



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

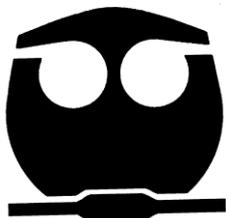
**EVALUACIÓN DE LOS PERFILES DE DISOLUCIÓN DE UN
PRODUCTO QUE CONTIENE HIDROCLOROTIAZIDA,
LOSARTAN Y AMLODIPINO EN UN MEDIO
BIORRELEVANTE**

TESIS

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

PRESENTA

ERANDI LOREDO VÁZQUEZ



MÉXICO, D.F.

2010



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: Profesor: Helgi Helen Jung Cook
VOCAL: Profesor: Juan Manuel Rodríguez
SECRETARIO: Profesor: Luis Jesús García Aguirre
1er. SUPLENTE: Profesor: Kenneth Rubio Carrasco
2° SUPLENTE: Profesor: Roberto Carlos Cañas Alonso

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 112 y 113, Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

Asesor del tema

Helgi Helen Jung Cook

Supervisor Técnico

M en C. María de Lourdes Mayet Cruz

Sustentante

Erandi Loredo Vázquez

Agradecimientos

A la UNAM y la Facultad de Química, que me dio la oportunidad y el privilegio de estudiar en sus aulas.

A mi tutora la Dra. Helgi Jung Cook por su infinita paciencia y toda la experiencia, y conocimientos compartidos. Sus orientaciones y recomendaciones fueron siempre un aprendizaje puntual. Sin su apoyo este estudio no hubiera culminado exitosamente. Mi reconocimiento a su calidad humana, que será mi principal motivación para tener una honesta y comprometida vida profesional.

A mis sinodales el M. en C. Luis García Aguirre y al M. en C Juan Manuel Rodríguez por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y a los comentarios y sugerencias que aportaron para la mejoría del mismo.

A mis padres por su infinita paciencia y comprensión, por su apoyo incondicional y sus siempre presentes consejos y sabiduría. Por la educación que me dieron desde pequeña, por los pequeños detalles que simplemente hicieron la diferencia. Por convertirme en la persona que soy ahora, darme la fuerza para seguir con mi camino y mostrarme que con voluntad no hay imposibles. Gracias mamá y papá... este trabajo, mis logros pasados, presentes y futuros siempre serán para ustedes, porque nada de esto sería posible sin su cariño y amor.

A mi hermana Araceli, quien siempre me ha acompañado en mi vida familiar y estudios, compartiendo siempre nuestros retos y vivencias en nuestra formación profesional

A toda mi familia, por los momentos tan agradables que hemos pasado juntos, que aunque no han sido tantos como me hubiera gustado, les agradezco todas las actividades, tradiciones, festividades y las implicaciones de formar parte de ustedes, que poco a poco me han formado.

A cada uno de mis amigos, que han influido de forma significativa en mi vida, a todos aquellos que han sido fuente de admiración y de inspiración. Quiero agradecerles a todos sus locuras, las risas y los excelentes momentos.

A todos los integrantes de biofarmacia del laboratorio 112 y 113 ya fueran alumnos o profesores que pusieron aunque de manera inconsciente un grano de arena para sacar las cosas adelante y para la terminación de este trabajo, porque todos los momentos que parecían difíciles los hicieron divertidos. Porque todo ese trabajo de laboratorio simplemente no hubiera sido lo mismo sin todos ustedes.

A Landsteiner Scientific quien proporcionó los materiales y materia prima para el desarrollo de este proyecto.

INDICE GENERAL

Abreviaturas	ix
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
2. GENERALIDADES	4
2.1 Disolución	5
2.1.1 Prueba de disolución.....	5
2.1.2 Objetivo e Importancia de la disolución.....	6
2.1.3 Consideraciones importantes para la disolución	7
2.2 Sistema de Clasificación Biofarmacéutico	10
2.2.1 Solubilidad y Permeabilidad.....	11
2.2.2 Características de los fármacos bajo la clasificación del BCS	11
2.2.2.1 Clase I	11
2.2.2.2 Clase II	12
2.2.2.3 Clase III	13
2.2.2.4 Clase IV	13
2.3 Correlación in vivo/in vitro (IVIVC)	14
2.4 Medios Biorrelevantes	16
2.4.1 Utilidad de los medios biorrelevantes.....	16
2.4.2 Condiciones Fisiológicas presentes en el tracto gastrointestinal.	17
2.4.2.1 Composición luminal del tracto gastrointestinal.....	17
2.4.2.1.1 pH	17
2.4.2.1.2 Tensoactivos	18
2.4.2.1.3 Enzimas	19
2.4.2.1.4 Volumen.....	19
2.4.2.2 Hidrodinamia en el tracto gastrointestinal.....	20
2.4.2.2.1 Patrones de mezclado en el intestino	20
2.4.2.2.2 Tiempo de residencia en el intestino delgado	20
2.4.3 Adaptación del medio biorrelevante a las condiciones fisiológicas ...	20
2.4.4 Formulación de un medio biorrelevante a partir de la simulación del medio Intestinal.....	21

2.4.5 Tipos de medios biorrelevantes	22
2.4.5.1 FaSSIF	22
2.4.6 Selección del medio biorrelevante a utilizar	23
2.5 Hipertensión	23
2.6 Terapia en combinación	24
2.7 Uso de Losartan/Hidroclorotiazida en combinación vs.Monoterapia	25
2.8 Uso de Losartan/Hidroclortiazida vs. Amlodipino/Hidroclorotiazida	25
2.9 Uso de Losartan/Amlodipino en ratas	25
2.10 Monografías de los principios activos	26
2.10.1 Monografía del Losartan	26
2.10.2 Monografía de la Hidroclorotiazida	30
2.10.3 Monografía del Amlodipino	34
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	39
3.1 Equipos, reactivos y sustancias utilizadas	40
3.2 Preparación de soluciones	42
3.2.1 Solución amortiguadora de fosfatos pH6.5 (blanco de Fassif)	42
3.2.2 Medio biorrelevante Fassif	42
3.2.3 Solución de trietilamina pH 3	42
3.3 Determinación de las condiciones cromatográficas para la cuantificación de los analitos de interés	43
3.3.1 Condiciones cromatográficas finales	45
3.4 Uniformidad de contenido para la evaluación del producto piloto	45
3.5 Validación del método analítico para la cuantificación del producto en medio biorrelevante Fassif	47
3.5.1 Validación del sistema	47
Preparación de la curva de calibración	47
Preparación de soluciones estándar de los tres analitos	47
3.5.1.1 Linealidad del sistema	50
3.5.1.2 Precisión del Sistema (repetibilidad)	49
3.5.2 Validación del Método	51
Preparación de la curva de calibración	51

