”. Es decir que cualquier método analítico que se presuma validado debe comprobar que es confiable y debe certificar, con evidencia documentada, que se desarrolla consistentemente de manera eficaz, segura y reproducible; es decir, que cumplen con los propósitos para los cuales fueron diseñados.

La validación se realiza llevando a cabo una serie de experimentos en los que se emplean unas condiciones específicas del método. Ello implica la evaluación de un número de parámetros tales como especificidad, exactitud, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), linealidad, límites de detección y cuantificación y tolerancia.

En la época actual, con la globalización en todos los niveles, la armonización en los criterios y parámetros para la validación de métodos analíticos es muy importante, ya que facilita la homogenización en transacciones comerciales y en la transferencia de tecnología de un laboratorio a otro; es por ello que la Food and Drug Administration (FDA), bajo los auspicios de la International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH) ; publicó una guía en marzo de 1995 para la validación de métodos analíticos, la cual nos provee de los requisitos mínimos necesarios que deben ser considerados para la validación de un método analítico; dependiendo de la clasificación y características del mismo.

La validación de un método analítico es de suma importancia por lo que es necesario aplicarla de manera consistente, ya que forma parte del sistema de aseguramiento de la calidad y es requisito de las buenas prácticas de manufactura.

En nuestro país existen tres normas regulatorias que nos exigen contar con métodos analíticos validados, la NOM-059-SSA1-2004, “Buenas Prácticas de fabricación para establecimientos de la industria Química Farmacéutica dedicado a la fabricación de medicamentos” , en los incisos 14.1, 14.2 y 14.3; así como la NOM 073-SSA1-2005,

“Estabilidad de fármacos y medicamentos”, en sus incisos 5.3,6.3, y 7.3, y la NOM-164-SSA1-1998 , “ Buenas prácticas de fabricación para Fármacos”, en el inciso 20, las cuales nos indican que es indispensable contar con métodos analíticos validados que nos aseguren que el producto cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado y con los atributos de calidad establecidos. Es por ello que es de primordial importancia validar cualquier método analítico empleado y aunque en ocasiones puede ser una tarea tediosa, las consecuencias de no hacerlo se traducen, a la larga, en una pérdida de tiempo, dinero y recursos que ninguna empresa desea enfrentar.

Las infecciones agudas de las vías respiratorias constituyen una de las enfermedades más comunes en el mundo; por lo que son la causa más importante de consulta médica y por lo tanto constituyen un problema grave de salud pública. Son asimismo la primera causa de muerte en niños menores de cinco años, estimándose al menos en países en vías de desarrollo que ocasionan hasta cuatro millones de muertes cada año.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en promedio, un niño en un área urbana tiene de cinco a ocho episodios de infección respiratoria aguda (IRA) anualmente, con una duración promedio de siete a nueve días. La mayoría de ellas corresponden a infecciones de las vías respiratorias superiores, las cuales son de menor gravedad, aunque no por eso dejan de ser causa de ausentismo escolar y laboral, además de las molestias físicas que producen. En áreas rurales, la incidencia parece ser menor, no obstante se considera que de 7 a 10% de todos los niños menores de cinco años desarrolla IRA grave o moderada durante un año.

En México se estima que ocurren 280 millones de IRA al año, de los cuales se sabe que la incidencia en niños de 1 a 4 años es de siete episodios al año y en niños de 5 a 14 años de cuatro episodios. En las comunidades rurales esta frecuencia es mucho menor y apenas alcanza dos a tres episodios de IRA en niños menores de 5 años, siendo aún menor en niños mayores según algunos estudios.

Una de las infecciones más frecuentes de las vías respiratorias corresponde a la faringoamigdalitis aguda siendo la infección más común de origen bacteriano; se define como un síndrome inflamatorio de la faringe causado por varios grupos de microorganismos. El término faringoamigdalitis se utiliza en medicina para referirse a la infección de faringe y amígdalas; las cuales presentan inflamación y dolor en la garganta al deglutir, anginas rojas y/o con manchas blancas, fiebre elevada, etc.

Entre las enfermedades en las cuales el uso del  $C_{19}H_{23}N_3O$  en solución oro faríngea esta indicado se encuentran las infecciones en vías respiratorias altas ( laringe, faringe, amígdalas), en las cuales el efecto local que produce ayuda a reducir muchas de las sintomatologías que presentan y que fueron numeradas en el párrafo anterior ; entre los padecimientos en los cuales el uso del  $C_{19}H_{23}N_3O$  esta indicado se encuentran los siguientes: Faringitis aguda, faringitis crónica hipertrófica, amigdalitis aguda, herida en paladar o faringe, faringoamigdalitis, entre otras; ya que ayuda a disminuir la inflamación, el dolor y proporciona un efecto antiséptico contra diversos hongos y bacterias; su

actividad histoprotectora aumenta la resistencia del epitelio bucofaríngeo hacia los agentes patógenos.

Por todo lo anterior el Laboratorio Boehringer Ingelheim Promeco desarrolló un método analítico para cuantificar el  $C_{19}H_{23}N_3O$  en solución oro faríngea. Dado que este método no es farmacopeico, se llevo a cabo el presente trabajo que tuvo como principal objetivo la validación de un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), para la cuantificación de un antiinflamatorio no esteroide (AINE), el  $C_{19}H_{23}N_3O$ , en una solución oro faríngea.

## CAPITULO 3

### GENERALIDADES

#### **3.1. AINE** <sup>(3,4,5,6)</sup>

Los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) constituyen uno de los grupos de medicamentos más prescritos ya que presentan una variedad de indicaciones terapéuticas y además, a diferencia de los opiáceos, estos no producen sedación, depresión respiratoria o adicción.

Forman un grupo de ácidos orgánicos no relacionados entre sí que tiene propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas. Los AINE son inhibidores de la enzima ciclooxigenasa, de forma que inhiben directamente la biosíntesis de prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico. Existen 2 formas de ciclooxigenasa, la COX-1, que es la forma constitutiva de la enzima y la COX-2 que es la forma inducida cuando hay inflamación. La inhibición de la COX-2 es la causa de al menos una de las propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas de los AINE, mientras que la inhibición de la COX-1 origina algunos de los efectos tóxicos, principalmente los gastrointestinales.

Los AINE se administran para aliviar el dolor leve o moderado, los estados febriles leves y los trastornos inflamatorios agudos y crónicos.

#### **3.1.1. Efectos adversos de los Aines** <sup>(4,5)</sup>

Los efectos adversos más frecuentes que se presentan durante la administración de los AINE suelen ser trastornos gastrointestinales, que generalmente son débiles y de carácter reversible.

Los efectos sobre el sistema nervioso central consisten en cefalea, vértigo, mareos, nerviosismo, acúfenos, depresión, somnolencia e insomnio. Ocasionalmente pueden presentarse reacciones de hipersensibilidad con fiebre, angioedema, broncoespasmo y exantemas. Algunos pacientes pueden presentar trastornos visuales.

Los efectos adversos hematológicos de los AINE consisten en anemia, trombopenia, neutropenia, eosinofilia y agranulocitosis.

El uso prolongado o el abuso de los AINEs pueden ocasionar la aparición de neuropatías.

#### **3.1.2. Mecanismo de acción de los Aines** <sup>(6,7)</sup>

Hoy día se sabe que los AINE tienen un mecanismo de acción a nivel enzimático donde inhiben la producción de prostaglandinas, mediante la acción directa sobre las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2). Adicionalmente, algunos de ellos inhiben la lipooxigenasa y bloquean la producción de leucotrienos, también se sabe que inhiben la producción de tromboxanos.

Las prostaglandinas y los leucotrienos se liberan en respuesta a agresiones mecánicas, térmicas, químicas, bacterianas y otras y contribuyen de forma importante a la patogenia de la inflamación.

## Isoformas de la enzima ciclooxigenasa (COX)

Como ya se menciono anteriormente, existen dos isoformas de la enzima ciclooxigenasa, las cuales presentan notables características diferenciales. La ciclooxigenasa 1 (COX-1), esta presente en casi todos los tejidos. En 1971, Vane (4) propuso que el mecanismo de acción de los AINES inhiben la conversión del ácido araquidónico al intermediario endoperóxido inestable, prostaglandina G2 (PGG2), una reacción que es catalizada por la enzima ciclooxigenasa.

Por otra parte la COX-2, que es indetectable en la mayoría de los tejidos, es una isoforma inducida que puede ser expresada prácticamente en cualquier célula o tejido como respuesta a citocinas proinflamatorias, promotores tumorales o factores de crecimiento.

La caracterización de la estructura tridimensional de estas enzimas (Figura 1), han permitido conocer más profundamente el mecanismo de acción de los AINE. Se conoce que estos fármacos compiten con el ácido araquidónico, liberado en la respuesta inflamatoria, para acoplarse al sitio activo en los canales enzimáticos (Figura 2).

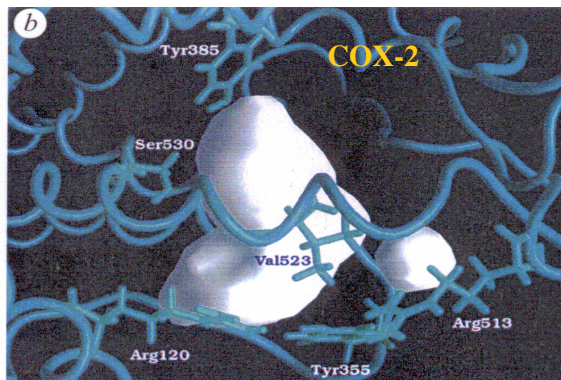
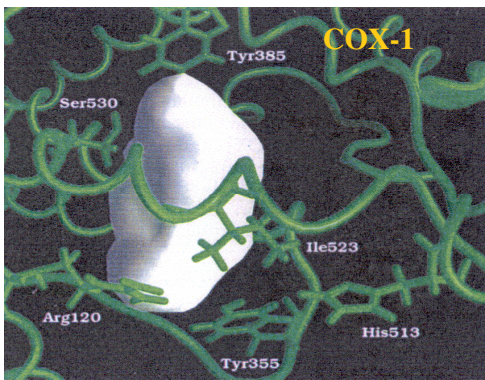


Fig. 1 Caracterización de la enzima (COX-1)

Fig. 2 Caracterización de la enzima COX-2

Nature Structural Biology, vol 3, number 11, 1996

## 3.2. MONOGRAFIA DEL PRINCIPIO ACTIVO DE INTERES: $C_{19}H_{23}N_3O$

### 3.2.1. Propiedades Químicas del $C_{19}H_{23}N_3O$ (1,2, 7)

#### NOMENCLATURA QUÍMICA:

IUPAC: 3-(1-benzylindazol-3-yl)oxy-N,N-dimethyl-propan-1-amine

#### FORMULA CONDENSADA:

$C_{19}H_{23}N_3O$

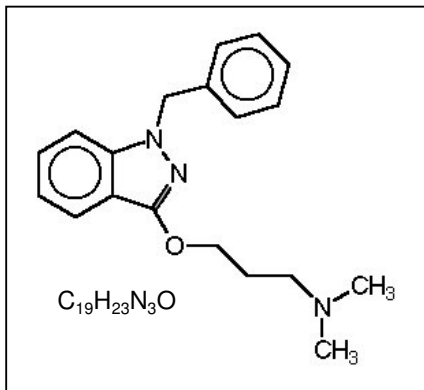


Fig. 3 FORMULA DESARROLLADA

Coeficiente de Extinción:

E 1% 1 cm. : 160 a  $\lambda = 360$  nm

**3.2.2. PROPIEDADES FÍSICAS DEL  $C_{19}H_{23}N_3O$  <sup>(1,2)</sup>**

ASPECTO:

Polvo cristalino, blanco, inodoro, con sabor amargo.

Punto de fusión: Aprox. 160 °C

SOLUBILIDAD:

1:1 en agua

1:8 en etanol

1:4 en cloroformo

Muy poco soluble en octano, aceite de oliva y benceno

Prácticamente insoluble en éter

**3.2.3 Usos <sup>(2,3)</sup>**

El  $C_{19}H_{23}N_3O$  en solución oro faríngea presenta las siguientes acciones:

- a) Inhibe la inflamación primaria
- b) Controla la permeabilidad vascular y estabiliza las membranas celulares. Combate las manifestaciones hemáticas y vasculares de la inflamación como rubor, calor y edema
- c) Posee efectos analgésicos y anestésicos locales, que permiten controlar el dolor de las afecciones inflamatorias estomatológicas y oro faríngeas.
- d) Reduce la hiperemia local provocada por la inflamación de la mucosa bucal y faríngea.
- e) Presenta una acción antiséptica sobre diversos hongos y bacterias. Además, por su actividad histoprotectora aumenta la resistencia del epitelio bucofaríngeo hacia los agentes patógenos.



### **3.2.4. ESPECIALIDADES Y FORMAS FARMACÉUTICAS DEL C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sup>(3)</sup>**

Crema  
Enjuague bucal  
Solución oro faríngea  
Gel

Especialidades farmacéuticas simples

Tantum verde  
Difflam  
Afloben  
Bucco-tantum  
Lonol  
Vantal

### **3.2.5. EFECTOS ADVERSOS<sup>(3, 4,5)</sup>**

Entre los más frecuentes se encuentran los efectos gastrointestinales producidos tanto por la acción directa del medicamento sobre la mucosa como por su efecto sistémico; sin embargo estos efectos son poco frecuentes.

Ocasionalmente pueden producirse reacciones de fotosensibilidad, eritema local moderado, dermatitis, irritación local, picor en el punto de aplicación, sensación de adormecimiento o parestesias en la mucosa oral que desaparecen al suspender el tratamiento.

### **3.2.6. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS<sup>(1, 3, 4, 5, 8,9, 10)</sup>**

Dosis:

La vía de administración es bucal, ya sea enjuague, gargarismo o mediante nebulizaciones.

DOSIS LETAL 50:

La dosis letal 50 en ratones y ratas de laboratorio (mg/kg) : 515, 1050 vía oral, respectivamente.

FARMACOCINÉTICA:

En dosis oral, aparentemente es bien absorbida, presenta una concentración en plasma de 0.8 µg/ml después de una dosis de 100mg. Presenta una vida media de 13 hrs.

FIJACIÓN A PROTEÍNAS:

Menos del 20% del C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O se liga a las proteínas de la sangre.

METABOLISMO:

Las vías metabólicas principales son: la eliminación del grupo dimetilaminopropilo, la eliminación del grupo benzyl, desmetilación, N-oxidación, y la hidroxilación del anillo de benceno. Es excretado en forma de glucurónidos.

PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN

<b>Nombre del compuesto</b>	<b>Clave</b>
1-benzyl-3-hydroxy-1H-indazole	AF 956
1-benzyl-2-3-(3-dimethylaminopropyl)-1,2-dihydro-3H-indazol-3-one, hydrochloride	AF 1088
2-benzylaminobenzoic acid, 3-dimethylaminopropylester, hydrochloride	AF 1259
2-aminobenzoic acid, 3-dimethylaminopropylester, hydrochloride	AF 1316
1-benzyl-3-[3-(3-dimethylaminopropyl)-3-methylaminopropoxy]-1H-indazole, dihydrochloride	AF 1346
N,N-dimethyl-3-{ [1,5-(dibenzyl)-1H-indazol-3-yl] oxy } -1-propanamine, hydrochloride	AF 2973

Tabla 1 Productos de degradación

Composición del producto

Tabla 2 Composición del Producto

	Cada g/100 mL de solución contienen
PRINCIPIO ACTIVO:	
C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O	0.15
EXCIPIENTES:	
Humectante	5.005
Vehículo	94.68
Corrector de pH	0.011
Edulcorante	0.024
Conservador	0.100
Saborizante	0.030

### **3.3. SOLUCIONES**

#### **3.3.1. DEFINICIÓN**

Una solución es una

#### **SOLUCIÓN <sup>(11)</sup>**

mezcla homogénea

(una sola fase) de dos o más componentes en la cual uno de ellos es usualmente un fluido. Un fluido es un material que fluye, como un líquido o un gas. El fluido de la solución es usualmente llamado solvente. El otro material incluido en la solución es llamado soluto.

#### **3.3.2. PROPIEDADES DE LAS SOLUCIONES <sup>(11,12,13)</sup>**

Las soluciones que tienen como solvente a un líquido presentan las siguientes propiedades:

1. Las partículas del soluto son de un tamaño individual de moléculas pequeñas o de iones individuales pequeños. Un nanómetro es aproximadamente el diámetro máximo para las partículas del soluto.
2. La mezcla no se separa aún en reposo. En un medio gravitacional la solución no debe presentar ninguna diferencia en la densidad de los materiales en la solución.
3. La mezcla no se separa por una filtración en filtros de fibra. La solución entera debe pasar a través del filtro.
4. Una vez que la mezcla es completada, esta es homogénea. Si tomas una porción de la solución de cualquier punto en la solución, la proporción de los materiales es la misma.
5. La mezcla es clara o ligeramente turbia. Puede presentar una coloración, pero debe ser transparente. La mezcla no presenta el efecto Tyndall; es decir la luz es dispersada por la solución.

6. El soluto esta completamente disuelto en la solución hasta un punto característico del solvente, soluto y temperatura. Después del punto de saturación, el solvente no logra disolver más soluto. Si existe un punto de saturación, este es distinto y característico del tipo de materiales y de la temperatura de la solución.
7. La solución de un material iónico en agua produce una solución electrolítica. Los iones del soluto son separados en el agua y permiten que la solución presente una corriente eléctrica.
8. La solución muestra un incremento en la presión osmótica entre ella y una solución de referencia conforme la cantidad de soluto es incrementada.
9. La solución muestra un incremento en su punto de ebullición conforme la cantidad del soluto es incrementada.
10. El agregado de un soluto a un solvente, en general, desciende el punto de solidificación del solvente.
11. La solución de un sólido no volátil en un líquido presenta un decremento en la presión de vapor a medida que la cantidad de soluto incrementa en la solución.

Las últimas 4 propiedades de las soluciones son llamadas, "propiedades coligativas". Estas características son todas dependientes solamente del número de partículas de soluto, más que del tipo de partículas o masa del material, en la solución.

Además de las propiedades coligativas, se encuentran las propiedades aditivas y constitutivas, y en el campo de la termodinámica las propiedades físicas de las soluciones son clasificadas como extensivas., las cuales dependen de la cantidad de material en el sistema (masa y volumen) y las propiedades intensivas, las cuales son independientes de la cantidad de sustancias en el sistema (ejemplo: temperatura, presión, densidad, tensión superficial, viscosidad y pureza del líquido).

Las propiedades aditivas dependen de la distribución total de los átomos en las moléculas o de la suma de las propiedades de los constituyentes en solución. Un ejemplo de una propiedad aditiva de un componente es el peso molecular, que es, la suma de las masas de los átomos que lo constituyen.

Las masas de los componentes de una solución son también aditivas, la masa total de la solución resulta ser la suma de las masas de los componentes individuales.