3.5.2.1 Linealidad del Método	51
3.5.2.2 Precisión del método.....	52
3.5.2.3 Exactitud del Método.....	52
3.5.2.4 Estabilidad	53
Temperatura ambiente en el cromatógrafo/12h; Refrigeración/12h.....	53
Temperatura en baño a 37°C/120min.....	53
3.5.2.5 Influencia del Filtro	54
3.5.2.6 Selectividad.....	54
3.6 Determinación de dureza de las tabletas del producto piloto	55
3.7 Evaluación del Perfil de disolución	55
3.7.1 Condiciones de la disolución y del disolutor.....	56
4 RESULTADOS: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	57
4.1 Determinación de condiciones cromatográficas	58
4.1.1 Condiciones cromatográficas finales.....	64
4.2 Uniformidad de contenido para la evaluación del producto piloto.....	64
4.3 Validación del método analítico para la cuantificación del producto en medio biorrelevante Fassif.	65
4.3.1 Validación del sistema	65
4.3.1.1 Linealidad del sistema y Precisión del Sistema (repetibilidad)	65
4.3.2 Validación del Método.....	69
4.3.2.1 Linealidad y repetibilidad del Método.....	69
4.3.2.2 Precisión (reproducibilidad) del método	72
4.3.2.3 Exactitud del Método.....	74
4.3.2.4 Estabilidad	75
Temperatura ambiente en el cromatógrafo/4h; Refrigeración/12h.....	76
Temperatura en baño a 37°C/120min.	77
4.3.2.5 Influencia del Filtro	79
4.3.2.6 Selectividad.....	79
4.4 Determinación de dureza de las tabletas presentes en el producto piloto.....	81
4.5 Perfiles de disolución.....	82
4.5.1 Perfil de disolución del producto piloto.....	82

4.5.2 Perfiles de disolución de los productos comerciales	84
4.5.2.1 Perfil de disolución del producto NORVAS	84
4.5.2.2 Perfil de disolución del producto HYZAAR	86
4.6 Comparación de Perfiles de disolución.....	88
4.7 Cinéticas de disolución	91
5 CONCLUSIONES	93
6 BIBLIOGRAFÍA.....	95

INDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Parámetros fisicoquímicos y fisiológicos importantes para la disolución del fármaco en el tracto gastrointestinal	8
Tabla 2	Valores de pH presentes en el intestino	18
Tabla 3	Concentraciones de sales biliares presentes en el intestino delgado humano en el estado de ayuno.	19
Tabla 4	Composición del medio biorrelevante utilizado para simular el estado de ayuno. (FaSSIF)	23
Tabla 5	Propiedades Fisicoquímicas del Losartan potásico	27
Tabla 6	Propiedades Fisicoquímicas de la hidroclorotiazida	30
Tabla 7	Propiedades Fisicoquímicas del amlodipino	35
Tabla 8	Condiciones cromatográficas reportadas para la cuantificación de los analitos de interés	44
Tabla 10	Comparación en base a la proporción de fase orgánica/fase acuosa de la fase móvil	59
Tabla 11	Comparación en base a la proporción de fase orgánica/fase acuosa de la fase móvil	60
Tabla 12	Comparación en base a la proporción de fase orgánica/fase acuosa de la fase móvil	61
Tabla 13	Comparación en base al tipo de solución amortiguadora utilizada y el pH del mismo	63
Tabla 14	Contenido % presente del principio activo en el producto piloto	65
Tabla 15	Linalidad y precisión del sistema para cuantificar Hidroclorotiazida	65
Tabla 16	Linalidad y precisión del sistema para cuantificar Losartan potásico	66
Tabla 17	Linalidad y precisión del sistema para cuantificar besilato de Amlodoipino	67
Tabla 18	Linealidad y Repetibilidad del método para la cuantificación de la Hidroclorotiazida	69
Tabla 19	Linealidad y Repetibilidad del método para la cuantificación de Losartan potásico	70
Tabla 20	Linealidad del método para la cuantificación de Besilato de Amlodipino	71
Tabla 21	Reproducibilidad del método para la cuantificación de Hidroclorotiazida	73
Tabla 22	Reproducibilidad del método para la cuantificación de Losartan potásico	73

Tabla 23	Reproducibilidad del método para la cuantificación de Besilato de Amlodipino	73
Tabla 24	Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método para la cuantificación de Hidroclorotiazida	74
Tabla 25	Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método para la cuantificación de Losartan potásico	74
Tabla 26	Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método para la cuantificación de Besilato de Amlodipino	74
Tabla 27	Estabilidad de las muestras a temperatura ambiente	76
Tabla 28	Estabilidad de las muestras almacenadas en refrigeración	76
Tabla 29	Estabilidad de los estándares a 37°C	78
Tabla 30	Evaluación de la influencia del filtro en los tres analitos de interés.	79
Tabla 31	Dureza de las tabletas presentes en las cápsulas	81
Tabla 32	Cantidad disuelta de Losartan potásico en el medio biorrelevante	82
Tabla 33	Cantidad disuelta de Besilato de Amlodipino, en el medio biorrelevante	82
Tabla 34	Cantidad disuelta de Besilato de Amlodipino, producto innovador, en el medio biorrelevante	84
Tabla 35	Comparación entre el perfil de disolución obtenido con diferentes medios de disolución del producto innovador NORVAS.	86
Tabla 36	Cantidad disuelta de Losartan potásico en combinación con hidroclorotiazida, producto innovador, en el medio biorrelevante	87
Tabla 37	Cantidad disuelta de Hidroclorotiazida en combinación con Losartan potásico, producto innovador, en el medio biorrelevante	87
Tabla 38	Valores de Ainf y K obtenidos al ajustar a la ecuación de primer orden el porcentaje disuelto del losartán presente en el producto piloto	92

INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Esquema de disolución de una forma farmacéutica.	5
Figura 2	Sistema de Clasificación Biofarmacéutico	10
Figura 3	Procedimiento para la preparación de la curva de calibración	49
Figura 4	Cromatograma de los tres fármacos (LSK, AMD, HCTZ) utilizando las condiciones cromatográficas elegidas	64
Figura 5	Linealidad del Sistema para la cuantificación de hidroclorotiazida en medio FaSSIF	66
Figura 6	Linealidad del Sistema para la cuantificación losartán potásico en medio FaSSIF	67
Figura 7	Linealidad del Sistema para la cuantificación besilato de amlodipino en medio FaSSIF	68
Figura 8	Linealidad del método para la cuantificación de hidroclorotiazida en medio biorrelevante	70
Figura 9	Linealidad del método para la cuantificación de losartán potásico en medio biorrelevante	71
Figura 10	Linealidad del método para la cuantificación de besilato de amlodipino en medio biorrelevante	72
Figura 11	Estabilidad de las muestras bajo diferentes condiciones de almacenamiento	77
Figura 12	Estabilidad del estándar en baño a 37°C	78
Figura 13	Cromatogramas de las diferentes soluciones inyectadas al cromatógrafo para evaluar la interferencia entre los componentes del producto piloto, la fase móvil y el medio biorrelevante en los 3 analitos de interés	80
Figura 14	Perfiles de disolución del losartán potásico presente en el producto piloto	82

Figura 15	Perfiles de disolución del besilato de amlodipino presente en el producto piloto	83
Figura 16	Perfil de disolución Amlodipino, producto innovador	85
Figura 17	Perfil de disolución de amlodipino en diferentes medios de disolución.	86
Figura 18	Perfil de disolución del losartán potásico y de hidroclorotiazida presente en el producto comercial Hyzaar	88
Figura 19	Perfiles de disolución del losartán presente en medicamentos diferentes	89
Figura 20	Perfiles de disolución del amlodipino presente en medicamentos diferentes	89
Figura 21	Perfiles de disolución de hidroclorotiazida presente en medicamentos diferentes	90
Figura 22	Cinética de disolución para el losartán presente en el producto piloto en medio biorrelevante ajustada a la ecuación de primer orden	92