Las propiedades constitutivas dependen del arreglo y de manera menos extensa del número y tipo de átomos dentro de la molécula. Muchas propiedades físicas pueden ser parte aditivas y en parte constitutivas. La refracción de la luz, propiedades eléctricas, características de apariencia e interfaciales, la solubilidad de los fármacos, son en parte propiedades constitutivas y en parte propiedades aditivas.

### **3.3.3. TIPOS DE SOLUCIONES** <sup>(11,12)</sup>

Generalmente se piensa en una solución como un líquido; una mezcla de gases, líquido o un sólido disueltos en un solvente líquido. Actualmente, pueden existir soluciones de gases y sólidos. Las mezclas gaseosas no requieren de una consideración especial más allá de la ley de Dalton. Soluciones sólidas son muy comunes; muchos de las aleaciones de minerales naturales son soluciones sólidas.

En términos farmacéuticos una solución es una mezcla homogénea que es preparada disolviendo un sólido, líquido o gas, en otro líquido y representa un grupo de preparaciones en las cuales las moléculas de un soluto o una sustancia disuelta se encuentran dispersas entre un solvente.

El uso oral de las soluciones o líquidos farmacéuticos está justificado en base a la facilidad en la administración, así como también en la disponibilidad para ser absorbida. En muchos de los casos, es más rápida y eficientemente absorbida que la misma cantidad de fármaco que se encuentre en tableta o cápsula.

La formulación de soluciones presenta muchos problemas técnicos en la industria Farmacéutica, entre ellos se encuentra el hecho de que muchos fármacos son poco solubles por lo que es necesario técnicas especiales para lograr solubilizarlos para obtener una solución. La preparación final debe satisfacer ciertos requerimientos farmacéuticos de elegancia con respecto al sabor, apariencia y viscosidad.

### **3.3.4. CONSIDERACIONES PARA LA FORMULACIÓN DE SOLUCIONES (11)**

#### **SOLUBILIDAD**

La solubilidad de una sustancia así como el grado de solubilización de la misma en un sistema dado depende principalmente de la naturaleza e intensidad de las fuerzas presentes en el soluto, el solvente, y de la interacción resultante entre soluto-solvente; así como también de factores estéricos y de las fuerzas eléctricas presentes en el soluto-solvente. La solubilidad de las sustancias en varias clases de solventes han sido perfectamente aclarados por Martin et. al., entre los principales factores que describe se encuentran los siguientes:

A) pH: Un gran número de modernos agentes químico-terapéuticos son ácidos o bases débiles. La solubilidad de estos agentes está marcadamente influenciada por el pH de su entorno. A través de la aplicación de la ley de acción de masas puede predecirse la solubilidad de un ácido o base débil, como una función del pH, de una manera precisa, por medio de una serie de ecuaciones. Para muchos fármacos, un pH adecuado no proporciona un apropiado medio para obtener una solución. En el caso de ácidos o bases débiles, el pH requerido puede ser inaceptable en términos de consideraciones fisiológicas, ya que pueden afectar la estabilidad de otros excipientes de la formulación o al fármaco en sí.

En estos casos puede hacerse uso de cosolventes, modificaciones químicas del fármaco o de sus derivados solubles.

B) Cosolventes: Electrolitos débiles y moléculas no polares son frecuentemente poco solubles en agua. Pero su solubilidad puede ser incrementada por la adición de solventes miscibles en agua en los cuales el fármaco sea soluble. Este proceso es

conocido como cosolvencia., y los solventes usados en combinación para incrementar la solubilidad del soluto son conocidos como cosolventes. El mecanismo por el cual el uso de cosolventes incrementa la solubilidad de un soluto no está claramente explicado. Una teoría es que un sistema cosolvente trabaja mediante la reducción de la tensión interfacial entre la fase acuosa y la parte hidrofóbica del soluto.

C) Constante dieléctrica: Una manera práctica de admitir en sentido riguroso una propuesta para el problema de la solubilidad fue encontrado a través de lo que hoy se conoce como requerimientos dieléctricos para la solubilización. De acuerdo con esta teoría, cada soluto muestra una solubilidad máxima, en cualquier solvente dado dependiendo de una o más constantes dieléctricas presentes.

La solubilidad absoluta de un soluto puede variar en dos diferentes solventes que presenten la misma constante dieléctrica, pero el perfil de solubilidad, como una función de la constante dieléctrica, parece ser similar para un soluto en una amplia variedad de solventes. Formulaciones farmacéuticas de equivalentes constantes dieléctricas pueden entonces ser preparadas, y el sistema más apropiado puede ser seleccionado en base a la solubilidad requerida, estabilidad y características organolépticas.

D) Solubilización: La solubilización es definida por McBain como el paso espontáneo de un soluto poco soluble en agua en una solución acuosa de jabón o detergente que es termodinámicamente estable. Cuando surfactantes son agregados a un líquido en bajas concentraciones ellos tienden a orientarse hacia la interfase aire-líquido. Cuando un surfactante adicional es agregado, la interfase es altamente ocupada, y el exceso de moléculas son forzadas dentro de la mayor parte de solvente. Conforme se agregue mayores concentraciones, las moléculas del surfactante en el resto del volumen de la solución comienzan a formar micelas, la concentración a la cual ocurre este fenómeno es conocida como concentración crítica micelar (CMC). Se piensa que ocurre la solubilización a partir de la virtud del soluto de disolverse o ser absorbido hacia dentro de la micela. Debido a esto la habilidad de las soluciones surfactantes para disolver o solubilizar materiales insolubles en agua empieza a la CMC e incrementa al aumentar la concentración de micelas. La aplicación del fenómeno de solubilización en sistemas farmacéuticos es altamente utilizado. Cualquier material puede ser solubilizado dentro de un solvente por medio del uso de un agente de solubilización adecuado.

E) Complejación: Compuestos orgánicos en solución tienden a asociarse unos a otros de manera poco extensa.

Frecuentemente esta asociación es demasiado débil para ser detectada por técnicas estándares. Uno de los métodos más ampliamente usados es la técnica de análisis de solubilidad. Cada sustancia tiene un equilibrio de solubilidad específico y reproducible en un solvente y a una temperatura dados. Cualquier desviación de esto es inherente a la solubilidad y puede ser debido a la formación de nuevas especies en solución. En el caso de compuestos débilmente ácidos ó básicos la solubilidad total es igual a la solubilidad inherente del compuesto sin disociar más la concentración de las especies

disociadas similarmente cuando la formación de un complejo ocurre, a solubilidad total es igual a la solubilidad inherente de la droga sin complejar mas la concentración de la droga.

F) Hidrotropía: El término de hidrotropía es utilizado para designar el incremento de solubilidad en agua de varias sustancias por medio de la presencia de una gran cantidad de aditivos. El mecanismo por el cual ocurre este efecto no es claro.

Muchos trabajos especulan que la hidrotropía no es más que otro tipo de solubilización, en la cual los solutos son disueltos por medio de la orientación de los grupos de agentes hidrotropicos. Las soluciones hidrotropicas no presentan las propiedades coligativas. La aplicación práctica del uso de la complejación e hidrotropía en soluciones farmacéuticas es muy pequeña.

G) Modificación Química del Fármaco: Muchos de los fármacos poco solubles son modificados químicamente para convertirlos en derivados solubles en agua. Este proceso es altamente ocupado en el uso de los corticoides.

### **CONSERVACIÓN**

Numerosas maneras de contaminación existe, incluyendo entre estas, materia prima, equipos y contenedores en procesos, el ambiente de fabricación, operadores, materiales de empaque y el usuario.

Un conservador ideal debe cumplir con los siguientes tres criterios:

- Debe ser un antagonista efectivo en contra de un amplio espectro de microorganismos.
- Debe ser física, química y microbiológicamente estable durante por lo menos el tiempo de vida del producto.
- No debe ser tóxico, adecuadamente soluble, compatible con otros componentes de la formulación, hipoalergénico, y debe ser aceptable con respecto al sabor y olor en las concentraciones usadas.

No existe un conservador que cumpla con todos los requerimientos para todas las formulaciones. La selección del sistema de conservación debe realizarse de manera individual, usando la información publicada y realizando estudios microbiológicos. Frecuentemente, una combinación de dos o más conservadores son necesarios para lograr el efecto antimicrobiano deseado.

Un efectivo diseño del sistema de conservación debe proveer una actividad antimicrobiana durante toda la vida de anaquel del producto. Para asegurar el cumplimiento de este precepto, las características del preservativo en la forma final (incluyendo formulación y envase) deben ser estudiadas como una función del tiempo. El mejor método para demostrar las características del conservador es por medio de una evaluación microbiológica.

La FDA distingue entre organismos que son “siempre objetables” y “usualmente objetables”, basándose en dos factores: la patogenicidad del organismo y el sitio de uso. Entre los organismos reconocidos como indeseables se encuentran: especies de Salmonella, Escherichia coli, especies de Enterobacter, especies de Pseudomonas, especies de Clostridium y Candida albicans.

### **CARACTERÍSTICAS SUBJETIVAS DEL PRODUCTO**

Muchas cualidades de los productos, tales como el sabor, olor y apariencia, no pueden ser cuantificadas, estas son generalmente referidas como “elegancia Farmacéutica”. El valor de estas características en un producto farmacéutico se mide a través la significancia médica y el éxito comercial del producto. Entre los factores a controlar para lograr las características deseadas en cuanto a “elegancia Farmacéutica” se encuentran los siguientes

#### ➤ Uso de Agentes endulzantes

Estos generalmente constituyen la mayor proporción de los sólidos contenidos en la forma farmacéutica en la cual son requeridos. La sucrosa es el agente endulcorante que, a lo largo de la historia, más se utiliza., ya que presenta muchas cualidades como: alta pureza, costos razonables, y estabilidad física y química en un rango de pH de 4.0-8.0. Frecuentemente es utilizada en compañía de sorbitol, glicerina, y otros polvos, los cuales reducen la tendencia de la sucrosa a cristalizar. Además de los edulcorantes naturales existen hoy en día otros edulcorantes sintético, como el aspartame, el cual es, aproximadamente, 200 veces más dulce que la sucrosa.

#### ➤ Control de la viscosidad

En muchos casos es deseable incrementar la viscosidad de un líquido para que presente una textura agradable o para mejorar su apariencia. Esto puede lograrse incrementando la concentración de azúcar o incorporando agentes controladores de viscosidad como polivinilpirrolidona o varios derivados de celulosa. Estos componentes son muy estables en soluciones acuosas en un amplio grado de pH.

Estos polímeros, inductores de viscosidad, deben utilizarse con precaución, ya que se sabe que forman complejos moleculares con una variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos., los cuales influyen la actividad de estos compuestos.

#### ➤ Saborizantes

Las cuatro sensaciones básicas del sabor son: salado, ácido, dulce y agrio. Una combinación de agentes saborizantes son usualmente requeridos para enmascarar estas sensaciones de sabor efectivamente. El mentol y varias sales se usan en combinación, como saborizantes.

#### ➤ Apariencia



La apariencia general de un producto depende primeramente de su color y claridad. La selección del color es usualmente realizada de acuerdo al sabor, por ejemplo, azul o verde para la menta, rojo para cereza.

El tipo de colorantes disponibles para el uso farmacéutico son relativamente estables. La cantidad permitida de estos en cada formulación varían entre países. En cuanto a la claridad de un producto, esta se logra por medio de la remoción de cualquier precipitado que se origine durante la fabricación del producto. Esto puede ser realizado de varias maneras tales como: sedimentación y subsiguiente decantación, centrifugación y filtración. La filtración es el único método práctico cuando grandes volúmenes de producto son involucrados. Generalmente se utilizan filtros de membrana de una gran variedad de materiales y tamaño de poro.

### **ESTABILIDAD**

La estabilidad se define como la capacidad de una fórmula en particular, para mantener las mismas propiedades que poseía al momento de su fabricación, en un sistema específico de envase y cierre, las cuales aseguran su identidad, potencia, calidad y pureza.

Una vez pasada la fecha de vencimiento, la mayoría de las preparaciones farmacéuticas pierden eficacia y algunas pueden desarrollar un perfil de reacción diferente y adverso en el organismo.

La estabilidad de una droga también puede definirse como el tiempo desde la fecha de fabricación y envasado de la fórmula, hasta que su actividad "*química o biológica*" no es menor que un nivel predeterminado de potencia rotulada y sus características "*físicas*" no han cambiado en forma apreciable.

Aunque hay excepciones, en general el 90% de la potencia marcada se reconoce como el nivel de potencia mínima aceptable. La fecha de vencimiento se define entonces como el tiempo en el cual el preparado se mantendrá estable cuando se almacene bajo las condiciones recomendadas.

- Estabilidad física

El conocimiento de la estabilidad "*física*" de una fórmula es muy importante por diferentes razones. Por ejemplo, un producto farmacéutico puede parecer fresco, elegante y profesional mientras se mantenga en el estante, pero cualquier cambio en el aspecto físico, como desaparición del color o turbidez, etc., puede modificar las propiedades del medicamento.

Una solución Farmacéutica físicamente estable debe mantener su viscosidad, color, claridad, sabor y olor durante toda su vida de anaquel. Todas estas características pueden y deben ser evaluadas subjetiva, y objetivamente si es posible, durante el transcurso de un estudio de estabilidad.

Mediciones objetivas pueden realizarse prácticamente; por ejemplo, el color de una solución puede ser medido por medio del uso de espectrofotometría, y la absorbancia a una longitud de onda apropiada en muestras con diversos periodos de tiempo puede ser comparada con un valor inicial, para determinar el cambio de color.

El sabor y el olor continúan evaluándose de manera subjetiva ya sea por el Químico Farmacéutico o por un panel de de individuos, los cuales comparan estas características con una solución de referencia.

Una parte integral de cualquier estudio de estabilidad debe considerar el empaque, ya que este puede presentar un efecto sobre su contenido o viceversa. Por esta razón, protocolos de estabilidad incluyen la evaluación de al menos dos empaques, con diferentes condiciones de almacenamiento, incluyendo exposición a luz natural y artificial.

El principio activo debe estar disponible durante toda la vida de almacenamiento esperada de la preparación. Una ruptura en el sistema físico puede llevar a la no disponibilidad del medicamento para el paciente. Por lo que es importante que el almacenamiento final del producto siempre sea en el mismo contenedor, en el cual fue vendido, hasta el día de caducidad. Colores y sabores, pueden cambiar con el tiempo, debido a la absorción de contenedores o cierres de plástico, evaporación del solvente, que resulta con una concentración del producto o una alteración química.

Muchas de las soluciones son empacadas en contenedores transparentes o ámbar de vidrio con tapas de plástico o metal. Afortunadamente el vidrio generalmente es inerte con soluciones acuosas en un rango apropiado de pH para líquidos orales. Aunque no pasa lo mismo con las tapas de plástico o metal. Tapas de plástico pueden presentar rupturas al estar en contacto con algunos líquidos, mientras que en el caso de tapas de metal pueden presentar, bajo ciertas condiciones, corrosión. En ambos casos es muy importante seleccionar una tapa que sea compatible con el contenido del empaque.

Por otro lado, como algunos productos se venden en envases de dosis múltiples, debe asegurarse la uniformidad del contenido de dosis del ingrediente activo con el tiempo. Una solución turbia o una emulsión rota pueden conducir a un patrón no uniforme de dosificación.

- Estabilidad Química

Las causas “químicas” de deterioro de las drogas se clasifican en incompatibilidad, oxidación, reducción, hidrólisis, racemización, decarboxilación y otras, que también pueden conducir a modificación de las cualidades del medicamento.

### **CONSIDERACIONES DE FABRICACIÓN**

Los principios básicos involucrados en la preparación de líquidos homogéneos son los mismos sin depender de la cantidad o del material involucrado. La solubilidad del soluto y las interacciones intramoleculares y intermoleculares en la solución final en equilibrio, son independientes de la forma de preparación.

#### ❖ Materia Prima

La materia prima involucrada en la fabricación de líquidos debe cumplir con especificaciones. Estas deben asegurar la identidad, potencia, uniformidad, y estar libres de contaminación microbiana.

Aparte del principio activo, el agua es usualmente el constituyente más importante de un producto líquido. Por lo que es necesario conocer los requerimientos para agua purificada. Esta puede ser obtenida por destilación o por tratamiento de intercambio iónico, purificación por osmosis inversa, esterilización por ultravioleta, membrana de filtración.

La materia prima recibida debe ser confiscada y minuciosamente analizada antes de ser liberada para su uso en la fabricación del producto. Procesos adicionales pueden ser necesarios para obtener una propiedad deseable, como un tamaño de partícula específico o la purificación del material.

#### ❖ Equipo

En términos generales, el tipo de equipo utilizado en la fabricación de soluciones orales consiste en una mezcla de tanques equipados con medios de agitación, aparatos de medición de pequeñas y grandes cantidades, y sistemas de filtración para la esterilización y acabado final. La adición del granel de material se realiza por medio de equipos con sistemas de dosificación.

Todos los equipos involucrados en la fabricación deben ser limpiados y sanitizados (esterilizados, si es posible, cuando el proceso lo requiera) antes de su uso. Desinfectantes apropiados incluyen soluciones diluidas de peróxido de hidrógeno, compuestos cuaternarios de amonio, compuestos clorados y alcohol al 70%. Equipos y líneas deben sanitizarse con alcohol, agua hervida, o esterilizarse en autoclave, vapor y por medio de luz ultravioleta.

#### ❖ Procesos compuestos

Soluciones diluidas, preparadas de manera rápida disolviendo los materiales, son simplemente preparadas descargando adicionando el soluto y agitando hasta que la

solución es homogénea. Cuando se realizan soluciones concentradas, o cuando el soluto es lentamente soluble, se requiere del uso de calentamiento.

### **EMPACADO**

El método específico usado para llenar líquidos farmacéuticos varía mucho dependiendo de las características del líquido (ejemplo: viscosidad, tensión superficial, compatibilidad con el empaque, etc.), del tipo de empaque en el cual el líquido será depositado, y de los requerimientos de salida de la producción. Existen tres métodos básicos de llenado, gravimétricos, volumétricos y a nivel constante. Los dos últimos métodos son frecuentemente utilizados en el llenado de líquidos farmacéuticos. Los dosificadores de contenedores que dan un peso (gravimétricos) son generalmente limitados a contenedores grandes o a productos altamente viscosos. Los dosificadores volumétricos son utilizados acompañados por dispositivos de acción de pistón. Cada estación de llenado es equipada con un pistón y un cilindro de medición. La precisión en el llenado es controlada por tolerancias cerradas las cuales se realizan cuando los pistones y cilindros son fabricados. La cantidad de llenado es medida por el golpe del pistón, los cuales presentan un grado de variación limitado. Para modificar las cantidades dosificadas usualmente se necesita del cambio en el montaje del pistón y del cilindro.

La alta velocidad, automatización, de las máquinas dosificadoras de nivel constante, se basan en el uso del principio del sifón, con la modificación sobre la inducción de la presión diferencial entre el líquido descargado en la boquilla y el nivel constante del sistema de sobreflujo. Los métodos más ampliamente usados pueden clasificarse en llenado por vacío, llenado por vacío-gravedad y llenado por presión-vacío.