ABREVIATURAS

SBP	Presión arterial sistólica
DBP	Presión arterial diastólica
ISH	Hipertensión sistólica
ECA	Enzima convertidora de Angiotensina
mmHg	milímetros de mercurio
mg	Miligramos
Kg	Kilogramo
µg	Microgramos
mL	Mililitro
L	Litro
mM	Milimolar
NOM	Norma Oficial Mexicana
BCS	Sistema de clasificación biofarmacéutico
FDA	Food and Drug Administration
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
SGF	Fluido que simula el estado de ayuno en el estómago
FaSSIF	Fluido que simula el estado de ayuno en el intestino delgado
FeSSIF	Fluido que simula el estado postprandial en el intestino delgado
LSK	Losartan potásico
AMD	Amlodipino
HCTZ	Hidroclorotiazida
ERR%	Error relativo debido a la regresión
DEA%	Desviación estándar absoluta
CV%	Coficiente de variación
r^2	Coficiente de determinación
m	Pendiente
b	Ordenada al origen

rpm	Revoluciones por minuto
ACN	Acetonitrilo

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El Sistema de clasificación biofarmacéutico (BCS) fue descrito en 1995 y desde entonces sus principios han sido utilizados en varias guías por la FDA.

Este sistema clasifica a los fármacos de acuerdo a sus propiedades de disolución y solubilidad, así como su capacidad de permear la membrana. El objetivo de este sistema es predecir el desempeño *in vivo* de los fármacos a partir de determinaciones de permeabilidad y solubilidad *in vitro*. De esta forma, ayuda a evaluar qué medicamentos, de acuerdo a su clasificación, pueden encontrarse exentos de estudios de bioequivalencia *in vivo*, y simplemente ser sustituidos por pruebas de disolución *in vitro*.⁽²²⁾

El desempeño *in vivo* de los fármacos administrados oralmente, depende de su solubilidad y de la permeabilidad a los tejidos. Cuando la disolución es el paso limitante, las pruebas de disolución *in vitro* pueden utilizarse para predecir la biodisponibilidad y demostrar la intercambiabilidad entre medicamentos.

El medio de disolución elegido para evaluar una forma farmacéutica debe ser capaz de reflejar las condiciones *in vivo* para alcanzar así una mejor correlación *in vivo/in vitro*. Con el propósito de semejar las condiciones intestinales se han diseñado 2 medios de disolución: uno simula las condiciones de ayuno, y el otro las condiciones después del consumo de alimentos, ambos en el intestino delgado. Estos medios pueden ser utilizados en la evaluación y desarrollo de fármacos, así como para aspectos regulatorios.⁽⁷⁾

Con base en lo anteriormente mencionado, el propósito de esta investigación fue la evaluación de los perfiles de disolución de un producto piloto antihipertensivo que contiene losartán, hidroclorotiazida y amlodipino en un medio biorrelevante que simula las condiciones de ayuno en el intestino delgado. Para lograr dicho propósito, se

desarrolló un método por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para cuantificar de forma simultánea los tres analitos presentes en el medicamento piloto. El método se validó de acuerdo a los lineamientos establecidos en la NOM-177-SSA1-1998 y se compararon los perfiles de disolución del medicamento piloto con respecto a los productos comerciales.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar los perfiles de disolución de un producto piloto conteniendo losartán, hidroclorotiazida y amlodipino, utilizando como medio de disolución un medio biorrelevante que simula las condiciones de ayuno.

Comparar los perfiles del producto piloto con respecto a los perfiles del producto innovador de amlodipino y del producto innovador de losartán/hidroclorotiazida en combinación.

Objetivos Particulares

Desarrollar las condiciones cromatográficas para cuantificar losartán, hidroclorotiazida y amlodipino por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Validar el método cromatográfico desarrollado de acuerdo a los parámetros establecidos en la NOM-177-SSA1-1998.

Realizar los perfiles de disolución en un medio biorrelevante del producto piloto y de los productos innovadores que contienen amlodipino (Norvas) y losartán/hidroclorotiazida en combinación (Hyzaar).

2. GENERALIDADES

2.1 DISOLUCIÓN

La disolución es el proceso mediante el cual un soluto se distribuye homogéneamente en un medio o disolvente.

La velocidad de disolución se define como la cantidad de ingrediente activo presente en una forma farmacéutica que se disuelve por unidad de tiempo bajo condiciones estandarizadas de interfase líquido/sólido, temperatura y composición del medio y agitación. ^(2,25)

2.1.1 Prueba de disolución

La prueba de disolución determina la cantidad de fármaco que llega a la solución en función del tiempo. La disolución del fármaco a partir de la forma farmacéutica implica al menos dos pasos consecutivos: la liberación del fármaco a partir de la forma farmacéutica (desintegración), seguido de la disolución del fármaco (solubilización de las partículas del fármaco) en el medio líquido. Dicho proceso se muestra en la figura 1.

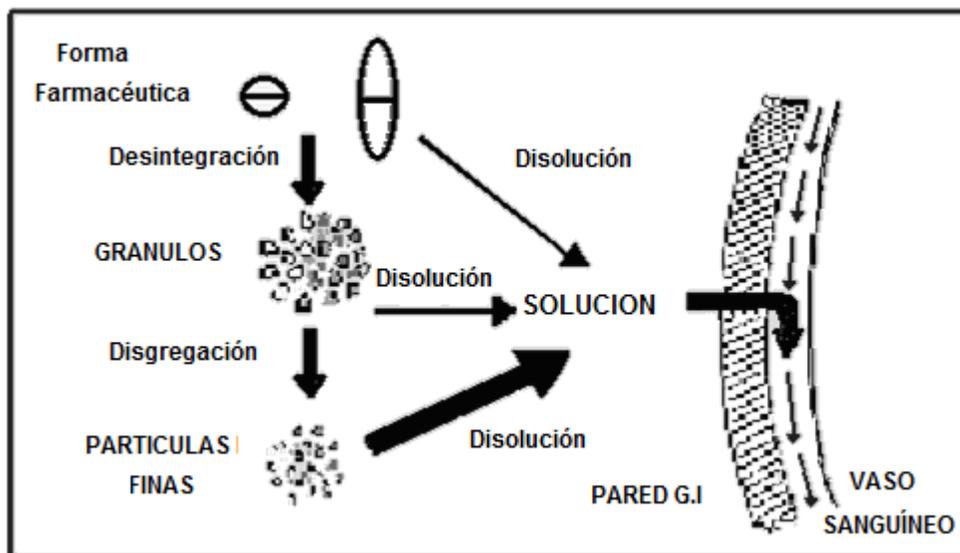


Figura. 1 Esquema de disolución de una forma farmacéutica ⁽⁴¹⁾

2.1.2 Objetivo e importancia de la disolución

El objetivo de la disolución es generar un método discriminatorio que sea sensible a las variables que afectan la velocidad de disolución, como son:

- Características del principio activo
 - Tamaño de partícula
 - Forma cristalina
 - Densidad
- Composición del producto
 - Excipientes
- Manufactura del producto
 - Fuerza de compresión
 - Equipo
- Efectos de la estabilidad del almacenaje
 - Temperatura y Humedad ⁽⁴⁾

Las pruebas de disolución son utilizadas principalmente para:

- Guiar el desarrollo de nuevas formulaciones
- Asegurar la continuidad en la calidad del producto y su desempeño de la forma farmacéutica tras ciertos cambios como:
 - Formulación
 - Proceso de manufactura
 - Lugar del proceso de manufactura
 - Escalamiento del proceso
 - Estabilidad de la nueva formulación
 - Monitorear la consistencia del producto
- Establecer una correlación *in vivo/ in vitro* ⁽⁴⁾
- Realizar pruebas de intercambiabilidad de medicamentos

La disolución *in vitro* provee información útil en diferentes etapas durante el desarrollo del medicamento. Se utiliza para evaluar las propiedades del fármaco y seleccionar los excipientes apropiados para la formulación. De igual forma ayuda en la elección de una formulación, con el fin de seleccionar la forma de dosificación de mejor perfil.

Si estas pruebas no se realizan bajo las condiciones apropiadas, la predicción de que fármacos y formulaciones pudieran mostrar los mejores perfiles de liberación *in vivo* pueden ser erróneos. ⁽⁶⁾

2.1.3 Consideraciones importantes para la disolución

A partir de la ecuación de Nernst-Brunner and Levich (Ecuación 1) modificada basada en el modelo de Noyes-Whitney, es posible identificar algunos factores importantes de la cinética de la disolución. ⁽⁶⁾

Algunos de estos factores se ven influenciados por propiedades fisicoquímicas del fármaco, así como por las condiciones del tracto gastrointestinal, como se muestra en la tabla 1. ⁽⁶⁾

$$\frac{dM}{dt} = \frac{DS}{h} (C_s - C)$$

Ecuación1. Ecuación de Noyes-Whitney /Nernst Brunner

Donde:

dM/dt = velocidad de disolución

D = coeficiente de difusión (cm^2/seg)

h = grosor de la capa de difusión

S = área superficial efectiva del fármaco expuesto al medio de disolución (cm^2)

C_s = concentración en solución (solubilidad del soluto) (g/cm^3)

C = concentración del fármaco en el medio a tiempo t (g/cm^3) ⁽⁶⁾

Tabla1. Parámetros fisicoquímicos y fisiológicos importantes para la disolución del fármaco en el tracto gastrointestinal ^(6, 8)

Factor	Parámetro fisicoquímico	Parámetro fisiológico
Área superficial del fármaco	Tamaño de partícula Humectación	Tensoactivos en el jugo gástrico y la bilis
Capa de difusión del fármaco	Tamaño molecular	Viscosidad de los contenidos del lumen Patrones de motilidad y flujo
Solubilidad	Hidrofilicidad Estructura cristalina	pH, capacidad amortiguadora de la solución amortiguadora, bilis, componentes de los alimentos
Cantidad de Fármaco disuelta	pH Medio de disolución Solubilidad	Permeabilidad Volumen de fluidos presentes
Volumen de disolvente disponible		Secreciones Fluidos coadministrados

El tamaño de partícula del fármaco y los tensoactivos naturales presentes en el tracto gastrointestinal influyen en el área superficial disponible para la disolución.

La solubilidad del fármaco no sólo está en función de su lipofilicidad o de su estado cristalino, sino que también depende del medio en el cuál debe disolverse, ya que en el tracto gastrointestinal, los tensoactivos, pH, la capacidad amortiguadora de la solución

amortiguadora y los componentes de la comida pueden jugar un papel importante en la determinación de la solubilidad del fármaco.

Las sales biliares pueden disminuir la energía superficial entre el fármaco y el medio de disolución, por lo que se incrementa el área superficial efectiva disponible. De igual forma se puede incrementar la solubilidad del fármaco por la formación de micelas. ⁽¹⁸⁾

La capa de difusión, una pequeña parte de líquido que rodea la superficie del medicamento, depende de la hidrodinamia, la cual se puede interpretar como los patrones de movimiento y flujo presentes en el tracto gastrointestinal. Finalmente el volumen en el cual el fármaco debe disolverse, está en función de la cantidad de fluidos coadministrados así como de las secreciones presentes en el lumen. ^(8, 12)

Los factores clave en la disolución de los fármacos en el tracto gastrointestinal son la composición del medio, el volumen y la hidrodinamia del contenido del lumen después de la administración oral del medicamento. Cuando estos factores son reproducidos adecuadamente *in vitro*, se puede esperar una predicción más precisa de las limitaciones de la disolución para la absorción. ⁽⁶⁾

La permeabilidad del compuesto a la pared intestinal juega un papel importante en el mantenimiento de las condiciones sink (3 veces el volumen requerido para alcanzar la concentración de saturación), las cuales influyen en la velocidad de disolución. Las condiciones sink se mantienen con facilidad en los fármacos altamente permeables, por lo que la velocidad de disolución por unidad de área superficial será constante y será cercana a la velocidad de disolución inicial. Por otro lado para los fármacos menos permeables, la velocidad de disolución por unidad de área superficial, se irá reduciendo con el tiempo, debido a una acumulación gradual del fármaco en la solución presente en el lumen. ⁽⁶⁾

2.2 SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICO

En el sistema de clasificación biofarmacéutico (BCS) (figura 2), los fármacos pueden ser catalogados en cuatro grupos básicos en función a su solubilidad y a su habilidad de penetrar la mucosa intestinal. ^(5, 6)

	ALTA SOLUBILIDAD	BAJA SOLUBILIDAD
ALTA PERMEABILIDAD	<p>Clase 1</p> <p>Alta Solubilidad Alta Permeabilidad Rápida Disolución</p>	<p>Clase 2</p> <p>Baja Solubilidad Alta Permeabilidad</p>
BAJA PERMEABILIDAD	<p>Clase 3</p> <p>Alta Solubilidad Baja Permeabilidad</p>	<p>Clase 4</p> <p>Baja Solubilidad Baja Permeabilidad</p>

Figura 2. Sistema de Clasificación Biofarmacéutico ⁽⁵⁾

El objetivo de este sistema es realizar una predicción del desempeño *in vivo* de los fármacos, a partir de datos de solubilidad y permeabilidad obtenidos *in vitro*.

El BCS se considera útil en las etapas más tempranas de la búsqueda de nuevos fármacos; puede utilizarse como base para establecer las especificaciones de la disolución *in vitro*, mejora la predicción de la absorción oral de nuevas moléculas. También le ha permitido a la Food and Drug Administration (FDA) crear un esquema

que permite exentar de los estudios de bioequivalencia *in vivo* a los compuestos de clase I.

Finalmente este sistema provee un punto de partida para reconocer cuando y cómo, las pruebas de disolución pueden ayudar en el diseño y evaluación de formas farmacéuticas sólidas orales de liberación inmediata. ^(5, 7, 22)

2.2.1 Solubilidad y Permeabilidad

La absorción oral de un fármaco depende principalmente de la solubilidad acuosa y de la permeabilidad en el tracto gastrointestinal. ⁽⁵⁾

La solubilidad del fármaco reconoce las limitaciones fisicoquímicas de éste como fuente potencial de una liberación incompleta a partir de la forma farmacéutica.