Para realizar la dosificación o llenado por vacío, un sello debe ser hecho entre la cabeza de llenado y el contenedor. El vacío es desarrollado dentro del contenedor, el cual origina que el líquido fluya del tanque que contiene el granel hacia el contenedor. El nivel del líquido sube hasta que llega al tubo de vacío, el cual es posicionado hacia un nivel constante deseado.

El exceso de líquido es desechado a través del tubo de vacío, y puede ser reciclado hacia el tanque que contiene el granel. En el llenado por gravedad-vacío, el tanque que contiene el líquido a granel se encuentra un nivel arriba del tubo de llenado, así que el manejo de la fuerza de flujo del llenado resulta de ambas presiones negativas en el contenedor y la fuerza de gravedad. Similarmente, en el llenado por presión- vacío, una presión positiva es aplicada en el tanque donde se encuentra el granel, que en combinación con la aplicación de vacío en el contenedor, resulta en una presión diferencial que permite el rápido llenado, incluso en líquido altamente viscosos.

Un problema que es común en todas las máquinas llenadoras de líquidos, pero que es especialmente preocupante en aquellos equipos de llenado rápido, es la formación excesiva de espuma. La formación de espuma durante la operación frecuentemente puede disminuirse utilizando equipos de llenado que minimicen la turbulencia., con sistemas de llenado cerrados que limiten la introducción de aire u otros gases que participen en la formación de espuma, con aparatos mecánicos que deshagan la espuma, y reduciendo la velocidad en el llenado en línea.

### **3.3.5. Tipos de soluciones Farmacéuticas** <sup>(12)</sup>

Las soluciones pueden ser clasificadas en base a sus propiedades físicas o químicas, método de preparación, usos, estado físico o número de ingredientes y tamaño de partículas. La siguiente clasificación se basa en el solvente prioritario en la solución.

El principal ingrediente en la mayoría de las formas farmacéuticas descritas a continuación es el agua. Esta es usada como solvente y/o como vehículo, ya que es inodora, no produce ninguna irritación, carece de actividad farmacológica, lo que la hace ideal para su uso. Existe una tendencia en asumir que el agua es constantemente pura y que puede ser almacenada, manipulada y usada con un mínimo de cuidados. Sin embargo para su uso en la industria farmacéutica es necesario asegurar su purificación. Así como también es obligatorio realizar ciertas pruebas para asegurar el uso adecuado de la misma.

#### Aguas aromáticas

Son conocidas también como aguas medicinales, son claras, soluciones acuosas saturadas de aceites volátiles u otras sustancias aromáticas. Su olor y sabor es similar a los fármacos o sustancias volátiles con las cuales son preparadas. Son utilizadas principalmente como vehículos para saborizar o perfumar. Las aguas aromáticas son preparadas por destilación o solubilizando las sustancias aromáticas con o sin el uso de agentes dispersantes como talco. Agua de menta USP o agua de rosas USP son ejemplos de aguas aromáticas.

#### Soluciones simples

El soluto es generalmente una sustancia no volátil, el cual es disuelto en el solvente, mezclando hasta su completa disolución, y adicionando después suficiente solvente para dar a la solución el volumen apropiado. El solvente puede contener otros ingredientes que estabilicen o solubilizan el ingrediente activo. Ejemplos de estas son: Soluciones orales de fosfato de sodio USP, Soluciones de yodo, Soluciones tópicas de hidróxido de calcio, etc.

#### Soluciones obtenidas por reacción química

Estas soluciones son preparadas por de dos o mas solutos que reaccionan entre ellos en presencia de un solvente apropiado. Un ejemplo de ellas es la solución tópica de subacetato de aluminio.

#### Duchas

Son soluciones acuosas que son aplicadas directamente en una parte o en una cavidad del cuerpo. Su función es de limpieza o como agente antiséptico. Las duchas vaginales

son el tipo más común de duchas y son usadas para limpiar la vagina y con propósitos higiénicos.

#### ✚ Enemas

Preparaciones o enemas son inyecciones rectales utilizadas para evacuar el intestino. Pueden contener antihelmínticos, nutrientes, sedantes, o propiedades estimulantes.

#### ✚ Enjuagues orales

Son soluciones acuosas que frecuentemente contienen antisépticos, antibióticos, y/o anestésicos. Muchos enjuagues deben ser diluidos antes de su uso con agua. Pueden tener un uso farmacéutico o cosmético. Su uso farmacéutico es generalmente para reducir la placa dentó bacteriana, gingivitis, caries dental, y estomatitis. Su utilización cosmetológica es para reducir el mal aliento a través del uso de antimicrobianos o agentes saborizantes.

#### ✚ Soluciones oro faríngeas

Son soluciones acuosas que principalmente son utilizadas por aspersion del líquido dentro de la cavidad oral. Contienen frecuentemente antisépticos, antibióticos, anestésicos y antimicrobianos usados para el tratamiento de faringitis, nasofaringitis y/o estomatitis.

Generalmente contiene algunos de los siguientes excipientes:

- a) Alcohol: Generalmente ocupa del 10 al 20% de la formulación. Este realza el sabor, provee de un cierto sabor ácido, ayuda a enmascarar un sabor desagradable del ingrediente activo, muchas veces su función es solubilizar algunos agentes saborizantes, y puede funcionar como conservador.

Humectantes como glicerina y sorbitol, pueden formar del 5-20% de la preparación y proveen ciertas características para darle cuerpo y/o apariencia a la formulación. Ellos proporcionan un sabor dulce al producto y junto con el etanol, proporcionan actividades conservadoras al producto.

- b) Surfactantes: Surfactantes de la clase no aniónica como el poloxietileno o propoxypropileno, derivados de ésteres de ácidos grasos del sorbitol, o laurel sulfato de sodio, pueden ser usados. El rango de concentración es de 0.1-0.5%. Son utilizados para solubilizar saborizantes o para remover restos provistos por la formación de espuma. Surfactantes catiónicos son utilizados por sus propiedades antimicrobianas, pero algunos proveen un sabor amargo al producto.
- c) Saborizantes: Son utilizados, en conjunción con alcohol y humectantes, para desaparecer el sabor desagradable del producto. Los principales agentes saborizantes son menta, canela, hierbabuena, mentol o metilsalicilato. Pueden ser utilizados en forma conjunta.

### Soluciones nasales

Son usualmente soluciones acuosas designadas para ser administradas en las cavidades nasales en gotas o spray. Otras preparaciones nasales pueden ser emulsiones o suspensiones.

Las soluciones nasales son usualmente isotónicas y mantenidas a un pH entre 5.5 y 6.5. Contienen antimicrobianos, conservadores, estabilizantes del fármaco.

### Soluciones óticas

Estas incluyen, principalmente, preparaciones para aplicación tópica en el oído. La mayoría de los fármacos utilizados en estas soluciones son analgésicos, antibióticos y antiinflamatorios.

Los solventes principalmente utilizados en su formulación son glicerina o agua. La viscosidad de la glicerina permite a la preparación permanecer por más tiempo dentro del oído.

### Soluciones para irrigación

Son utilizadas para el baño o para limpieza quirúrgica, heridas, o lavado de tejidos. Como en su utilización se mantienen en contacto con tejidos expuestos es necesario que cumplan con ciertos requerimientos como esterilidad. Estos productos pueden ser preparados disolviendo el ingrediente activo en agua para inyectables. Son empacadas en contenedores de dosis única, preferentemente de vidrio tipo I o II, o en contenedores de plástico apropiados. y después esterilizados o preparados en un proceso de llenado aséptico.

### Jarabes

Son soluciones concentradas de azúcares como sucrosa en agua o en otros líquidos acuosos. En adición a la sucrosa, pueden contener otros polioles como glicerina o sorbitol que ayudan a retardar la recristalización de la sucrosa o incrementar la solubilidad de los principios activos. El alcohol también es incluido en la preparación como conservador y también como solvente de agentes saborizantes; también puede incluirse en la formulación agentes antimicrobianos.

## **Soluciones no acuosas**

### Coloides

Son preparaciones líquidas que contienen nitrocelulosas en combinación con éter etílico y etanol. Son aplicados en la piel por medio de cepillos suaves u otros aplicadores y cuando el alcohol se evapora, queda una capa delgada de nitrocelulosa. Son utilizados para reducir o eliminar los efectos adversos de tratamientos de queratosis solar.

#### Elixir

Son líquidos claros, de sabor agradable, dulces y hidroalcohólicos usados de forma oral. El principal ingrediente de los elixires es el etanol y el agua pero con glicerina, sorbitol, propilenglicol, agentes saborizantes, conservadores

#### Glicerinas

Glicerinas o gliceratos son soluciones o mezclas de sustancias medicinales que contienen no menos del 50% en peso de glicerina.

### **3.4. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS**

#### **ANTECEDENTES**

##### **3.4.1. Cromatografía** <sup>(14,15,16)</sup>

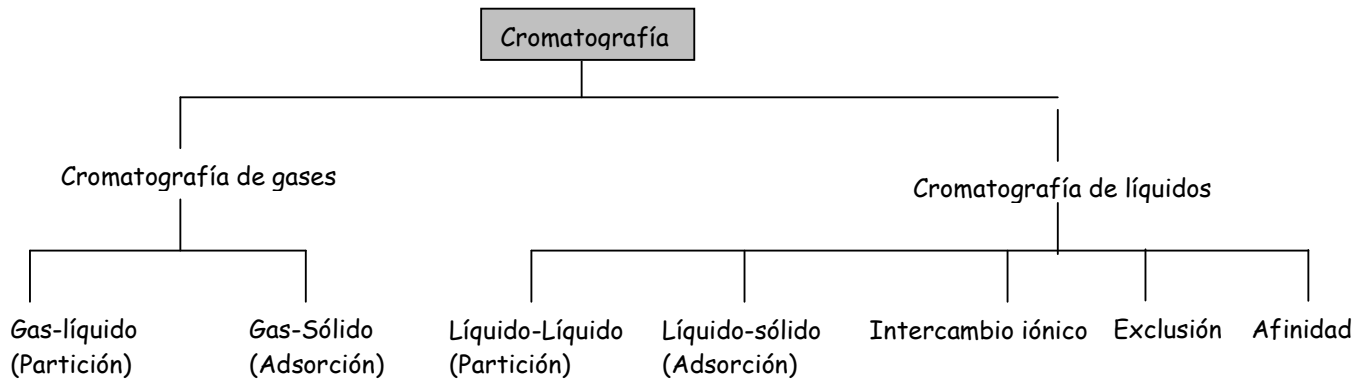
Los métodos de separación son una de las principales herramientas en todas las ramas de la química. El tener una técnica analítica confiable que nos permita asegurar que nuestra mezcla puede separarse y cuantificarse de manera exacta es una de las principales metas para el químico analítico.

La cromatografía se define como un método físico que permite separar, aislar e identificar los componentes de una mezcla. La separación se lleva a cabo por medio de la distribución de los componentes en dos fases, una fase móvil, (líquida o gaseosa) que circula a través de una fase estacionaria, (sólida o líquida). Los componentes de la muestra migran a través del sistema cromatográfico solamente cuando se encuentran en la fase móvil. Los componentes emergen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria.

##### **3.4.2. Clasificación de los métodos cromatográficos.**

De acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas y de los mecanismos de separación, se tienen diferentes tipos de cromatografía:





1) Cromatografía de Partición: En la cual la separación se basa en un reparto entre la fase móvil y la fase estacionaria

2) Cromatografía de adsorción: En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria es un sólido (adsorbente), y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción.

3) Cromatografía de intercambio iónico: En la cual la fase estacionaria tiene una superficie cargada iónicamente, con una carga contraria a la muestra, por lo que cuanto mayor sea la carga de la muestra, más fuertemente será atraída hacia la superficie iónica y por tanto más tiempo tardará en ser eluída, la fase móvil es una solución reguladora acuosa, en el que el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elución.

4) Cromatografía de Exclusión: es un modo de separación no interactivo en el cual la separación se logra de acuerdo al tamaño y forma de las moléculas de los componentes de la mezcla. La cromatografía de exclusión requiere de sólo un disolvente en el que se disuelve y cromatografía la muestra.

5) Cromatografía de afinidad: permite la separación de mezclas por su afinidad o capacidad de unión a un determinado ligando. Cuando a través de la columna pasa una muestra, sólo se retiene aquellos solutos que selectivamente se unen al ligante complementario, los otros componentes de la muestra eluyen sin retención

Debido a que no siempre puede determinarse cual de los procesos implicados, el de adsorción o el de reparto desempeña el papel más importante, se definen dos o más tipos de cromatografía, según sea la polaridad relativa de las dos fases.

-Cromatografía de Fase normal: En la cual la fase estacionaria es fuertemente polar (sílice) y la fase móvil es apolar. Los componentes polares son eluidos más tardíamente que los menos polares o apolares.

-Cromatografía de fase inversa: en la cual la fase estacionaria es de naturaleza no polar (hidrocarburos) y la fase móvil es polar. Por lo que contrario a la cromatografía de fase normal, los componentes no polares serán eluidos más lentamente que los polares.

### 3.4.2.1. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

Debido a que casi el 80% de los compuestos químicos no son volátiles, la cromatografía de líquidos es potencialmente más importante que la cromatografía de gases, ya que en ella los solutos pueden interaccionar fuertemente con la fase móvil líquida y además se ha demostrado que la interacción de ésta con la fase estacionaria tienen un efecto muy pronunciado en la retención, por lo que al manipular la fase móvil se obtiene una forma para controlar la retención, lo cual no se puede lograrse en cromatografía de gases.

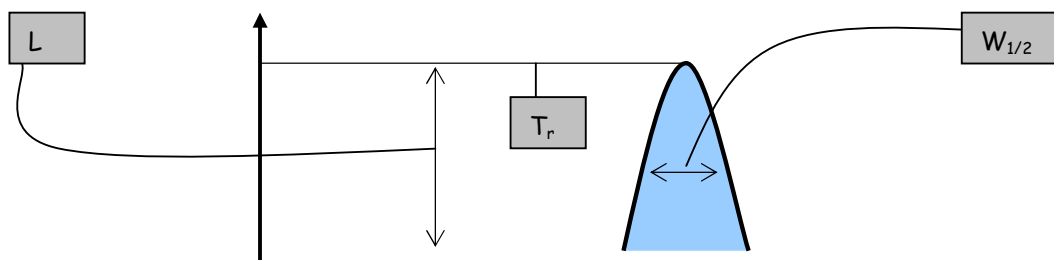
La Cromatografía de líquidos de alta resolución se define como una técnica que realiza la separación física de una mezcla de compuestos a través de la interacción selectiva entre los solutos, una fase estacionaria y una fase móvil, haciendo uso de instrumentación automatizada de alta eficiencia.<sup>4</sup>

La cromatografía de líquidos de alta resolución se caracteriza por:

- Columnas reutilizables de diámetro pequeño (2-5mm)
- Rellenos de columnas de pequeño diámetro (5-50 micras)
- Presión de entrada relativamente alta y flujo controlado de la fase móvil.
- Introducción precisa de la muestra, sin necesidad de grandes cantidades
- Detectores continuos especiales, capaces de operar a caudales muy bajos y a concentraciones muy pequeñas.
- Instrumentos normalizados y automatizados
- análisis rápido y alta resolución.

### 3.4.3. PARAMETROS CROMATOGRÁFICOS <sup>(18,19)</sup>

Los picos gaussianos que representan el número de moléculas eluidas frente al tiempo, constituyen un cromatograma, tal como se muestra en la siguiente figura:



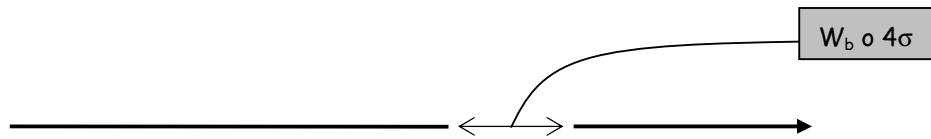


Fig 4 Representación de número de moléculas eluidas con respecto al tiempo.

Los parámetros a evaluar en un cromatograma son:

**-Tiempo de retención (Tr):**

El tiempo que la muestra permanece dentro de la columna, y se mide desde el inicio de la inyección hasta que se obtiene el punto máximo de la señal. Es una función que depende del largo de la columna o fase estacionaria, de la velocidad de la fase móvil, de la afinidad del soluto por la fase estacionaria y de la temperatura de la columna.

**-Tiempo muerto (tm):**

Es el tiempo requerido para eluir una sustancia no retenida en la columna

**-Número de platos teóricos:**

Indica la capacidad de la columna para proporcionar picos estrechos y bien separados, a mayor número de platos teóricos mayor eficiencia o capacidad tendrá la columna para separar los componentes. El número de platos teóricos (N) se calcula por medio de la siguiente ecuación:

$$N = 16 \left( \frac{T_r}{W_b} \right)^2 \quad \text{Donde}$$

Tr= Tiempo de retención

Wb= ancho del pico medido en su base

El valor teórico de N depende del tiempo de elusión pero generalmente debe ser mayor a 2000. (ICH)

**-Coeficiente de distribución o de reparto K:**

Cuando un soluto entra al sistema cromatográfico inmediatamente se reparte o distribuye entre la fase móvil y la estacionaria. Si la fase móvil se para en cualquier momento, el soluto establece en equilibrio de distribución entre las dos fases. La concentración en cada fase está dada por el coeficiente termodinámico de repartición, en

donde  $C_s$  y  $C_m$  son las concentraciones de soluto en la fase estacionaria y móvil, respectivamente.

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

#### **-Relación de Capacidad K':**

Es una medida de la capacidad de retención de un componente por la fase estacionaria, y es característico para una columna dada. Es expresado por la siguiente ecuación, donde  $T_r$  = Tiempo de retención,  $T_m$  = tiempo en la fase móvil.

$$K' = \frac{T_r - T_m}{T_m}$$

Generalmente el valor de  $K'$  debe ser mayor a 2. (ICH)

#### **-Selectividad:**

La selectividad  $\alpha$  de una columna es una medida de la separación relativa entre dos picos de los componentes analizados, por ejemplo de dos solutos, donde el soluto 1 eluye antes del soluto 2, y depende de la naturaleza de las fases estacionaria y móvil, así como de la temperatura de operación de la columna, y se define por:

$$\alpha = \frac{K'_2}{K'_1} = \frac{K_2}{K_1} = \frac{V_{r2}}{V_{r1}} = \frac{T_{r2}}{T_{r1}}$$

#### **-Resolución:**

Indica la separación entre dos picos adyacentes en un cromatograma. El grado de separación o resolución de las bandas adyacentes se define como la distancia entre los picos de las bandas dividida entre el ancho promedio de las bandas.

$$R_s = \frac{T_{r2} - T_{r1}}{0.5(W_2 + W_1)}$$

Para asegurar que el pico de interés se encuentra separado de otro pico (impureza, excipiente, producto de degradación estándar interno, etc.) que puede interferir con su cuantificación es recomendable y deseable obtener una  $R_s$  mayor a 2. (ICH).

#### **-Factor de coileo (T):**

La precisión de la cuantificación de un pico de interés puede disminuir en un pico coileado ya que el integrador encuentra dificultades para determinar donde o cuando termina el

pico, es por ello que para asegurar una optima cuantificación. Este factor debe encontrarse por debajo de 2. (ICH)

### 3.4.4. Instrumentación <sup>(21)</sup>

Hoy en día muchas compañías venden instrumentos completos para la CLAR, algunos arman sus propios aparatos, partiendo de las necesidades que requieren, y usando componentes comerciales de otros fabricantes o incluso de sus propios talleres. Dependiendo de la calidad de sus componentes, los precios de los cromatógrafos de líquidos varían mucho.

El cromatógrafo de líquidos consiste básicamente de un sistema de bombeo, el inyector, la columna cromatográfica, el detector, el integrador y el registrador.

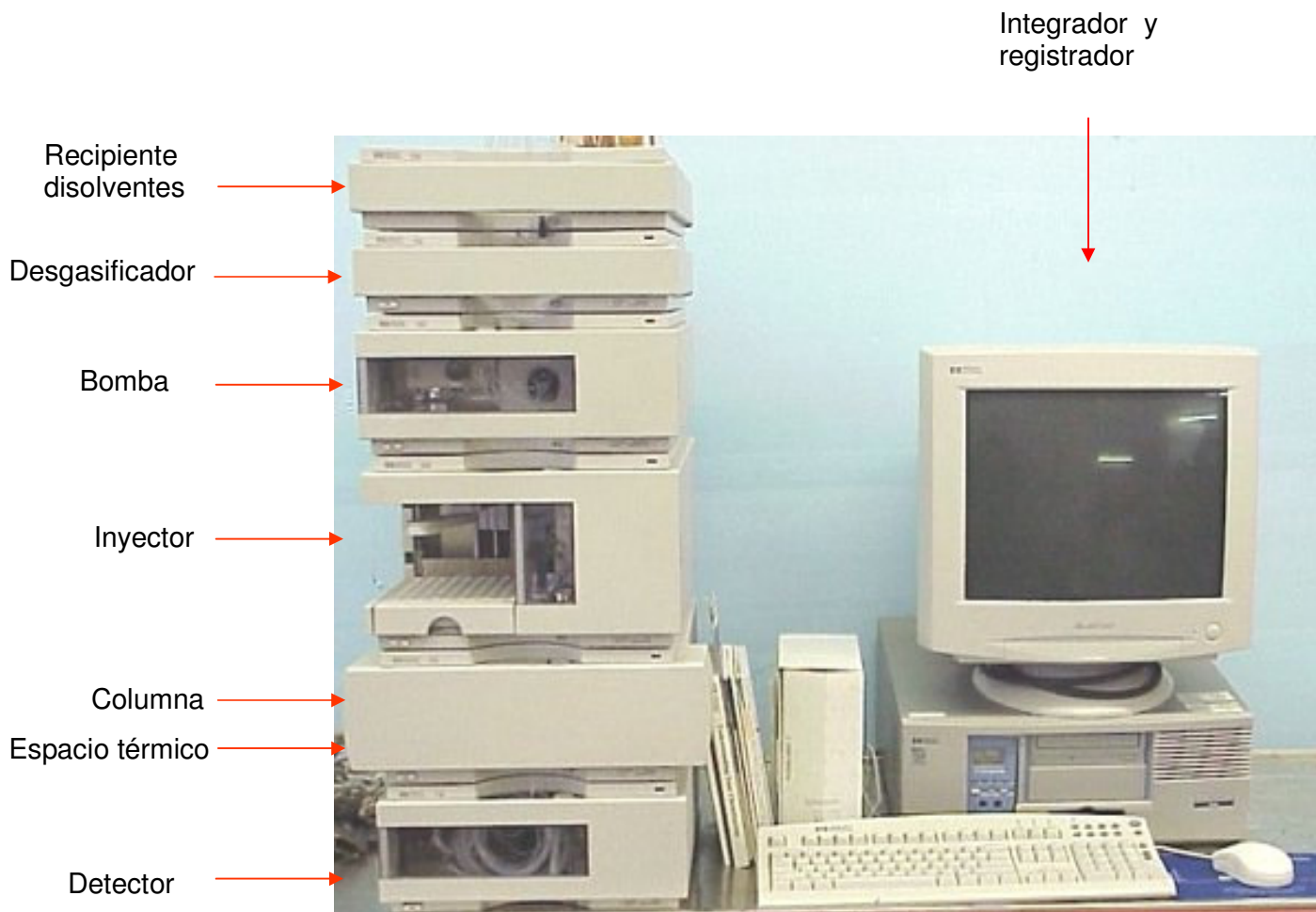


Fig. 5 Componentes de un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución.

## **-Bomba**

Los sistemas de bombeo se encargan de proporcionar a la fase móvil, la presión necesaria para que, operando a un flujo preciso y constante, atraviese la columna cromatográfica. Hay bombas que mantienen solamente un flujo isocrático y otras que pueden programar gradientes del solvente.

## **-Inyector**

Un factor esencial para obtener una buena resolución en la separación es tener una adecuada introducción de la muestra en el sistema, ya que debe proporcionar una zona de poco volumen, completamente barrida por la fase móvil, para evitar la difusión de la muestra. Existen diversos mecanismos de introducción de la muestra; se pueden clasificar como manuales, automáticos y computarizados.

## **-Columna cromatográfica**

Se considera a la columna la parte primordial de la cromatografía, ya que es en esta donde se lleva a cabo la separación de la mezcla. Básicamente la columna consiste en un tubo de acero inoxidable, con una longitud de 7.5 a 30 cm., un diámetro interno de 2-5 mm, contiene a la fase estacionaria, el material de empaque seleccionado dependerá de la separación que se desee realizar.

Básicamente existen tres tipos diferentes de materiales de empaque:

- a) Gel de sílice
- b) Gel de sílice modificada químicamente para obtener un compartimiento de selectividad específica
- c) Alúmina.

Los materiales de empaque de las columnas utilizadas en CLAR deben de cumplir con los siguientes requisitos:

- a) Estabilidad estructural
- b) Grandes superficies de contacto
- c) Superficies estructurales abiertas, que sean de fácil acceso a la fase móvil.
- d) resistencia para ser comprimidas por presiones altas.

## **-Fase móvil**

Es parte activa en un sistema de cromatografía de líquidos, por lo que la selección adecuada es fundamental para obtener una separación por CLAR.

Características de la fase móvil:

- a) Alta pureza
- b) Fácil disponibilidad a razonable precio.
- c) Un punto de ebullición de 20 a 50 °C arriba de la temperatura de la columna.
- d) Baja viscosidad ( mayor a 0.5cp).
- e) Baja reactividad para evitar interacción con solutos o con el empaque.
- f) Limitada inflamabilidad y toxicidad.

### **-Detectores**

El detector es un dispositivo capaz de monitorear en forma continua alguna propiedad fisicoquímica de los componentes de la muestra o de la solución que los contiene, generando una señal proporcional a la concentración de la muestra a medida que la misma sale de la columna.

Los cromatógrafos actuales de cromatografía líquida poseen un intervalo operativo amplio que normalmente permite trabajar en un mismo aparato a escala analítica o preparativa. Tiene gran sensibilidad, lo que permite la detección en nanogramos de material.

El detector más utilizado en CLAR, es un detector de absorción (UV/VIS); que responde a aquellas sustancias que absorben luz visible o ultravioleta, tales como sustancias que tiene electrones sin compartir como las oleofinas, así como todos los aromáticos. Existen detectores de longitud de onda fija y con longitud de onda variable, los primeros tienen la ventaja de ser de bajo costo y alta sensibilidad, mientras que los segundos; proporcionan espectros continuos por lo que son más sofisticados y costosos.

Otros detectores también utilizados en CLAR son:

- a) Detector de índice de refracción (detector de desviación y detector de reflexión).
- b) Detector de fluorescencia.
- c) Detector electroquímico
- d) Detector infrarrojo

### **3.4.5. Validación de métodos analíticos.** <sup>(18,19,20)</sup>

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se obtiene evidencia documentada por estudios de laboratorio de que las características del comportamiento del método, satisfacen los requerimientos para las aplicaciones analíticas deseadas. <sup>5</sup>

Se decide si un método analítico es útil y confiable, después de que han sido evaluadas sus características, con respecto a los resultados requeridos en un conjunto específico de condiciones, a través de la validación.

De acuerdo a la Conferencia Internacional de Armonización y a la USP los requisitos que debe cumplir la validación de un método analítico farmacopeico son: precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, especificidad, intervalo, linealidad y robustez. La información que se requiere para la validación de un método analítico depende de la aplicación deseada por lo que el primer paso para la validación de un método analítico es determinar la categoría a la cual pertenece, las cuales son: <sup>(18)</sup>

Categoría I: Los métodos analíticos para la cuantificación de los principales componentes del fármaco o de los principios activos en productos farmacéuticos terminados.

Categoría II: Los métodos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos o productos de degradación en el producto farmacéutico, incluyendo ensayos cuantitativos y pruebas de límites.

Categoría III: Los métodos analíticos para la determinación de las características del comportamiento del producto, como por ejemplo pruebas de disolución, liberación de fármacos, etc.

Categoría IV: Pruebas de identificación

A continuación se presenta la información requerida para cada categoría de análisis

Validación de métodos analíticos					
Parámetros	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Cuantitativa	Límite		
Precisión	Sí	Sí	No	Sí	No
Exactitud	Sí	Sí	Depende prueba	Depende prueba	No
Límite Detección	No	No	Sí	Depende prueba	No
Límite Cuantificación	No	Sí	No	Depende prueba	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	Depende prueba	Sí
Intervalo	Sí	Sí	Depende prueba	Depende prueba	No
Linealidad	Sí	Sí	no	Depende prueba	No
Robustez	Sí	Sí	Sí	Sí	No

Tabla 3 Clasificación de métodos analíticos por categorías.

### 3.4.5.1. Clasificación de los parámetros de validación. (18,19,21,22,23)

De acuerdo a Hokanson los parámetros de validación se pueden dividir en tres clases, estas basándose en las características que evalúan el comportamiento del método.

Parámetros que evalúan la adecuabilidad del método analítico y estos corresponden a los parámetros de especificidad, linealidad, límites de detección y límite de cuantificación.

Parámetros que evalúan la efectividad del método analítico y estos corresponden al parámetro de exactitud.



Parámetros que involucran aspectos relacionados al método analítico, al proceso de preparación de la muestra y al analista, siendo los parámetros de precisión y robustez.

## **Linealidad**

Es la habilidad del método para asegurar que los resultados analíticos obtenidos directamente o bien mediante una transformación matemática bien definida, sean proporcionales a la concentración de la sustancia de interés dentro de un intervalo de concentraciones establecido, cabe señalar que el proceso de validación del método se debe determinar la linealidad del sistema y del método analítico.

Linealidad del sistema: La determinación de la linealidad del sistema tiene como objetivo demostrar que el método analítico, origina una respuesta lineal de la sustancia de interés dentro de un intervalo de concentración, cuyo punto intermedio se encuentra al 100% de la cantidad a cuantificar por el método de análisis.

Linealidad del método: Los estudios de linealidad demuestran la capacidad del método para proporcionar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, dentro de un intervalo de concentración establecido.<sup>7</sup>

Generalmente la linealidad se determina construyendo una curva de calibración, utilizando cuando menos cinco concentraciones diferentes y preparadas por duplicado.

## **Exactitud**

Es la concordancia absoluta entre un valor obtenido experimentalmente empleando el método a la muestra y el valor verdadero de referencia en esa muestra. Se expresa como el % de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

## **Precisión**

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia. Generalmente se expresa en términos de desviación estándar o desviación estándar relativa.

La precisión es la medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

## **Repetibilidad:**

Es la precisión de un método analítico expresada como concordancia obtenida entre determinaciones independientes, realizadas bajo las mismas condiciones de operación.

## **Reproducibilidad:**

Es la precisión de un método analítico expresada como concordancia obtenida entre determinaciones independientes, realizadas bajo condiciones diferentes de operación (tiempo, equipo, laboratorio, etc.)

### **Límite de detección**

Es la mínima concentración de una sustancia de interés presente en una muestra la cual puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas. Un estimado del límite de detección es determinado como la respuesta igual a tres veces el nivel del ruido del sistema cromatográfico.

### **Límite de cuantificación.**

Es la concentración más baja de la sustancia de interés que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas. Un estimado del límite de cuantificación es determinado como cinco veces el límite de detección o como la respuesta igual a diez veces el nivel de ruido del sistema cromatográfico.

### **Especificidad**

Es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra. Los excipientes; las sustancias relacionadas, de síntesis y de degradación, los disolventes residuales; las impurezas, etc., no deben interferir ni influenciar el resultado analítico.

La demostración de especificidad muestra su máxima aplicación cuando la técnica propuesta se emplea para determinar el compuesto en estudio de estabilidad.

Generalmente se expresa como la interferencia obtenida entre el análisis de muestras adicionadas de productos de degradación, sustancias relacionadas o ingredientes del placebo y el análisis de muestras sin adición de impurezas. La especificidad es una medida del grado de interferencia.

### **Tolerancia**

Es la medida de la capacidad del método de permanecer inalterable ante pequeñas variaciones deliberadas en los parámetros y darnos una indicación de su confiabilidad durante uso normal.

Es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos en el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como: diferentes temperaturas, diferentes lotes de reactivos, columnas, sistemas de elusión, tipos de empaque, (soporte, fase estacionaria, etc.), condiciones ambientales, etc. Es normalmente expresado como la falta de influencia de variables ambientales

sobre los resultados obtenidos al aplicar el método analítico. Es una medida de la reproducibilidad de un laboratorio a otro o de un analista a otro (robustez del método)

El tener cambios pronunciados en la respuesta puede tener como consecuencia que se tomen decisiones erróneas sobre la aprobación de un lote en la industria, o sobre el aspecto clínico de un paciente.

### **Estabilidad de la muestra.**

Es la propiedad de la muestra preparada para su cuantificación, de conservar su identidad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas. Para determinarla se prepara una serie de muestras, y se analizan el día de la preparación, se almacenan durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas, y reanalizándose al término del periodo de almacenamiento establecido.

## CAPITULO IV DESARROLLO EXPERIMENTAL

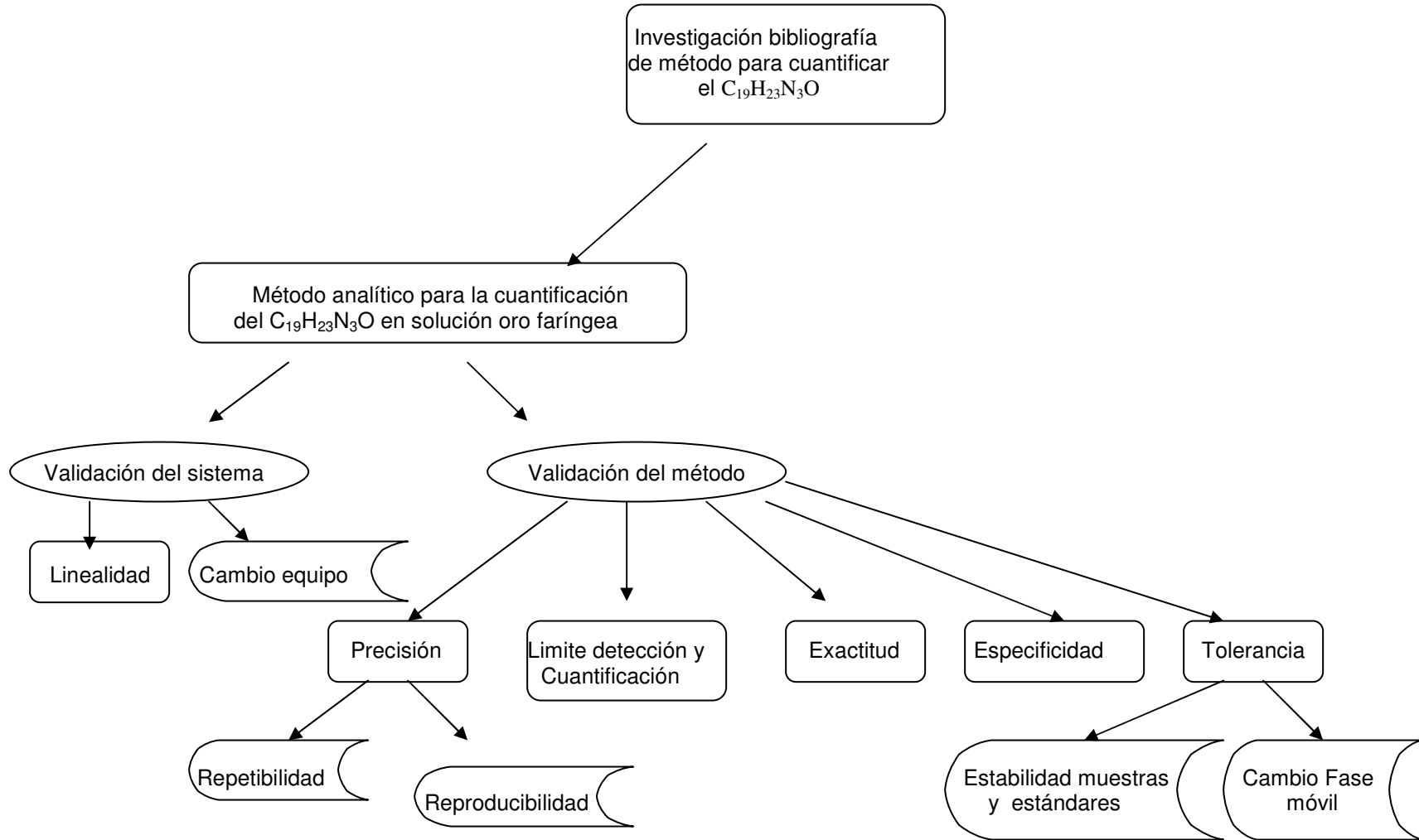


Fig. 6 FLUJO DE ACTIVIDADES

## **4.1 PROTOCOLO DE VALIDACION**

De acuerdo a los objetivos planteados el presente trabajo experimental se enfocara en la validación del método analítico por CLAR para cuantificar el  $C_{19}H_{23}N_3O$  en una solución oro faríngea, de acuerdo a la categoría a la que pertenece. Las pruebas a evaluar fueron descritas en el capítulo anterior y la manera de realizarlo se explica a continuación.

### **4.1.1. Parámetros de validación:**

Para la prueba de cuantificación del  $C_{19}H_{23}N_3O$  se evaluarán los siguientes parámetros de validación:

- Especificidad y selectividad.
- Linealidad,
- Exactitud,
- Limite de cuantificación y detección
- Repetibilidad
- Precisión intermedia
- Tolerancia.