La solubilidad del fármaco se determina al disolver la dosis más alta del mismo en 250mL de soluciones amortiguadoras con pH de 1.0 a 8.0. Por lo que un fármaco es considerado “altamente soluble” cuando la dosis más alta reportada es soluble en 250 mL de medio acuoso en un rango de pH de 1-8 a 37°C, o cuando el volumen de la relación dosis/solubilidad es menor o igual a 250mL. ⁽⁵⁾

Para determinar la permeabilidad de un fármaco se requieren estudios para determinar los sitios principales de la absorción del mismo en el tracto gastrointestinal, así como evaluar la eficiencia del transporte del fármaco a través de la pared intestinal. ⁽⁶⁾ La cantidad de fármaco que atraviesa la membrana depende de factores como la concentración, temperatura, tiempo, área superficial, viscosidad y afinidad al transportador de la membrana. ⁽⁵⁾

Los fármacos de alta permeabilidad son aquellos cuya absorción es mayor al 90%.⁽⁵⁾

2.2.2 Características de los fármacos bajo la clasificación del BCS

2.2.2.1 Clase I

Los fármacos de clase I se definen como fármacos de alta permeabilidad que se disuelven rápidamente en medio acuoso en un rango de pH de 1-8. Estos fármacos

entran en solución y son transportados rápidamente a través de la pared intestinal, por lo que se espera que estos se absorban más del 90%.

Para estos compuestos, la velocidad de disolución no es el paso limitante para la absorción oral, por lo que una correlación entre la disolución *in vitro* y la absorción no es de esperarse. Para los fármacos de clase 1, una prueba de disolución donde se demuestre que más del 85% de fármaco se disuelve en los primeros 15 minutos para una formulación de liberación inmediata, se ha sugerido como determinación de bioequivalencia, ya que de esta forma se asegura la biodisponibilidad del producto. ^(11, 22, 31)

2.2.2.2 Clase II

Los fármacos de clase II se definen como compuestos de alta permeabilidad pero cuya solubilidad en medios acuosos es insuficiente para que la dosis completa de fármaco se disuelva en el tracto gastrointestinal, por lo que se espera una absorción incompleta de la misma.

Para estos compuestos, la disolución del fármaco es la principal limitación para su absorción oral. Las limitantes para la disolución pueden ser de equilibrio o de cinética. En el caso del equilibrio, el problema es que no exista suficiente fluido disponible en el tracto gastrointestinal como para disolver al producto. Mientras que el problema cinético implica que el fármaco se disuelve muy lento como para que toda la dosis se encuentre en solución antes de pasar por los sitios del tracto donde se absorbe. ^(6, 22)

Debido a que la disolución de estos fármacos depende de una gran variedad de factores (tensoactivos, pH, la capacidad amortiguadora de la solución amortiguadora, fuerza iónica y el volumen disponible) para la disolución, es importante que el medio asemeje las condiciones del tracto gastrointestinal con el fin de alcanzar una correlación *in vivo/in vitro*.⁽¹¹⁾

El establecimiento de una correlación *in vivo/in vitro* y la habilidad resultante de discriminar entre formulaciones con diferente biodisponibilidad dependerá de que tan

bien este diseñado el ensayo *in vitro*. A diferencia de la clase I, para estos fármacos, la elección del medio de disolución es muy importante. ⁽³¹⁾

2.2.2.3 Clase III

Para los fármacos pertenecientes a la clase III su solubilidad es buena, pero poseen una baja capacidad de atravesar la pared intestinal (baja permeabilidad) por lo que su absorción no es completa. Estos compuestos se disuelven rápidamente y el criterio de prueba debe ser que el fármaco pueda liberarse de la formulación bajo ciertas condiciones acuosas en un tiempo predeterminado.

Se busca una rápida disolución en los compuestos de esta clase, con el fin de maximizar el contacto entre el fármaco disuelto y el sitio de absorción en el tracto gastrointestinal y de esta forma aumentar también la biodisponibilidad del compuesto. Por lo tanto, la duración de prueba de disolución debe ser al menos tan exigente para los compuestos de clase III como para los de clase I. ⁽²²⁾

El BCS sugiere que para compuestos altamente solubles y altamente permeables (clase I) y en algunos casos para aquellos altamente solubles y de baja permeabilidad (clase III), un 85% disuelto en una solución 0.1 N de HCl en 15 minutos, o la evaluación del perfil de disolución en tres medios a pH de 1.2, 4.5 y 6.8 (HCl, acetatos y fosfatos, respectivamente), puede asegurar la biodisponibilidad del fármaco, la cuál no se ve limitada por la disolución. Para estos casos, el paso limitante para la absorción es el vaciamiento gástrico. ^(31, 43)

2.2.2.4 Clase IV

Los compuestos de clase IV tienen una baja absorción en general, pues no son lo suficientemente solubles ni permeables. Debido a ello, una formulación pobre puede tener una influencia negativa tanto en la velocidad de disolución como en la cantidad absorbida. ⁽²²⁾

Para las 4 categorías del BCS, una prueba de disolución bien diseñada puede ser la clave para el pronóstico y evaluación del potencial del fármaco para su absorción oral y para la bioequivalencia de la formulación. ⁽⁶⁾

2.3 CORRELACIÓN IN VIVO/IN VITRO (IVIVC)

Desde el punto de vista biofarmacéutico, una correlación hace referencia a la relación entre las características apropiadas de liberación *in vitro* y los parámetros de biodisponibilidad *in vivo*.

De acuerdo a la FDA, IVIVC se define como un modelo matemático que trata de predecir de una forma farmacéutica la relación entre una propiedad *in vitro* de una respuesta *in vivo*. Generalmente, la propiedad *in vitro* es la velocidad de disolución, la cantidad disuelta o la liberación del fármaco, mientras que la propiedad *in vivo* es la concentración plasmática o la cantidad absorbida del fármaco. ⁽⁴⁴⁾

El establecimiento de un método *in vitro* que prediga el comportamiento *in vivo*, es de gran importancia en el desarrollo de nuevos productos así como en la evaluación de cambios en la composición y procedimientos de manufactura del medicamento. Es por ello que se busca evaluar estos cambios en la forma farmacéutica, mediante una prueba de disolución, en lugar de requerir estudios de bioequivalencia *in vivo* de forma automática para comprobar que la nueva formulación es bioequivalente con la anterior. Sin embargo, cuando los resultados *in vitro* fallan en la predicción del desempeño *in vivo* de un medicamento, más estudios clínicos son necesarios para evaluar la biodisponibilidad del producto. ^(1, 6, 13)

Generar una correlación requiere de mucho trabajo. El proceso visto más comúnmente para elaborar una IVIVC requiere de 3 pasos:

- 1.-Elaborar formulaciones con distintas velocidades de liberación. Se puede realizar una formulación con una sola velocidad de liberación si la disolución *in vitro* del fármaco es independiente de condiciones como el pH, la agitación o el medio de disolución.
- 2.-Obtener los perfiles de disolución *in vitro* y los perfiles de concentración plasmática *in vivo* para estas formulaciones.
- 3.-Calcular el curso temporal de absorción o disolución *in vivo* utilizando una técnica apropiada para cada formulación y sujeto. ⁽⁴⁴⁾

Para predecir el comportamiento *in vivo* de un fármaco después de su administración, es esencial que el factor limitante de la absorción pueda ser modelado *in vitro*.

Debido a que la solubilidad y la absorción son indispensables, la disolución *in vitro* es muy importante para la predicción del desempeño *in vivo*. Por lo que se basan en esta prueba para establecer la correlación *in vivo/in vitro* entre la liberación y la absorción del fármaco.