#### **4.1.1.1. Materiales, equipos y reactivos**

Equipos:	HPLC Waters HPLC Agilent
Columna:	Purospher Rpe 18 5 $\mu$ 125 X 4 mm
Precolumna:	Purospher Rpe 18 5 $\mu$ 10 X m
Reactivos:	Acetonitrilo HPLC
	Acido acético GR
	Dodecilsulfato de sodio GR
	Agua HPLC
	Filtros de membrana Millipore 0.45 $\mu$ m
Placebo:	El placebo fue preparado por el departamento de Tecnología de la Producción en la Planta de Líquidos, este placebo contenía todos los componentes de la suspensión excepto el $C_{19}H_{23}N_3O$ .
Material:	Matraces volumétricos de 10, 20, 50, 100, 200, y 1000 mL
	Pipetas volumétricas de 2,3,4,5,6,7 y 9 mL
	Equipo de filtración rápida de vidrio
	Reservorios para fase móvil
	Matraces Kitasato

Tabla 4. Listado de materiales, equipos y reactivos.

### **4.1.2 Condiciones cromatográficas**

#### **4.1.2.1 Procedimiento de identificación**

El tiempo de retención del  $C_{19}H_{23}N_3O$  en la solución prueba debe corresponder al tiempo de retención de la solución de comparación.

#### 4.1.2.2 Parámetros de operación

Columna	Purospher Rpe 18 5 $\mu$ 125 X 4 mm
Precolumna:	Purospher Rpe 18 5 $\mu$ 10 X 4 mm
Fase móvil	Acetonitrilo grado HPLC 550 mL 2.307 g de Dodecilsulfato de sodio RA Agua HPLC 445 mL Ácido acético RA 5 mL
Temperatura	Ambiente
Volumen de inyección	10 $\mu$ L
Flujo	1.0 mL/min.
Longitud de onda	305 nm
Tiempo de corrida	8 minutos aproximadamente
Tiempo de retención	Aprox. 5.7 min.

Tabla 5 Condiciones de Operación.

#### 4.1.3 Preparación de soluciones

##### Preparación de fase móvil

Disolver 2.307 g de dodecilsulfato de sodio en 445 mL de agua y adicionar 5 mL de ácido acético GR, mezclar y filtrar. Adicionar 550 mL de acetonitrilo previamente filtrado. Mezclar y desgasificar con ultrasónico.

##### Preparación del estándar de Referencia (preparar por duplicado)

Pesar aproximadamente con exactitud 30 mg del  $C_{19}H_{23}N_3O$  sustancia de referencia, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 50 mL de agua y agitar mecánicamente hasta disolución (aproximadamente 5 minutos), llevar a volumen con agua y mezclar. Concentración aprox. = 0.3 mg/mL.

Para fines de adecuabilidad preparar el estándar por duplicado e inyectar 5 veces el estándar 1 y una vez el estándar 2 e intercalar inyecciones de estándar cada 6 inyecciones de muestras; el coeficiente de variación de todas las replicas de los estándares no debe ser mayor al 2%.

También se deberán cumplir los siguientes criterios de aceptación:

$$K' > 2$$

$$R > 2$$

$$T \leq 2$$

Tr constante  $\pm$  1 minuto del tiempo esperado (Tr esperado = 5.7 min.)

N reportar los valores encontrados.

### Preparación de muestras

Transferir una alícuota de 4mL de la muestra sin diluir a un matraz volumétrico de 20 mL, llevar a volumen con agua y mezclar. Concentración aprox. = 0.3 mg/mL.

#### **4.2. Especificidad y selectividad**

De acuerdo a lo encontrado en la bibliografía, las degradaciones del activo serán adicionadas a muestras de: placebo, producto y estándares, las soluciones a preparar serán las siguientes:

##### Solución placebo + Impureza

Pesar aproximadamente 5 mg de la impureza ( AF1259, AF956,AF1088, AF1346, AF 1316 y AF2973, según corresponda) y disolver en 4 mL de solución placebo. Diluir con agua a 20 mL.

##### Solución Placebo + Impurezas

Pesar aproximadamente 5 mg de cada impureza ( AF1259, AF956,AF1088, AF1346, AF 1316 y AF2973) y disolver con 4mL de solución placebo. Diluir con agua a 20 mL.

##### Solución placebo + Estándar

Pesar aproximadamente 6mg del estándar del  $C_{19}H_{23}N_3O$  y disolver con 4mL de la solución placebo. Diluir con agua a 20mL.

##### Solución placebo + Estándar + Impureza

Pesar aproximadamente 6mg del estándar del  $C_{19}H_{23}N_3O$  y 5 mg de cada impureza ( AF1259, AF956,AF1088, AF1346, AF 1316 y AF2973, según corresponda) y disolver con 4mL de solución placebo. Diluir con agua a 20 mL.

##### Solución placebo + Estándar + Impurezas

Pesar aproximadamente 6mg del estándar del  $C_{19}H_{23}N_3O$  y 5 mg de cada impureza ( AF1259, AF956,AF1088, AF1346, AF 1316 y AF2973) y disolver con 4mL de la solución placebo. Diluir con agua a 20mL.

##### Solución muestra + Impureza

Pesar aproximadamente 5 mg de la impureza ( AF1259, AF956,AF1088, AF1346, AF

1316 y AF2973, según corresponda) y disolver en 4 mL de solución muestra. Diluir con agua a 20 mL.

#### Solución muestra + Impurezas

Pesar aproximadamente 5 mg de cada impureza ( AF1259, AF956,AF1088, AF1346, AF 1316 y AF2973) y disolver con 4mL de solución muestra. Diluir con agua a 20 mL.

Preparar e inyectar por duplicado cada solución. Preparar las soluciones de adecuación del sistema e intercalar cada 6 inyecciones de muestras y al finalizar cada serie.

**Criterio de aceptación:** Obtener los cromatogramas y verificar que la señal de las impurezas no interfieren con la señal del principio activo ( selectividad) . Es decir que el tiempo de retención de las impurezas sea diferente al Tiempo de retención del pico de interés; además de que la resolución mínima entre el pico de interés con respecto a cada una de las impurezas sea mayor a 1.5. Así como también verificar que ninguna señal correspondiente a los excipientes de la solución no interfiera con el pico de interés ( especificidad) .

### 4.3. Linealidad del sistema

La linealidad será examinada en cinco niveles diferentes de concentración de la solución estándar en un rango de 60 a 140 %; considerando el 100% una solución de 0.3 mg/mL del  $C_{19}H_{23}N_3O$ . Se prepararán dos diferentes curvas y cada nivel será inyectado por duplicado.

#### Solución stock

Pesar 60 mg de  $C_{19}H_{23}N_3O$  sustancia de referencia, transferir a un matraz volumétrico de 50mL y disolver con agua destilada.

Concentración final: 1.2 mg/mL

#### Nivel 1 ( 60%)

Tomar una alícuota de 3mL de la solución stock, transferir a un matraz volumétrico de 20mL y llevar a volumen con agua destilada.

Concentración final: 0.18 mg/mL

#### Nivel 2 ( 80%)

Tomar una alícuota de 4mL de la solución stock, transferir a un matraz volumétrico de 20mL y llevar a volumen con agua destilada.



Concentración final: 0.24 mg/mL

Nivel 3 ( 100%)

Tomar una alícuota de 5mL de la solución stock, transferir a un matraz volumétrico de 20mL y llevar a volumen con agua destilada.

Concentración final: 0.30 mg/mL

Nivel 4 (120%)

Tomar una alícuota de 6mL de la solución stock, transferir a un matraz volumétrico de 20mL y llevar a volumen con agua destilada.

Concentración final: 0.36 mg/mL

Nivel 5 (140%)

Tomar una alícuota de 7mL de la solución stock, transferir a un matraz volumétrico de 20mL y llevar a volumen con agua destilada.

Concentración final: 0.42 mg/mL

**Criterio de aceptación:** El coeficiente de determinación de las curvas preparadas con las soluciones adicionadas de estándar no debe ser menor a 0.99

#### 4.4 Exactitud

Se realizarán tres preparaciones de placebos cargados con tres concentraciones diferentes en el rango de 70 al 130 % de la concentración teórica, y cada preparación se inyectará por triplicado, evaluándose el promedio y la desviación estándar relativa de las inyecciones replica de cada vial.

Nivel 1 (70%)

Pesar aproximadamente y con exactitud 4.2 mg del  $C_{19}H_{23}N_3O$  sustancia de referencia, transferir a un matraz de 20mL y disolver con 4mL de placebo, llevar a volumen con agua.

Concentración final: 0.21 mg/mL

Nivel 2 ( 100%)

Pesar aproximadamente y con exactitud 6.0 mg del  $C_{19}H_{23}N_3O$  sustancia de referencia,

transferir a un matraz de 20mL y disolver con 4mL de placebo, llevar a volumen con agua.

Concentración final: 0.30 mg/mL

Nivel 3 (130%)

Pesar aproximadamente y con exactitud 7.8 mg del  $C_{19}H_{23}N_3O$  sustancia de referencia, transferir a un matraz de 20mL y disolver con 4mL de placebo, llevar a volumen con agua.

Concentración final: 0.39 mg/mL

**Criterio de aceptación:** Los recobros obtenidos para cada una de los placebos cargados deberán encontrarse entre el 95 y el 105%.

## 4.5 Precisión y Precisión intermedia

### 4.5.1 Precisión (Repetibilidad)

La precisión o repetibilidad se evaluará analizando 6 muestras de producto terminado por un analista, en dos días diferentes analizando tres muestras por día, realizando tres inyecciones por cada muestra. (los datos serán tomados de la prueba de precisión intermedia)

**Criterio de aceptación:** La desviación estándar relativa sobre 6 determinaciones no debe exceder el 1.5 %

### 4.5.2. Precisión intermedia

La precisión intermedia se evaluará analizando 6 muestras de producto terminado por dos analistas, en dos días diferentes analizando tres muestras por día, realizando tres inyecciones por cada muestra.

Preparar soluciones de adecuación del sistema por día e intercalar estándares cada 6 muestras y al final de cada serie.

**Criterio de aceptación:** La desviación estándar relativa sobre las 12 determinaciones no debe exceder el 2.0 %.

## 4.6 Tolerancia

Se realizará cambiando la polaridad de la fase móvil y evaluando dos equipos diferentes (Waters y Agilent).

#### 4.6.1 Cambio en polaridad de fase móvil

Se analizarán tres muestras, las cuales se inyectarán con cada una de las fases móviles y se comparará los resultados con los obtenidos con la fase móvil normal.

Nivel (+)

Fase móvil

Acetonitrilo HPLC: 500mL  
Dodecilsulfato de sodio GR: 2.307 g  
Agua HPLC: 495 mL  
Acido acético GR: 5 mL

Nivel (-)

Fase móvil

Acetonitrilo HPLC: 600mL  
Dodecilsulfato de sodio GR: 2.307 g  
Agua HPLC: 395 mL  
Acido acético GR: 5 mL

#### Criterios de aceptación:

CONCEPTO	CRITERIO DE ACEPTACION
Coleo (T):	Entre 0.5 y 2.0 No se ve afectado sensiblemente ( $\pm 1$ min )
Tiempo de retención (TR):	y no se afecta la selectividad
K:	No debe haber una variación mayor del 50%
CV.:	No mayor del 2.0%

#### 4.6.2 Tolerancia al cambio de equipo

Se evaluará analizando muestras de producto terminado con mismos parámetros pero en dos equipos diferentes: Agilent y Waters; se realizará entre estos dos equipos ya que ambos son proveedores corporativos del laboratorio donde se realizó la prueba.

Preparar las muestra por triplicado e inyectar por duplicado en cada equipo, mismos

estándares, mismas muestras y fase móvil.

#### **Criterio de aceptación:**

CONCEPTO	CRITERIO DE ACEPTACION
Coleo (T):	Entre 0.5 y 2.0 No se ve afectado sensiblemente( $\pm 1$ min )
Tiempo de retención (TR):	y no se afecta la selectividad
K:	No debe haber una variación mayor del 50%
CV.:	No mayor del 2.0%

#### **4.7. Estabilidad de muestras y estándares**

La estabilidad de las muestras y los estándares se evaluará preparando 3 muestras y 2 referencias, los cuales serán analizados a las 24, 48, 72 y 96 horas. Las muestras y estándares se almacenarán a temperatura ambiente y en refrigeración; empleando las soluciones de referencia recientemente preparadas.

El % de variación se evaluará de la siguiente manera:

% Variación=  $Y_n - Y_o$       donde:

$Y_o$ = Área inicial

$Y_n = \sum A_{Mtra} / n_{Mtra}$

$Y_n$ = sumatoria del área de las muestra / número de muestras.

**Criterio de aceptación:** El % de recobro no debe presentar una variación mayor al 2 % con respecto al valor inicial.

#### **4.8 Límite de detección y cuantificación**

Inicialmente se prepararán 2 curvas de calibración de un rango entre 0.01% - 30%, es decir entre 0.00003 mg/mL y 0.09 mg/mL ; para la determinación del límite de detección y cuantificación. Las cuales servirán para determinar que concentración de la muestra corresponde a la señal obtenida por el pico más pequeño obtenido de la solución blanco

y/o placebo. Si no existieran picos integrables en la solución blanco y/o placebo se procederá a considerar la señal más alta obtenida del blanco.

Finalmente preparar por duplicado la solución correspondiente al límite de detección e inyectar por triplicado. Preparar 6 veces la solución correspondiente al límite de cuantificación e inyectar por duplicado

Solución stock 1

Pesar aproximadamente y con exactitud 60 mg de  $C_{19}H_{23}N_3O$  y disolver en agua hasta 20 mL.

Concentración final: 3 mg/ mL

Solución stock 2

5mL de la solución stock 1 se diluyen con agua hasta 50 mL

Concentración final: 0.3 mg/mL

Solución stock 1a

5mL de la solución de adecuación se diluyen con agua hasta 100ml

Concentración final =0.015 mg/mL

Nivel 1 (30%)

3mL de la solución stock 1 se diluyen con agua a 100 mL

Concentración final: 0.09 mg/mL.

Nivel 2 (20%)

2mL de la solución stock 1 se diluyen con agua a 100 mL

Concentración final: 0.06 mg/mL.

Nivel 3 (10%)

1mL de la solución stock 1 se diluyen con agua a 100 mL

Concentración final: 0.03 mg/mL.

Nivel 4 (5%)

5mL de la solución stock 2 se diluyen con agua a 100 mL

Concentración final: 0.015 mg/mL.

Nivel 5 (3%)

3mL de la solución stock 2 se diluyen con agua a 100 mL

Concentración final: 0.009 mg/mL.

Nivel 6 (2%)

1mL de la solución stock 2 se diluyen con agua a 50 mL

Concentración final: 0.006 mg/mL.

Nivel 7 (1%)

1mL de la solución stock 2 se diluyen con agua a 100 mL

Concentración final: 0.003 mg/mL.

Nivel 8 (0.05%)

10mL de la solución stock 1a se diluyen con agua a 100 mL

Concentración final: 0.0015mg/mL

Nivel 9 (0.2%)

4mL de la solución stock 1a se diluyen con agua a 100 mL

Concentración final: 0.0006 mg/mL

Nivel 10 (0.1%)

2mL de la solución stock 1a se diluyen con agua a 100 mL

Concentración final: 0.0003 mg/mL

Nivel 11 (0.05%)

10mL de la solución nivel 8 se diluyen con agua a 100 mL

Concentración final: 0.00015 mg/mL

Nivel 12 (0.02%)

2mL de la solución nivel 8 se diluyen con agua a 50 mL

Concentración final: 0.00006 mg/mL

Nivel 13 (0.01%)

2mL de la solución nivel 8 se diluyen con agua a 100 mL

Concentración final: 0.00003 mg/mL

#### **4.8.1.Limite de detección**

El límite de detección se calculará de acuerdo a lo estipulado en la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C. en donde indica que se calcula como 3 veces más alto que el pico del blanco.

$LD = 3 r$  donde:

LD= Limite de detección

.r= señal ruido

#### **4.8.2.Límite de cuantificación**

El límite de cuantificación se calculará de acuerdo a lo estipulado en la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C. en donde indica que se calcula como 10 veces más alto que el pico del blanco el cual se encuentra en el límite de detección.

$LC = 10 r$  donde:

LC= Limite de detección

.r= señal ruido

#### **Criterio de aceptación:**

Limite de detección: el coeficiente de variación de las inyecciones del nivel correspondiente al límite de detección deberá ser mayor al 10%.

Limite de cuantificación: El coeficiente de variación para las inyecciones del nivel correspondiente al límite de cuantificación deberá ser menor al 10%

## RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

### 5.1.Resultados

#### 5.1 Especificidad y selectividad

**Criterio de aceptación:** *Obtener los cromatogramas y verificar que la señal de las impurezas no interfieren con la señal del principio activo ( selectividad) . Es decir que el tiempo de retención de las impurezas sea diferente al Tiempo de retención del pico de interés; además de que la resolución mínima entre el pico de interés con respecto a cada una de las impurezas sea mayor a 1.5. Así como también verificar que ninguna señal correspondiente a los excipientes de la solución no interfiera con el pico de interés ( especificidad) .*

Las impurezas del activo fueron adicionadas tanto a muestras de placebo, producto y estándares, para observar que ningún pico obtenido interfiriera con el pico de interés.

Los cromatogramas representativos se muestran a continuación:

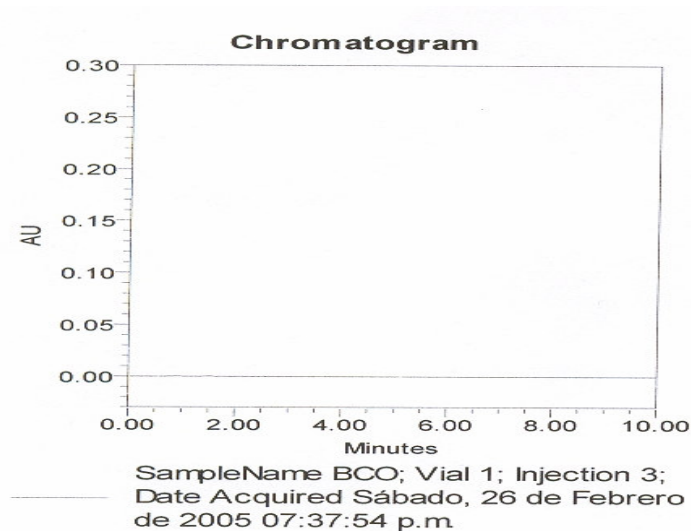


Fig. 7 Blanco



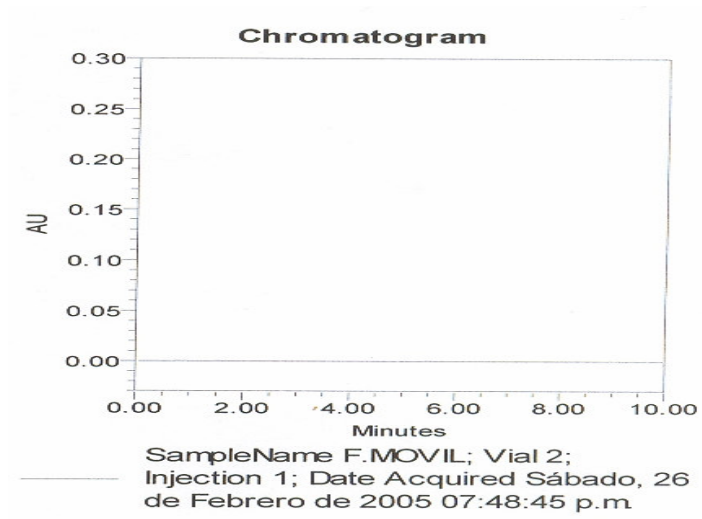


Fig. 8 Fase móvil.

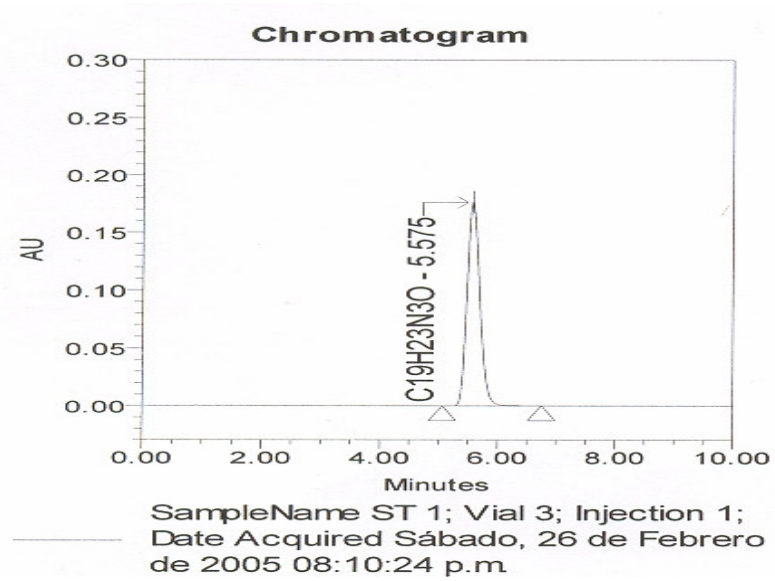
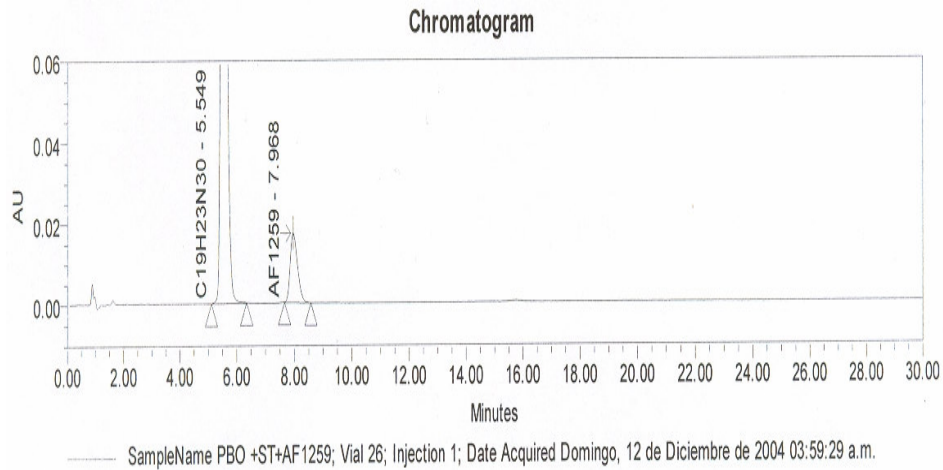
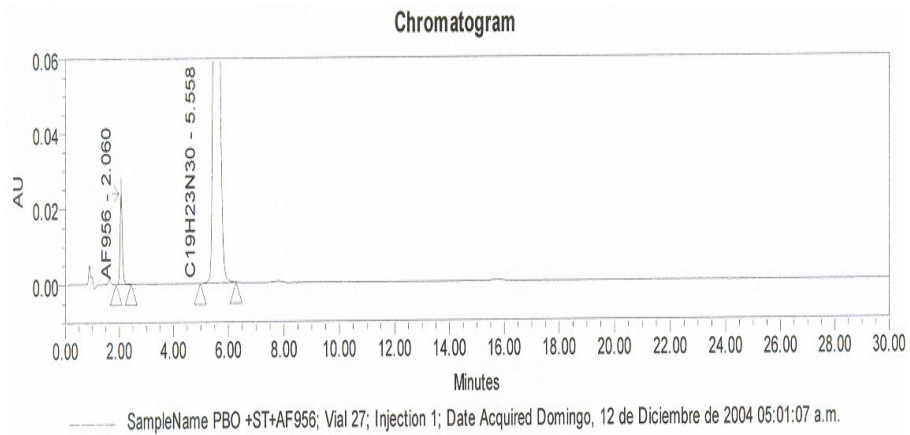


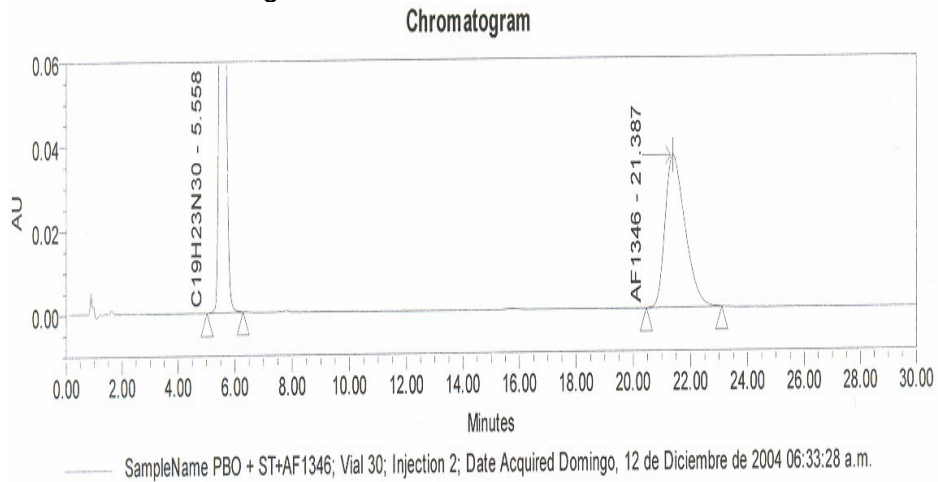
Fig. 9 Estándar



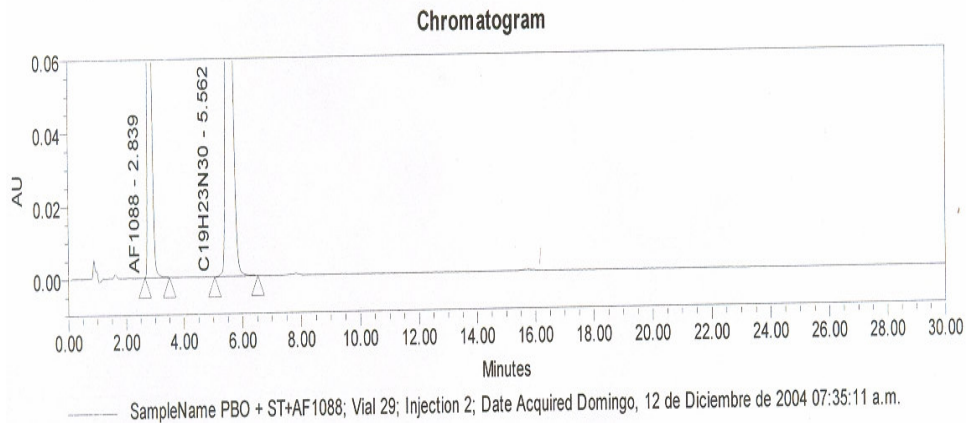
**Fig.10 Placebo + Estándar + AF1259**



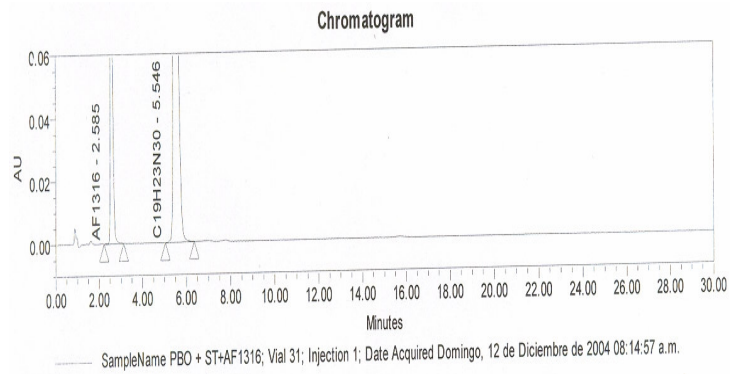
**Fig.11 Placebo + Estándar + AF956**



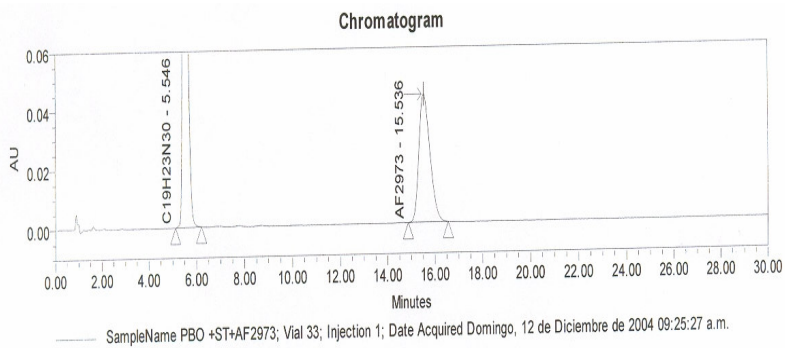
**Fig.12 Placebo + Estándar +AF1346**



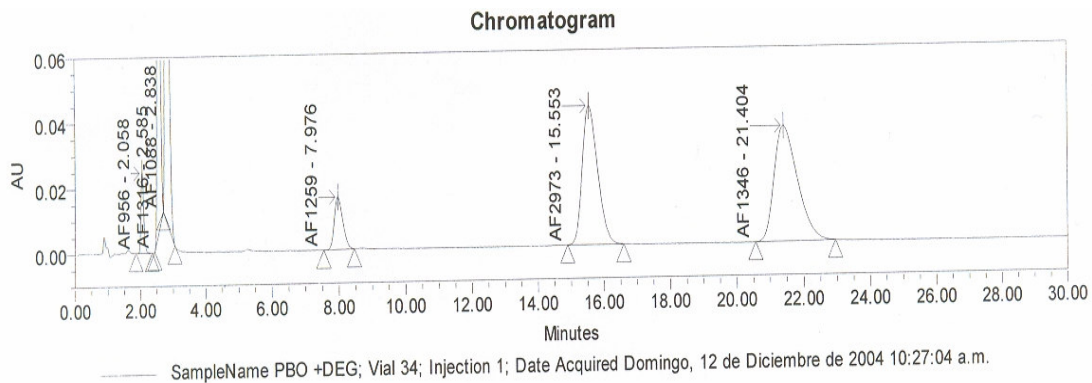
**Fig. 13 Placebo + Estándar + AF1088**



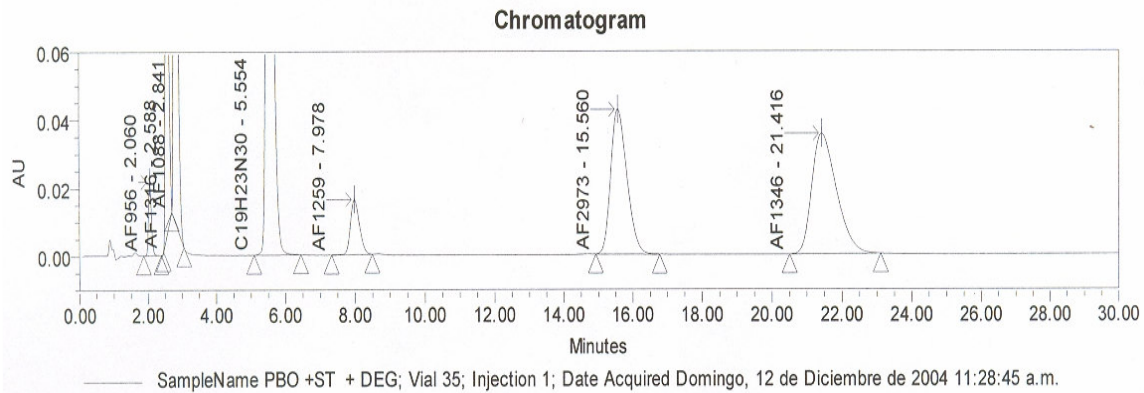
**Fig.14 Placebo + Estándar + AF1316**



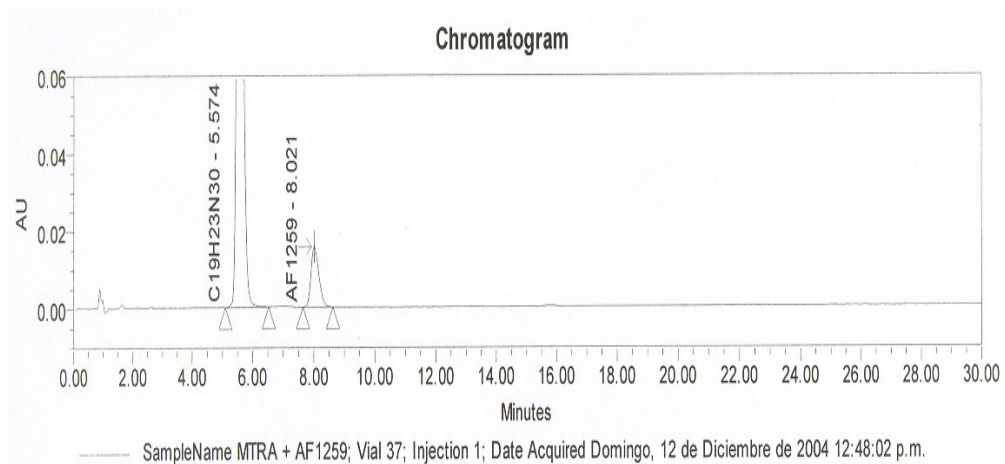
**Fig.15 Placebo +Estándar + AF2973**



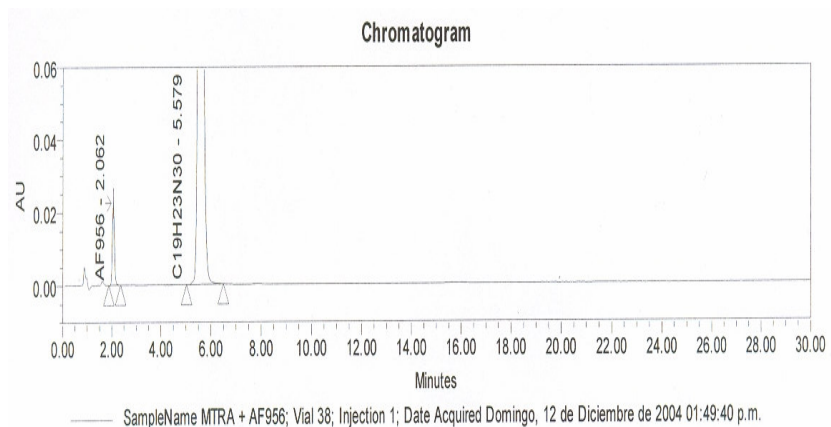
**Fig.16 Placebo + Degradaciones**



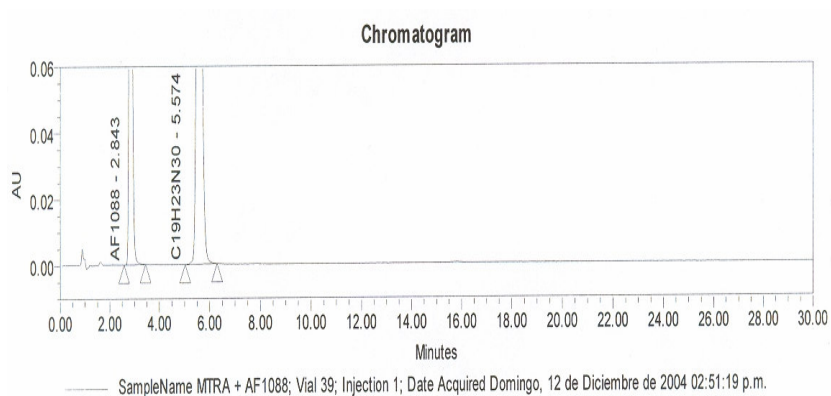
**Fig. 17 Placebo + Estándar + Degradaciones**