Para los fármacos de la clase II de acuerdo al BCS, la disolución es el paso limitante para la absorción, así que el uso de pruebas biorrelevantes de disolución puede predecir diferencias en la biodisponibilidad entre diferentes formulaciones y condiciones de dosificación. Es por ello que la composición, el volumen e hidrodinamia del contenido en el tracto gastrointestinal presente después de la administración de la forma farmacéutica, debe ser simulado lo mejor posible, empleando condiciones que simulen el estado de ayuno o las condiciones después de la ingesta de alimentos. De esta forma se puede comprender el potencial de la interacción de los alimentos en la disolución de formas farmacéuticas de liberación inmediata. ^(1, 8, 12, 17)

2.4 MEDIOS BIORRELEVANTES

Un equipo de investigadores, dirigidos por la Dra. Jennifer Dressman de la Universidad J. W. Goethe, Alemania, han desarrollado medios de disolución que simulan las condiciones de ayuno (fasted) y postprandiales (fed) intestinales. Estos medios se han utilizado para evaluar la solubilidad y disolución características de varias clases de fármacos y así ayudar a la predicción del comportamiento de la absorción *in vivo*.⁽¹⁷⁾

2.4.1 Utilidad de los medios biorrelevantes

La prueba de disolución *in vitro* usando medios biorrelevantes es útil para:

- Pronosticar de forma cualitativa el efecto de la formulación y de los alimentos en la disolución y disponibilidad de fármacos administrados por vía oral.⁽¹⁷⁾
- Optimizar las condiciones de dosificación y la formulación del producto.
- Evaluar la bioequivalencia de fármacos que cambiaron su formulación después de haber sido aprobadas.⁽¹⁷⁾
- Predecir de manera exitosa el comportamiento *in vivo* de fármacos poco solubles o lipofílicos. Por lo mismo es muy útil para el desarrollo de nuevas formulaciones.⁽⁸⁾
- Evaluar los problemas de estabilidad del fármaco en el lumen del tracto gastrointestinal.

Se ha observado que los medios biorrelevantes generan una simulación más precisa de los perfiles farmacocinéticos que los medios que simulan al fluido gástrico o al fluido intestinal.⁽¹⁷⁾

2.4.2 Condiciones Fisiológicas presentes en el tracto gastrointestinal (TGI)

2.4.2.1 Composición luminal del tracto gastrointestinal

Los parámetros que influyen principalmente en la solubilidad y disolución del fármaco son: pH, la capacidad amortiguadora de la solución amortiguadora, la presencia de tensoactivos y el volumen del contenido luminal.

Estos parámetros pueden variar de acuerdo al lugar del tracto gastrointestinal y al tiempo de administración del fármaco en relación a la ingesta de alimento, ya que la composición del TGI se ve modificada por la secreción de diferentes fluidos como: ácido clorhídrico, bicarbonato, enzimas, tensoactivos, electrolitos, moco y agua. ⁽⁶⁾

2.4.2.1.1 pH

Los valores de pH gástrico en el estado de ayuno, pueden fluctuar minuto a minuto en un rango de pH de 1 a 7, pero en población de caucásicos sanos, el pH gástrico se encuentra por debajo de 3 durante el 90% del estado de ayuno. ⁽⁶⁾

Un medio de disolución adecuado que simule las condiciones de ayuno en el estómago, tendrá valores de pH entre 1.5 y 2. Los valores de pH típicos que se presentan después de la ingesta de alimentos están en un rango de 3 a 7.

Los valores de pH intestinales (tabla 2), son considerablemente más altos que en el estómago, debido a una neutralización del ácido con el ion bicarbonato secretado en el páncreas. Los valores de pH en el colon se encuentran influenciados por los productos de reacción de las exoenzimas de las bacterias. ⁽⁶⁾

Tabla 2. Valores de pH presentes en el intestino ⁽⁶⁾

Localización	pH en el estado de ayuno (Fasted)	pH en el estado post prandial (Fed)
Duodeno medio distal	4.9	5.2
	6.1	5.4
	6.3	5.1
	6.4	
yeyuno	4.4-6.5	5.2-6.0
	6.6	6.2
ileón	6.5	6.8-7.8
	6.8-8.0	6.8-8.0
	7.4	7.5

2.4.2.1.2 Tensoactivos

Los tensoactivos, son sustancias que influyen en la tensión superficial del medio gastrointestinal. La tensión superficial del fluido gástrico es considerablemente más baja que la tensión superficial del agua, debido a la presencia de tensoactivos. Los valores normales en el estado de ayuno se encuentran entre los 35 y 45 mN m⁻¹. ⁽⁶⁾

En el intestino delgado, la secreción de bilis genera una alta concentración de sales biliares y lecitina (tensoactivos presentes de forma natural en el tracto gastrointestinal) que forman micelas incluso a las concentraciones presentes en el estado de ayuno.

La concentración de sales biliares en el estado de ayuno reportadas en el intestino delgado, van de 3-5mM, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones de sales biliares presentes en el intestino delgado humano en el estado de ayuno ⁽⁶⁾

Estadística	Duodeno	Yeyuno superior	Yeyuno inferior
Media \pm DE (mM)	6.4 \pm 1.3	5	6
	4.3 \pm 1.2		
Media		3	5
Rango		0-14	0-17

Después de la ingesta de alimentos, la salida de bilis y la concentración de componentes biliares alcanzan un máximo en 30 minutos. Este máximo se encuentra alrededor de los 15mM en el intestino delgado proximal.

2.4.2.1.3 Enzimas

La enzima principal que se encuentra en el jugo gástrico es la pepsina, una exopeptidasa. Las lipasas, amilasas y proteasas son enzimas secretadas por el páncreas al intestino delgado en respuesta a la ingestión de alimentos. Estas enzimas son las responsables de la mayoría de la digestión de nutrientes. ⁽⁶⁾

2.4.2.1.4 Volumen

El volumen de fluidos disponible en el tracto gastrointestinal para la disolución del fármaco se ve influenciado por: el volumen de fluidos coadministrados con el fármaco, por las secreciones y por flujo de agua a través de la pared intestinal.

Las secreciones de los órganos para-gastronitestinales (glándulas salivales, hígado y páncreas) así como la secreción del estómago, se reciben en la primera porción del duodeno. Estas secreciones endógenas (6 litros por día) son esenciales para la digestión de los alimentos. ⁽⁸⁾

2.4.2.2 Hidrodinámica en el tracto gastrointestinal

La hidrodinamia en el tracto gastrointestinal implica que tan bien son mezclados los contenidos del lumen, por lo que juega un papel importante en la disolución por su influencia en el grosor de la capa de difusión adyacente al fármaco (h).⁽⁶⁾

2.4.2.2.1 Patrones de mezclado en el intestino

En el tracto gastrointestinal existen 4 patrones de movimiento básicos: sin actividad (quiescente), movimiento segmental, movimiento propagativo y contracciones tónicas.