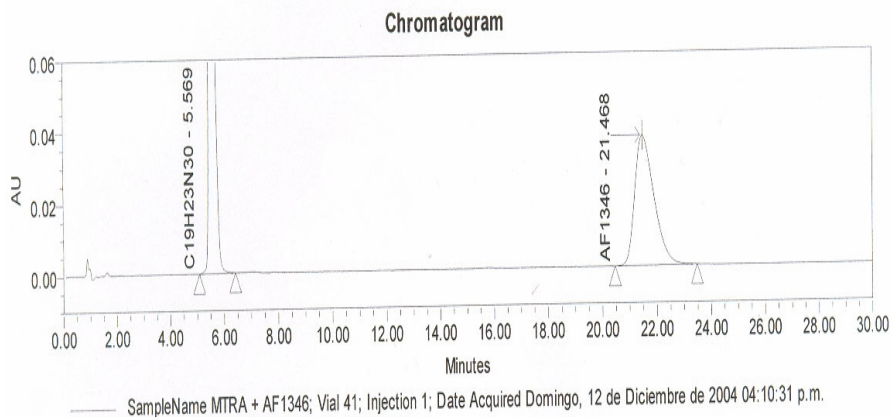
**Fig. 18 Muestra + AF1259**



**Fig. 19 Muestra + AF956**



**Fig. 20 Muestra + 1088**



**Fig. 21 Muestra + AF1346**

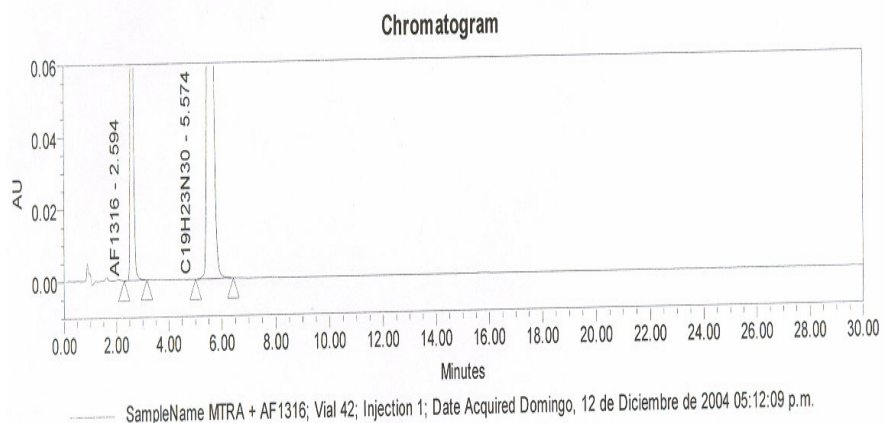


Fig. 22 Muestra + AF1316

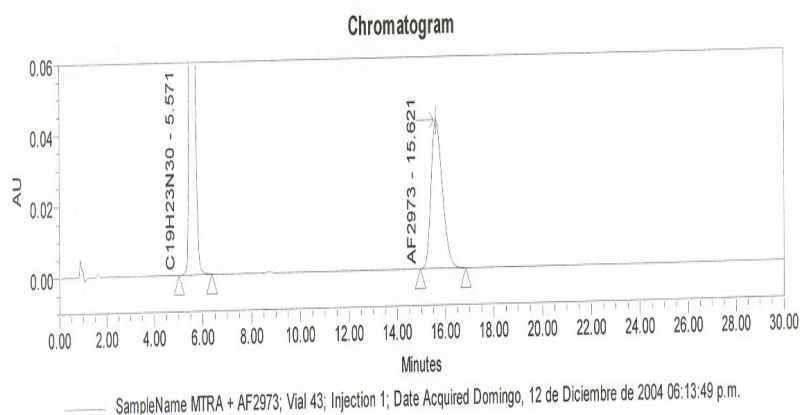


Fig. 23 Muestra + AF2973

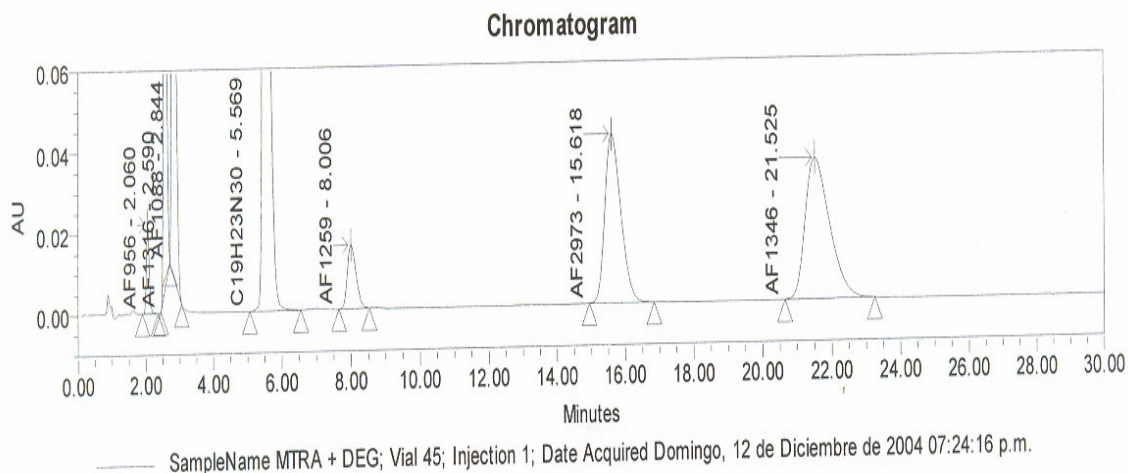


Fig. 24 Muestra + Degradaciones

SUSTANCIA	CLAVE	Tr (min)	Resolución (R)
-----------	-------	----------	----------------

C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O	----	5.6	---
1-benzyl-3-hydroxy-1H-indazole	AF 956	2.1	13.7
1-benzyl-2-3-(3-dimethylaminopropyl)-1,2-dihydro-3H-indazol-3-one, hydrochloride	AF 1088	2.8	9.7
2-benzylaminobenzoic acid, 3-dimethylaminopropylester, hydrochloride	AF 1259	8.0	5.8
2-aminobenzoic acid, 3-dimethylaminopropylester, hydrochloride	AF 1316	2.6	10.9
1-benzyl-3-[3-(3-dimethylaminopropyl)-3-methylaminopropoxy]-1H-indazole, dihydrochloride	AF 1346	21.5	18.9
N,N-dimethyl-3-[1,5-(dibenzyl)-1H-indazol-3-yl]oxy-1-propanamine, hydrochloride	AF 2973	15.6	16.2

Tabla 6 Resultados Especificidad

## 5.2. Linealidad del sistema

**Criterio de aceptación:** El coeficiente de determinación de las curvas preparadas con las soluciones adicionadas de estándar no debe ser menor a 0.99

La linealidad fue examinada en cinco niveles diferentes de concentración de la solución estándar en un rango de 60 a 140 %. Se prepararon dos diferentes curvas y cada nivel fue inyectado por duplicado. Los resultados son los siguientes:

Linealidad del $C_{19}H_{23}N_3O$				
Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Nivel %	Curva	Inyección	AREA
180	60	1	1	1606661
180	60		2	1604012
180	60	2	1	1597928
180	60		2	1595435
240	80	1	1	2143458
240	80		2	2143090
240	80	2	1	2132590
240	80		2	2136675
300	100	1	1	2673883
300	100		2	2665538
300	100	2	1	2692782
300	100		2	2695044
360	120	1	1	3214104
360	120		2	3202454
360	120	2	1	3210546
360	120		2	3205410
420	140	1	1	3708122
420	140		2	3693713
420	140	2	1	3731816
420	140		2	3713486

Tabla 7 Resultados de Linealidad del  $C_{19}H_{23}N_3O$

### 5.3.Exactitud

**Criterio de aceptación:** Los recobros obtenidos para cada una de los placebos cargados deberán encontrarse entre el 95 y el 105%.

Se realizaron tres preparaciones de placebos cargados con tres concentraciones diferentes en el rango de 70 al 130 % de la concentración teórica, y cada preparación se inyecta por triplicado, obteniéndose los siguientes porcentajes de los recobros.

#### Exactitud del $C_{19}H_{23}N_3O$

NIVEL	MUESTRA	INYECCION	%	PROMEDIO	CV
-------	---------	-----------	---	----------	----



70		100		130	
(%)	RECUBRO	(%)			
	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O				
1	102.08	1	99.13	1	99.24
2	101.87	2	99.12	2	99.25
3	101.90	3	98.44	3	99.26
1	101.60	1	101.02	1	100.54
2	101.59	2	101.42	2	100.57
3	100.77	3	100.86	3	100.50
1	99.20	1	99.42	1	100.45
2	98.79	2	99.08	2	100.91
3	98.58	3	98.42	3	100.03
	100.71		99.66		100.08
	1.4		1.1		0.7

Tabla 8 Resultados de Exactitud del C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O

#### 5.4. Precisión y Precisión intermedia

##### 5.4.1. Precisión

**Criterio de aceptación:** La desviación estándar relativa sobre 6 determinaciones no debe exceder el 1.5 %

Se tomaron los valores obtenidos de la Precisión intermedia del analista 1 los días 1 y 2 (seis muestras en total)

DIA	ANALISTA 1
	% Recobro

1	104.7
	103.0
	104.6
	103.7
	101.8
	102.1
	102.5
	102.0
2	101.9
	101.7
	100.6
	101.4
	101.1
	101.1
	101.0
	101.5
Promedio =	100.8
	101.0
	Des. Std. = 1.2
	DER = 1.3
	Min = 100.6
Max = 104.6	

Tabla 9 Resultados de Precisión

#### 5.4.2. Precisión Intermedia

**Criterio de aceptación:** La desviación estándar relativa sobre las 12 determinaciones no debe exceder el 2.0 %.

La precisión intermedia se evalúo analizando 6 muestras de placebo cargado, dos analistas en dos días diferentes analizando tres muestras por día, realizando tres inyecciones por cada muestra.

#### Precisión intermedia del $C_{19}H_{23}N_3O$

DIA	ANALISTA 1	ANALISTA 2
	% Recobro	% Recobro
1	104.7	104.8
	103.0	105.1
	104.6	103.7
	103.7	103.0
	101.8	103.2
	102.1	103.6
	102.5	103.0
	102.0	102.5

	101.9	102.8
	101.7	102.1
	100.6	102.1
	101.4	102.0
2	101.1	101.0
	101.1	101.7
	101.0	100.7
	101.5	101.4
	100.8	101.1
	101.0	101.2
Promedio =	102.3	
Des. Std. =	1.2	
DER=	1.3	
Min=	100.6	
Max=	105.1	

Tabla 10 Resultados de Precisión Intermedia

## 5.5. Límite de detección y cuantificación

### **Criterio de aceptación:**

Límite de detección: el coeficiente de variación de las inyecciones del nivel correspondiente al límite de detección deberá ser mayor al 10%.

Límite de cuantificación: El coeficiente de variación para las inyecciones del nivel correspondiente al límite de cuantificación deberá ser menor al 10%

### 5.5.1. Límite de detección

El límite de detección se calculó de acuerdo a lo estipulado en la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C. en donde indica que se calcula como 3 veces más alto que el pico del blanco.

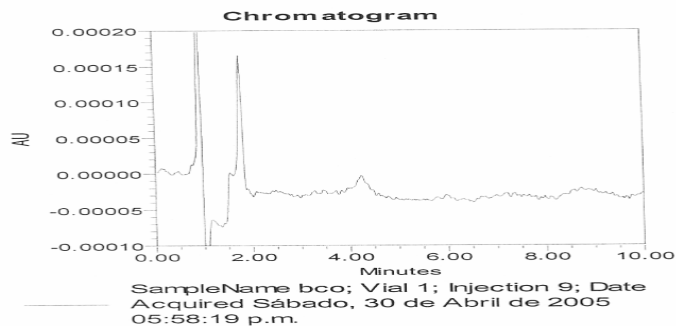


Fig. 25 Blanco

No se observan picos integrables, por lo que se procedió a calcular el límite de detección a partir de la señal más alta obtenida del blanco.

LD = 3 r donde:

LD= Límite de detección

.r= señal ruido = 0.0002 AU

LD= (3) X (0.0002) = 0.0006 AU \* = 0.00003 mg/mL

*\*Dato obtenido de las curvas preparadas en niveles de 0.01% al 30% del principio activo*

Finalmente se inyectaron por triplicado las dos soluciones preparadas con concentración de 0.00003 mg/mL ( Nivel 13 de la curva ) , para corroborar el límite de detección.

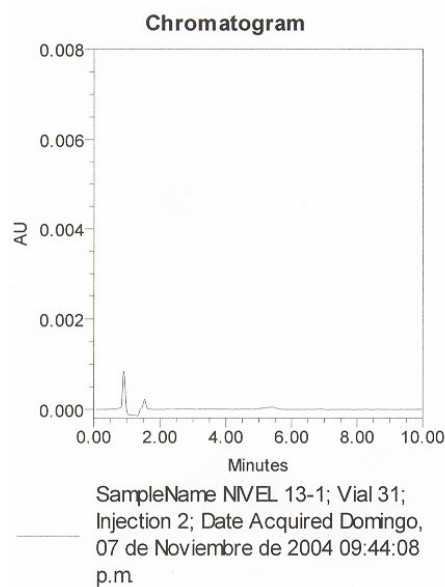


Fig. 26 Cromatograma del Límite de detección.

### 5.5.2. Límite de cuantificación

El límite de cuantificación se calculó de acuerdo a lo estipulado en la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C. en

donde indica que se calcula como 10 veces más alto que el pico del blanco el cual se encuentra en el límite de detección.

$LC = 3 r$  donde:

LC= Límite de detección

.r= señal ruido = 0.0002 AU

$LC = (10) \times (0.0002) = 0.002 \text{ AU} * = 0.0003 \text{ mg/ mL}$

*\*Dato obtenido de las curvas preparadas en niveles de 0.01% al 30% del principio activo.*

Finalmente se preparan por sexto duplicado la solución correspondiente a 0.0003 mg/mL (Nivel 10 de la curva) para corroborar el límite de detección)

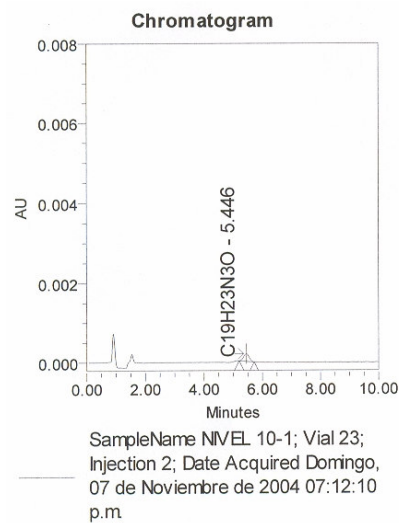


Fig. 27 Cromatograma del Límite de cuantificación

## 5.6.Tolerancia

### *Criterios de aceptación:*

<b>CONCEPTO</b>	<b>CRITERIO DE ACEPTACION</b>
<i>Coleo (T):</i>	<i>Entre 0.5 y 2.0</i>
<i>Tiempo de retención (TR):</i>	<i>No se ve afectado sensiblemente ( ±1min )</i>
	<i>y</i>
	<i>no se afecta la selectividad</i>
<i>K:</i>	<i>No debe haber una variación mayor del 50%</i>
<i>CV.:</i>	<i>No mayor del 2.0%</i>

Se realizó cambiando la polaridad de la fase móvil y evaluando la estabilidad de los estándares y muestras.

### 5.6.1. Cambios en proporción de fase móvil

FASE MOVIL	AREA PROMEDIO	TR	T	K	CV
NORMAL Dodecilsulfato sodio : 2.307 g Agua HPLC: 445mL Ácido acético: 5 mL Acetonitrilo: 550 mL	2677405	5.6	1.2	4.6	0.2
NIVEL (-) Dodecilsulfato sodio : 2.307 g Agua HPLC: 495mL Ácido acético: 5 mL Acetonitrilo: 500 mL	2688002	9.3	1.2	8.3	0.3
NIVEL (+) Dodecilsulfato sodio : 2.307 g Agua HPLC: 395mL Ácido acético: 5 mL Acetonitrilo: 600 mL	2653445	3.1	1.2	2.1	0.5

Tabla 11 Resultados Crudos de Cambios en la proporción de la fase móvil

CONCEPTO	RESULTADOS FASE MOVIL NORMAL	CRITERIO DE ACEPTACION	RESULTADO	
			CON 50 mL MENOS DE ACETONITRILO	CON 50 mL MAS DE ACETONITRILO
Coleo (T):	1.2	Entre 0.5 y 2.0	1.2	1.2
Tiempo de retención (TR):	5.6	No se ve afectado sensiblemente y no se afecta la selectividad	3.1	9.3
K:	4.6	No debe haber una variación mayor del 50%	18.0	4.6
CV.:	0.2	No mayor del 2.0%	0.3	0.5

Tabla 12 Resumen de resultados Cambios en la proporción de la fase móvil

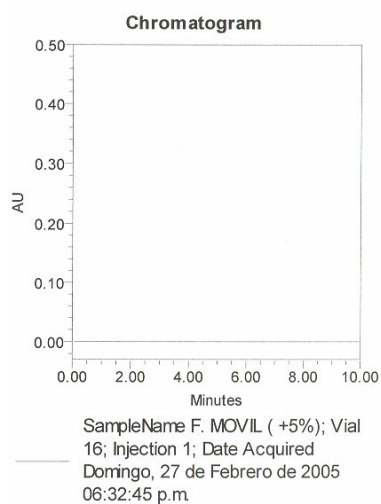


Fig. 28 Fase móvil (+ 50mL de fase orgánica )

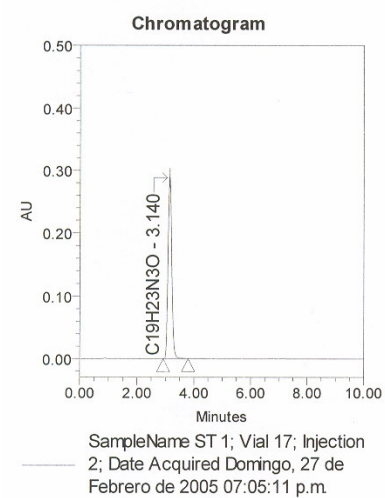


Fig. 29 Estándar (Fase móvil :+50mL de fase orgánica)

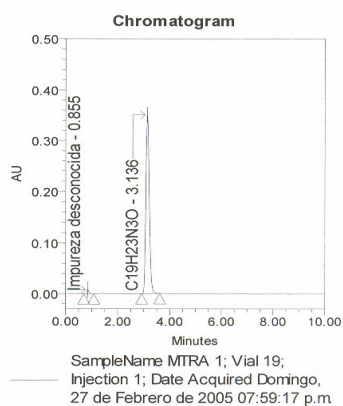


Fig. 30 Muestra (Fase móvil:+50mL de fase orgánica)

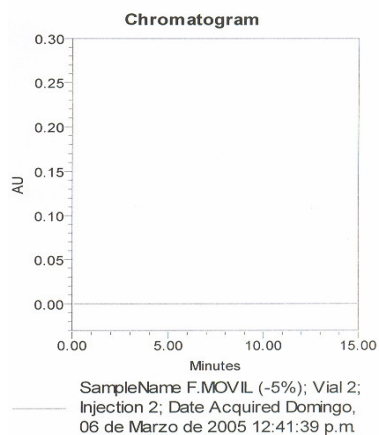


Fig. 31 Fase móvil: - 50 mL de fase orgánica



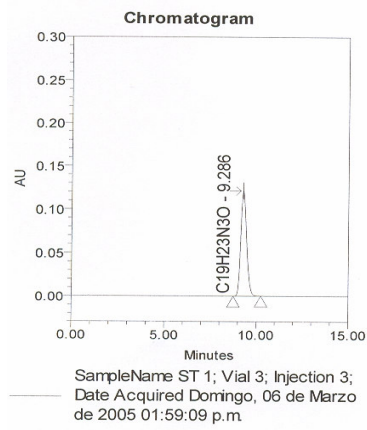


Fig. 32 Estándar (Fase móvil: - 50mL de fase orgánica)

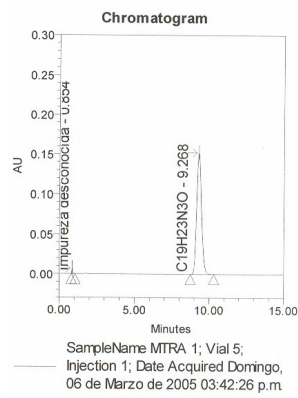


Fig. 33 Muestra (Fase móvil: - 50 mL de fase orgánica)

## 5.6.2. Estabilidad de estándares y muestras.

**Criterio de aceptación:** El % de recobro no debe presentar una variación mayor al 2 % con respecto al valor inicial.

La estabilidad de las muestras y los estándares se evalúa preparando 3 muestras y 2 referencias, los cuales fueron analizados a las 24, 48, 72 y 96 horas. Las muestras y estándares fueron almacenados a temperatura ambiente y en refrigeración.