En el estómago en condiciones de ayuno, se presentan largos periodos sin actividad, mientras que en el intestino delgado, el patrón de movimiento predominante es la segmentación. Movimientos cortos propulsivos, proveen el mecanismo mediante el cuál el contenido del lumen se desplaza por el intestino.⁽⁶⁾

2.4.2.2.2 Tiempo de residencia en el intestino delgado

Existe muy poca diferencia en el tiempo de tránsito dentro del intestino delgado, pues tiene poca capacidad para diferenciar con respecto a si se trata de sólidos o líquidos; si se encuentra en estado de ayuno o después de la ingesta de alimentos, o si son diferentes formas de dosificación. Así que para la mayoría, el tiempo de tránsito en el intestino delgado va de 1 a 3 horas.⁽⁶⁾

2.4.3 Adaptación del medio biorrelevante a las condiciones fisiológicas

La mayoría de los fármacos no se absorben en el estómago, pues éste tiene una función principalmente de reservorio. En cambio el intestino delgado es el sitio principal de absorción dentro del tracto gastrointestinal, por su localización anatómica, su mucosa permeable, su especificidad de sitios transportadores, exportadores y su área superficial. Por ello se busca que el medio biorrelevante se asemeje a las condiciones intestinales en mayor medida.⁽⁶⁾

2.4.4 Formulación de un medio biorrelevante a partir de la simulación del Medio Intestinal

Las principales diferencias entre las condiciones gástricas y las condiciones intestinales, son la presencia de bilis y de un pH más alcalino. Las sales biliares y la lecitina, facilitan la humectación de los sólidos y la solubilización de fármacos lipofílicos en micelas. Sin embargo, la disolución de fármacos puede ser mejorada considerablemente en comparación a la disolución en una solución acuosa.

El taurocolato de sodio se eligió como el representante de las sales biliares pues éste es una de las sales mayoritarias en la bilis humana. Una concentración aceptable de sales biliares para simular el estado de ayuno sería entre 3 y 5 mM.

La lecitina está presente en una proporción de 1:3 con respecto a las sales biliares. La solución amortiguadora de fosfatos es utilizada para sustituir la solución amortiguadora fisiológica de bicarbonato, de esta forma se evita la inestabilidad del bicarbonato debido a la reacción con oxígeno a pH de 6.5, presente del duodeno al ileon. Un volumen de 500mL sería consistente con los valores reportados en la literatura del volumen presente en el estado de ayuno. ^(6,8, 9)

En el caso de las canastillas (aparato I) o las paletas (aparato II), la relación entre la hidrodinamia en el aparato y aquella presente en el tracto gastrointestinal no está clara. La simulación de la hidrodinamia del tracto gastrointestinal todavía permanece desconocida por lo que es necesaria mayor investigación en estas áreas. ⁽⁶⁾

Cuando se utiliza el aparato II (paletas) de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), los volúmenes que se utilizan para asemejar aquellos presentes en el tracto gastrointestinal son: para el estado de ayuno en el estómago, el volumen es de 300-500mL; para el estado postprandial en el estómago es de 900mL; para el estado de ayuno en el intestino delgado, el volumen es de 500mL, mientras que para el estado postprandial en el intestino delgado es de 900-1000 mL. ⁽⁸⁾

2.4.5 Tipos de medios biorrelevantes ⁽⁸⁾

Los cuatro medios que se han desarrollado para modelar los contenidos del tracto gástrico e intestinal antes y después de la ingesta de alimentos son:

- Fluido que simula el estado de ayuno en el estómago (SGF: fasted state/ stomach) Fluido gástrico simulado sin enzimas
- Leche con grasa al 3.5%, que simula el estado postprandial en el estómago
- Fluido que simula el estado de ayuno en el intestino delgado (FaSSIF: Fasted state/ small intestine)
- Fluido que simula el estado postprandial en el intestino delgado (FeSSIF: fed state/ small intestine)

2.4.5.1 FaSSIF

FaSSIF (fasted state/ small intestine) es el medio que se utiliza para representar el estado de ayuno en el intestino delgado. Contiene solución amortiguadora de fosfatos para mantener un pH de 6.5 y una capacidad amortiguadora de 10mEq por litro por unidad de pH. Los niveles de las sales biliares y de lecitina en el medio son los correspondientes al estado de ayuno. ⁽⁸⁾

Tabla 4 Composición del medio biorrelevante utilizado para simular el estado de ayuno.
(FaSSIF) ^(11, 17)

Fluido Intestinal simulando el estado de ayuno (FaSSIF)	
pH	6.5
Osmolaridad	270±10 mOsmol
Taurocolato de sodio	3mM
Lecitina	0.75mM
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	1.977g
NaCl	3.093g
NaOH	0.174g
Agua desionizada	500mL

2.4.6 Selección del medio Biorrelevante a utilizar

De acuerdo a lo que se describe en la NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, en los estudios de bioequivalencia de formas farmacéuticas de liberación inmediata, los voluntarios deben encontrarse en ayuno por lo menos 10 horas antes de la administración del medicamento y por dos horas como mínimo después de la administración. ⁽²³⁾ Es por ello que se eligió llevar a cabo el procedimiento experimental utilizando el medio que simula el intestino delgado en el estado de ayuno (FaSSIF).

2.5 HIPERTENSIÓN

La hipertensión se encuentra catalogada dentro de las enfermedades más comunes en adultos en países industrializados y es uno de los factores de riesgo modificables para las enfermedades cardiovasculares y renales. La presión arterial sistólica (SBP) se incrementa con el avance de la edad en la mayoría de los pacientes, mientras que la presión arterial diastólica (DBP) disminuye. ⁽¹⁴⁾

La hipertensión sistólica (ISH) es causada por una disminución en la resistencia de las arterias. Muchos son los mecanismos que contribuyen a la ISH, incluyendo una disminución en el contenido de elastina y un incremento en el contenido de colágeno en la pared arterial; engrosamiento y remodelado fibrótico de la íntima vascular; proliferación del músculo liso en la pared arterial e hipertrofia ventricular izquierda.^(21,13) La evidencia experimental indica que la angiotensina II puede desatar cada uno de estos mecanismos y por ello está involucrada en la patogénesis de la ISH.⁽²¹⁾

El sistema renina-angiotensina-aldosterona es un blanco importante para el tratamiento de la hipertensión. El componente activo de este sistema es la angiotensina II, la cuál actúa en órganos como la corteza adrenal, vasos sanguíneos y el riñón, para estimular la síntesis y secreción de aldosterona, vasoconstricción y reabsorción renal de sodio. El resultado final de estas acciones es un incremento en la presión arterial.⁽²⁴⁾

2.6 Terapia en combinación

Las ventajas de una primera línea de tratamiento para la hipertensión con una terapia combinatoria son las siguientes:

- 1) Hay algunas acciones sinérgicas cuando se usan dos o más fármacos que tienen diferentes mecanismos de acción, de esta forma la presión arterial es controlada de forma más efectiva y se previenen complicaciones
- 2) El número y la severidad de los efectos adversos pueden reducirse utilizando dosis bajas, y así optimizando la resistencia del paciente⁽¹⁹⁾

Se han llevado a cabo diferentes estudios clínicos para evaluar los agentes antihipertensivos en una terapia combinatoria en comparación con monoterapias.⁽¹⁶⁾

A continuación se presentan algunos de los beneficios de éstos.

2.7 Uso de Losartán/Hidroclorotiazida en combinación vs. Monoterapia

De acuerdo a lo reportado por Athanasios J. Manolis (2000) ⁽¹⁶⁾, el tratamiento con Losartán ¹ con dosis bajas de hidroclorotiazida² puede dar lugar a reducciones significativas en la presión arterial.