TIEMPO	Temperatura ambiente	Refrigeración
	% Recobro	% Recobro
INICIO	100.3	---
	99.6	---
	100.3	---
	100.2	---
	100.3	---
	99.3	---
	100.0	---
24 HRS	101.0	100.7
	100.7	100.7
	101.0	101.1
	101.3	100.7
48 HRS	102.1	101.5
	101.4	101.5
	101.8	101.6
	101.7	101.4
72 HRS	100.2	100.2
	100.2	100.1
	100.2	100.2
	100.1	100.0
96 HRS	100.4	99.8
	100.5	99.8
	99.9	100.5
	100.5	99.8
Promedio	100.6	100.6
Desv. Standard	0.7	0.7

Tabla 13 Resultados de Estabilidad de estándares  $C_{19}H_{23}N_3O$

TIEMPO	Muestra	Temperatura ambiente	Refrigeración
		% Recobro	% Recobro
	1	101.3	---
	1	101.7	---
	2	102.3	---

<b>INICIO</b>	2	102.3	---
	3	106.7	---
	3	106.7	---
<b>24 HRS</b>	1	102.7	103.0
	1	102.3	102.1
	2	103.1	103.2
	2	102.6	103.1
	3	107.6	107.5
	3	106.8	107.9
<b>48 HRS</b>	1	103.6	103.1
	1	102.6	103.3
	2	103.7	103.5
	2	103.9	103.0
	3	108.4	108.3
	3	108.5	108.3
<b>72 HRS</b>	1	101.8	101.8
	1	101.8	102.2
	2	102.3	102.1
	2	101.5	102.2
	3	106.7	106.8
	3	105.8	106.9
<b>96 HRS</b>	1	101.8	102.4
	1	101.7	102.0
	2	102.5	102.7
	2	101.8	102.6
	3	107.0	107.2
	3	106.2	106.0
<b>Promedio</b>	1	102.1	102.5
<b>Promedio</b>	2	102.7	102.8
<b>Promedio</b>	3	107.0	107.4
<b>Desv. St.</b>	1	0.7	0.6
<b>Desv. St.</b>	2	0.7	0.5
<b>Desv. St.</b>	3	0.9	0.8

Tabla 14 Resultados de Estabilidad de muestras  $C_{19}H_{23}N_3O$

### 5.6.3. Tolerancia cambio de equipo

#### Criterio de aceptación:

CONCEPTO	CRITERIO DE ACEPTACION
Coleo (T):	Entre 0.5 y 2.0

Tiempo de retención (TR): No se ve afectado sensiblemente( ±1min ) y no se afecta la selectividad

K: No debe haber una variación mayor del 50%

CV.: No mayor del 2.0%

Se probaron dos equipos HPLC de dos marcas diferentes (Waters y Agilent)

FASE MOVIL	AREA PROMEDIO	TR	T	K	Rs	CV
HPLC No. 1. WATERS	2696118	6.20	1.1	7.9	NA	0.8
HPLC No. 3. AGILENT	2642.87145	6.20	1.1	*1 5.2	NA	0.2

Tabla 15 Resultados de Comparación entre equipos

\*1 Calculo de  $K = \frac{Tr - Tvo}{Tvo}$

### RESUMEN DE VALIDACION DE METODO ANALITICO

Cuantificación del C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O por HPLC en la prueba de contenido para una solución oro faríngea.  
 Prueba: Contenido  
 Método: HPLC

Parámetro Validado	Descripción del Estudio	Criterio de aceptación	Resultados	Cumple
Especificidad	Se adicionaron 5 degradaciones tanto a muestras, como a placebo y a estándares.	Obtener los cromatogramas y verificar que la señal de las degradaciones no interfieran con la señal del principio activo. Es decir que el Tr de las degradaciones sea diferente al Tr del pico de	No hay interferencia de picos con el pico de interés correspondiente al C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O	Si

		interés; además de que la resolución mínima entre el pico de interés con respecto a cada una de las impurezas sea mayor a 1.5.		
Linealidad	Se prepararon dos diferentes curvas con soluciones adicionadas de estándar en un rango de 60- 140%. Inyectando cada concentración por duplicado.	El coeficiente de determinación de las curvas preparadas con las soluciones adicionadas de estándar no debe ser menor a 0.99	( $r^2$ ) =0.999643 (m) = 8997.34 (b) =2297.404 rango de 60 a 140 % 180,240,300, 360 y 420 (µg/mL)	Si
Exactitud	Se prepararon muestras de placebo cargado a tres diferentes niveles de concentración del C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O (70 a 130 %)	Los recobros obtenidos para cada una de los placebos cargados deberán encontrarse entre el 95 y el 105%	Los recobros van de 98.4– 102.1 %	Si
Precisión (repetibilidad)	Se analizó una muestra por triplicado por un analista en dos días, teniendo un total de 6 determinaciones, se determinó Desviación estándar y DER.	La desviación estándar relativa (DER) sobre las 6 determinaciones no debe exceder el 1.5%	Desviación estándar DER: 1.3%	Si
Precisión intermedia	Se realizaron dos análisis por dos analistas en días diferentes, se determinó Desviación estándar y DER.	La desviación estándar relativa (DER) sobre las 12 determinaciones no debe exceder el 2.0%	Desviación estándar: DER: 1.3%	Si
Límite de detección	Se preparo 2 veces el límite de detección. Se realizó de acuerdo a la altura de los picos del blanco (método señal-ruido)	El coeficiente de variación de las inyecciones del nivel correspondiente al límite de detección deberá ser menor al 10%	- RSD Menor al 10% LD: 0.03 µg/mL	Si
Límite de cuantificación	Se realizó de acuerdo a la altura de los picos del blanco (método señal-ruido) Se preparo 6 veces el limite de cuantificación	El coeficiente de variación (RSD) para las inyecciones del nivel correspondiente al límite de cuantificación deberá ser menor al 10%	DL: 0.302µg/mL RSD: 1.4 %	Si
Tolerancia	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Variación de la preparación de fase Móvil (más fase orgánica)</li> <li>- Variación en la proporción de fase Móvil (menos fase orgánica)</li> </ul>	Coleo (T) : Entre 0.5 y 2.0.	Existe cambio significativo en el aumento de fase orgánica	No
		Tiempo de retención : No se ve afectado sensiblemente ( $\pm$ 1 min) y no se afecta la selectividad. K' : No debe haber una variación mayor del 50 %		Existe cambio significativo en la disminución de fase orgánica

	- Cambio de equipo	CV: No mayor del 2.0 %	No existen diferencias significativas entre los dos equipos evaluados.	Si
Adecuabilidad	La adecuabilidad del sistema se evaluará en cada una de las pruebas realizadas	$CV \leq 2.0\%$ $T_{\text{RETENCION}} = \text{Constante}$ $N > 1000$ $T \leq 2.0$ $K' \geq 2.0$	$CV < 2.0\%$ $T_{\text{RETENCION}} = 5.7 \text{ min.}$ $N = \text{aprox. } 2500$ $T = \text{aprox. } 1.2$ $K' = \text{aprox. } 4.0$	Si
Estabilidad de muestras y estándares	Se sometieron muestras y estándares a temperatura ambiente y en refrigeración	El % de recobro o debe presentar una variación mayor al 2.0% con respecto al valor inicial.	Las muestras y los estándares son estables 96 horas tanto almacenados a temperatura ambiente como almacenados en refrigeración	Si

## **5.7. Análisis de Resultados**

### **5.7.1 Especificidad y selectividad**

El resultado obtenido del análisis de la muestra placebo, la solución estándar y la muestra del producto terminado indica que los excipientes o sustancias auxiliares de la solución no interfieren con el principio activo ( ver cromatogramas en páginas 54 y 55) con estos resultados se demuestra la especificidad del método para su adecuada cuantificación al no obtener absorbancia de algún compuesto del placebo a la longitud de onda máxima del principio activo.

Aunque la especificidad y la selectividad se consideran términos equivalentes, estos son diferentes, considerando la selectividad como la capacidad de detectar simultánea o separadamente sustancias químicas diferentes presentes en una misma muestra y/o el mismo compuesto en sus diferentes estados de oxidación o enlazado a otra molécula, esta se estudió adicionando de manera deliberada a una muestra las degradaciones encontradas en la bibliografía tal como se observa en los cromatogramas de la páginas 55-60 no se encontraron picos que interfieran con la cuantificación del principio activo ( $C_{19}H_{23}N_3O$ ) y los picos correspondientes a las degradaciones adicionadas presentan

una resolución mayor a 2 con respecto al pico de interés , tal como se observa en la tabla 6 en página 61. La evaluación de este parámetro es especialmente importante en el caso de los métodos analíticos diseñados para la cuantificación del analito en formulaciones y en estudios de estabilidad ya que asegura que la sustancia de interés será cuantificada en la forma deseada así como también permite cuantificar los productos de degradación de la misma.

### 5.7.2. Linealidad del sistema

La curva de regresión se determinó sobre los puntos individuales sin promediar por el método de los mínimos cuadrados. En el eje de las "x" aparece la concentración del analito y en el eje "y", la respuesta analítica (área) los resultados son los siguientes:

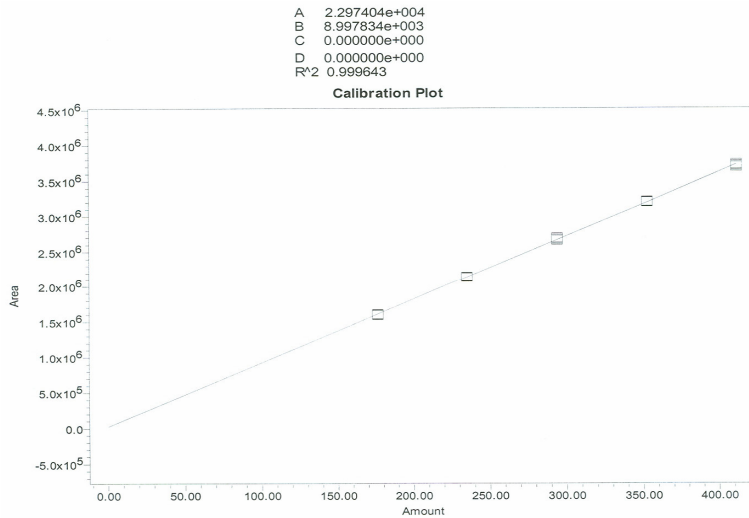


Fig. 34 Gráfica de Linealidad del Sistema

Al hacer el análisis estadístico de valores AREA vs. CONCENTRACION se observa que existe una relación estadísticamente significativa entre ambos y que el modelo que describe dicha relación se ajusta a una línea recta, cuya fórmula es la siguiente:

Pendiente (m) = 8997.34

Ordenada (b) = 2297.404

Coefficiente de determinación ( $r^2$ ) = 0.999643

El resultado de  $r^2$  mayor a 0.999 demuestra la adecuada linealidad de acuerdo con el límite establecido, por lo que se establece el cumplimiento de la linealidad en el intervalo de concentración estudiado.

### **5.7.3 .Exactitud**

En el rango seleccionado en el estudio de exactitud, los valores de porcentaje de recobro estuvieron dentro de los límites establecidos para los métodos espectrofotométricos (98-102 %) y los valores del coeficiente de variación para cada uno de los niveles de concentración estudiados resultaron ser menor que el 2 %.

#### **5.7.4.1. Precisión**

Se determino el CV entre las 6 determinaciones realizadas por un mismo analista en 2 días diferentes , el resultado fue un CV = 1.3% ( ver tabla 9 página: 64). Lo que indica que el método y el instrumento son precisos para la cuantificación del  $C_{19}H_{23}N_3O$ .

#### **5.7.4.2. Precisión intermedia ( reproducibilidad)**

Se determino el CV entre las 12 determinaciones realizadas por dos analistas en 2 días diferentes, el resultado fue un CV = 1.3% ( ver tabla 10 en página 64 ). Lo que indica que el método es reproducible ya que el área obtenida de las determinaciones presenta una variación mínima cuando el método es aplicado por dos analistas en distintos días.

#### **5.7.5. Límite de detección y límite de cuantificación**

El método analítico puede detectar 0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y puede cuantificar 0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $C_{19}H_{23}N_3O$ .

#### **5.7.6. Tolerancia**

##### **5.7.6.1. Cambio en la proporción de Fase móvil.**

La fase móvil no debe variarse en su composición y ser preparada el día de uso, ya que presento diferencias significativas en cuanto tiempo de retención del pico de interés, así como también variaciones en el factor de capacidad (Ver tabla 11 en página: 69). Esto indica que se debe ser muy riguroso en las medidas de los volúmenes de los solventes de la fase móvil, de modo de garantizar óptimos resultados.

##### **5.7.6.2. Tolerancia al cambio de equipo.**

Se observa que al no haber cambios significativos entre los valores obtenidos de tiempo de retención, Factor de coe y factor de capacidad (ver tabla 15 en página 76), por cada uno de los equipos, estos pueden ser utilizados indistintamente.

##### **5.7.6.3. Estabilidad de estándares y muestras.**

Se observa que tanto las muestras como los estándares son estables hasta por 96 hrs, ( Ver tabla 13 y 14 en páginas 74 y 75 ) ya sea en refrigeración o a temperatura ambiente.



## 5.8. ADECUABILIDAD

Antes de cada serie de medición, inyectar por quintuplicado la solución de comparación 1 y una vez la solución de comparación dos la DER deberá ser menor o igual a 2 %, intercalar inyecciones de estándar cada 6 muestras y al final de la serie la DER de todas las inyecciones deberá ser menor o igual a 2.0 %.

Inyectar las muestras por duplicado

## 5.9. CONCLUSION

El método analítico es específico y selectivo, ya que no existen picos que interfieran con el pico de interés.

Es lineal y exacto en el intervalo de 60 – 140 % y la precisión intermedia cumple con especificaciones.

Los estándares son estables por 96 horas después de haber sido almacenados a temperatura ambiente o en refrigeración.

Las muestras son estables por 96 horas después de haber sido almacenados a temperatura ambiente o en refrigeración.

Además tolera el cambio de equipo, ya que no existen diferencias significativas en los dos equipos utilizados (Waters y Agilent). No así el cambio de fase móvil, ya que al modificar esta se presentaron diferencias muy significativas.

Por lo tanto se concluye de acuerdo, a los resultados de la validación, que el Método Analítico empleado para cuantificar el AINE,  $C_{19}H_{23}N_3O$ , en una solución oro faríngea es confiable, reproducible, exacto y específico.

## CAPITULO 6

### BIBLIOGRAFIA

- 1) Clarke's Analysis of drug and poisons;  
edited by Anthony C. Moffat, M. David Osselton and Brian Widdop  
Third edition London, Chicago Pharmaceutical Press Vol. 1 ( 2004 )
- 2) British Pharmacopoeia, Volumen I  
Third edition of the European Pharmacopoeia 1997 as attended by supplement 2001
- 3) Martindale, "Guía completa de consulta Fármaco terapéutica",  
Primera edición, Pharma editores S.C.  
Barcelona (2003).
- 4) Rodolfo Rodríguez Carranza , " Vademécum Académico de Medicamentos" (VAM)  
Mc Graw-Hill Interamericana , México (1999 )
- 5) Diccionario de especialidades Farmacéuticas  
50ª edición editorial Thomson PLM (2004)
- 6) Vane JR." Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for  
aspirin-like drugs"  
Nature Biology (1971); 231:232-235
- 7) Runti C, Baiocchi L., "The chemistry of benzydamine"  
Int J Tissue React. (1985); 7(3):175-86. Review.  
PMID: 3899968 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- 8) Schoenwald RD, Kumakura T, Catanese B, "Pharmacokinetics of benzydamine"  
Int J Tissue React. (1987) ; 9(2):93-7.  
PMID: 3610518 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- 9) Chasseaud LF, Canatese B. "Pharmacokinetics of Benzydamine"  
Int J Tissue React. (1985); 7(3):195-204.  
PMID: 4044147 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- 10) Koppel c., Tenczer J ; "Metabolism of benzydamine"  
Arzneimittelforschung. (1985); 35(3):634-5.  
PMID: 4039589 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- 11) Lachman Leon, Lieberman Herbert and Kanig Joseph, " The theory and Practice  
of Industrial Pharmacy",  
Third edition, LEA & FEBIGER  
PHILADELPHIA (1986 ).

- 12) Remington, "The science and Practice of Pharmacy"  
20Th edition, Philadelphia Collage of Pharmacy and Science (2000)
- 13) Correa Salde, Solá N, "Los Medicamentos Vencidos",  
Boletín informativo No 9, Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad de Córdoba, Noviembre (2001)  
<http://www.fcq.unc.edu.ar/cime/vencimientosII.htm>
- 14) Yost R. W. Eltre L.S. "Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica",  
De Perkin Elmer (1)  
México, (1980)
- 15) García de Marina A; Del Castillo B., "Cromatografía Líquida de Alta Resolución",  
Editorial Limusa  
México, D.F., (1988)
- 16) Zinder L.R.; Kirkland J. L., "Introduction to Modern Liquid Chromatography",  
Second edition, John Willey & Sons, Inc.  
USA, 1974
- 17) Luz María Lara, "Sesiones de cromatografía",  
Waters S.A. de C.V.
- 18) The United States Pharmacopoeia, USP XXIV, (1999).
- 19) GUIA DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS,  
Editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.,  
México, (2002).
- 20) Hobart. H. Willard, Lynne L. Merrit, Jr. John A. Dean, Frank A. Settle, Jr  
"Métodos Instrumentales de análisis",  
Grupo Editorial Iberoamericana, S. A. de C. V.  
México (1991)
- 21) R.A. Day Jr., A.L. Underwood "Química Analítica Cuantitativa"  
Prentice-Hall Hispanoamericana 5° edición  
México
- 22) Hokanson, C.  
"A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical  
product development, Part I The initial method process. "  
Pharmaceutical Technology 18 (9), 118-130, (1994)

- 23) Hokanson, C. "A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development", Part II Changes and the need for additional validation"  
Pharmaceutical Technology 18 (10), 92-100, (1994).
- 24) Guerra, J. "Validation on analytical methods by FDA laboratories"  
Pharmaceutical Tecnology 10 (3), 74-84, (1986 ).
- 25) Guidance for Industry: Text on Validation of Analytical Procedures.  
ICH-Q2A, March (1995 ).
- 26) Guidance on the Validation of Analytical Procedures; Methodology; Availability;  
Notice ICH Q2B.
- 27) Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods. CDER. November  
(1994 ), CMC 3
- 28) "Procedimiento para Validar y Reportar Métodos Analíticos Código S24-001-4 "  
Boehringer- Ingelheim-Promeco.
- 29)Leowski J. "Mortality from acute respiratory infections in children under five years  
of age: global estimates" World Health Stat Q (1986 );39:138-44.
- 30)Valdespino JL, García MA. "Consideraciones clinico-epidemiologicas de las  
infecciones respiratorias agudas y crónicas" En: García ML, Giono S, Pacheco CR,  
Escobar A, Valdespino JL, ed. Infecciones respiratorias agudas y crónicas. México  
D.F. INDRE, SSA 1994:107-25.
- 31)Secretaria de Salud. Dirección General de Epidemiología. Encuesta Nacional  
Epidemiológica 1987-1988, México D.F, 1990.
- 32) Martínez MC, Muñoz O, Peniche A, Ramírez ME, Gutiérrez G. " Infecciones  
respiratorias agudas en comunidades rurales mexicanas". Archiv Invest Med  
1989;20:255-62.