El tratamiento de Losartán en monoterapia, disminuyó la presión arterial en 45.8 % de los pacientes, mientras que la terapia combinada de Losartán con Hidroclorotiazida disminuyó la presión arterial en 62.7% de los casos ⁽¹⁰⁾. Se ha documentado también que los efectos adversos para el tratamiento en combinación con respecto a la monoterapia de Losartán son comparables. ^(10, 15)

2.8 Uso de Losartán/Hidroclortiazida vs. Amlodipino/Hidroclorotiazida

En un estudio realizado por Oparil Suzanne (1996)⁽²⁴⁾ se encontró, que un 68% de pacientes bajo el tratamiento con Losartán/Hidroclorotiazida disminuyeron su presión arterial diastólica por debajo de lo 90 mmHg, mientras que en el grupo bajo tratamiento con Amlodipino³/Hidroclorotiazida, un 71% alcanzó la meta, sin embargo 27% de este grupo presentaron efectos adversos, (principalmente edema) a diferencia de un 13 % de los pacientes del grupo de Losartán/hidroclorotiazida. Finalmente este estudio demostró que el régimen de Losartán con Hidroclorotiazida genera mayor eficacia, mejor tolerancia y menores molestias a los pacientes con respecto al edema comparado con un régimen de Amlodipino con Hidroclorotiazida. ⁽²⁴⁾

2.9 Uso de Losartán/Amlodipino en ratas

Seul Min Choi (2009)⁽¹⁹⁾ mostró que un tratamiento de 4 semanas de monoterapia con 3mg/kg de Amlodipino y monoterapia de Losartán de 30mg/kg disminuyó la presión arterial sistólica, sin embargo, la combinación de estos dos agentes, disminuyó de

¹ Monografía del Losartan, página 26

² Monografía de Hidroclorotiazida, página 30

³ Monografía del Amlodipino, página 34

forma significativa la presión arterial sistólica a las 3 semanas del tratamiento, y se observó una correlación positiva entre la disminución de la presión y la mejora de la relajación del endotelio arterial. El contenido de colágeno en el tejido cardíaco fue significativamente más bajo después de las 4 semanas de tratamiento con la combinación de los agentes antihipertensivos (1:10). Estos resultados sugieren que la combinación de amlodipino y losartán pueden ser más efectivos en el tratamiento de la hipertensión en comparación a una monoterapia. ⁽¹⁹⁾

Se ha demostrado que la combinación de los bloqueadores de canales de calcio como el amlodipino y los antagonistas del receptor tipo 1 de la angiotensina II como el Losartán, son muy útiles para la disminución de la presión arterial y la prevención de los problemas de varios órganos como el corazón y los riñones. ⁽¹⁹⁾

2.10 MONOGRAFÍAS DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS BAJO ESTUDIO

2.10.1 Monografía del Losartán (LSK)

El losartán es el primer miembro de una nueva familia de antihipertensivos orales denominada antagonistas de los receptores de angiotensina II. Su desarrollo se basó en el concepto de que la angiotensina II está críticamente involucrada en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular. ⁽³⁹⁾

Propiedades Fisicoquímicas

El Losartán es un polvo cristalino blanco o blanquecino que fluye libremente.

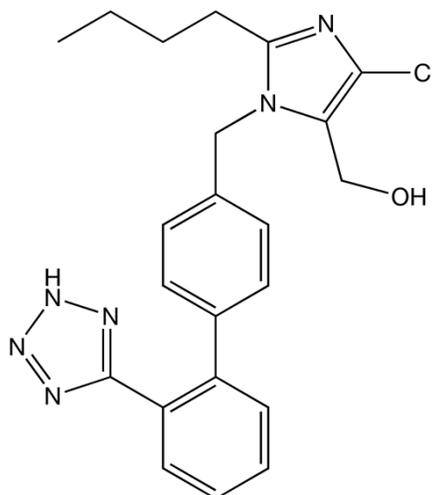
Es soluble en agua, soluble en alcoholes y ligeramente soluble en disolventes orgánicos comunes como acetonitrilo y metilcetona. ⁽³⁸⁾

Tabla 5. Propiedades Fisicoquímicas del losartán potásico ⁽³⁸⁾

Peso Molecular	422.9110 g/mol
Estado	Sólido
Punto de fusión	183.5-184.5°C
Solubilidad en agua	0.82 mg/L
LogP/Hidrofobicidad Experimental	6.1
pKa	5

Nombre químico

[2-butil-5-cloro-3-[[4-[2-(2H-tetrazol-5-il)fenil]fenil]metil]imidazol-4-il]metanol

Estructura Química**Mecanismo de acción**

El losartán y su metabolito activo E-3174, el cuál se genera con la oxidación del grupo 5-hidroximetil del anillo imidazol, son antagonistas específicos y selectivos de los receptores de la angiotensina II, a diferencia de otros inhibidores de la ECA, que

bloquean la síntesis de la enzima angiotensina II a partir de bloquear a la enzima angiotensina I.

El losartán impide que la angiotensina II formada pueda interaccionar con su receptor endógeno. El metabolito activo del losartán es 10 a 40 veces más potente que el mismo Losartán como ligando de los receptores AT₁, siendo el principal responsable de los efectos farmacológicos de este fármaco. ⁽³⁹⁾

Como es sabido, la angiotensina II es la principal hormona vasoactiva del sistema renina-angiotensina, jugando un importante papel en la fisiopatología de la hipertensión. El losartán bloquea de forma específica todas las acciones de la angiotensina II en la homeostasis cardiovascular. Esto incluye la vasoconstricción, la formación de aldosterona y la reabsorción renal de sodio. La acción del losartán al bloquear al receptor genera una vasodilatación, natriuresis (excreción de gran cantidad de sodio) y una reducción de la presión arterial, previene o revierte el daño a tejido inducido por la angiotensina II e incrementa la supervivencia.

Los mayores efectos antihipertensivos se consiguen cuando se asocia un diurético a este fármaco. ⁽³⁹⁾

Farmacocinética

El losartán se absorbe muy bien por el tracto gastrointestinal, pero experimenta un importante metabolismo de primer paso. Su biodisponibilidad sistémica es aproximadamente del 35%. Aproximadamente el 14% de una dosis oral es metabolizada en el hígado por el citocromo P450 en particular por los sistemas CYP2C9 y CYP3A4, al E-3174, el metabolito hidroxilado activo.

Este fármaco no atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica.

Las concentraciones séricas máximas se obtienen al cabo de una hora para el losartán y de 3-4 horas para su metabolito activo. La presencia de los alimentos reduce las concentraciones plasmáticas máximas y el AUC del losartán en un 10%. Tanto el

losartán como su metabolito activo se unen extensamente a las proteínas del plasma, sobre todo a la albúmina en un 99%.

Aproximadamente el 35% de una dosis oral se excreta por vía renal: un 4% de la dosis se elimina como losartán sin alterar y el resto en forma de metabolitos. El 60% de la dosis se excreta en las heces. La vida media del fármaco es de 2 h. ^(37, 39)

Sistema de clasificación Biofarmacéutico

Clase III (Alta solubilidad, Baja permeabilidad) ⁽³⁸⁾

Indicaciones

El losartán se utiliza para el tratamiento de la hipertensión como monofármaco o asociado a otros antihipertensivos. Es administrado por vía oral. Para adultos las dosis iniciales deben de ser 50 mg una vez al día. Las dosis de mantenimiento oscilan entre 25 y 100 mg administrados en 1-2 dosis divididas. Los máximos efectos antihipertensivos se observan al cabo de 3 a 6 semanas.

Se ha observado que el uso concomitante con un diurético disminuye la presión arterial en mayor medida que aumentar la dosis de losartán más allá de los 50 mg/día. Por ejemplo, la adición de 12.5 mg de hidroclorotiazida a 50 mg de losartán resulta en una reducción adicional del 50% de las presiones arteriales sistólica y diastólica, mientras que el pasar de 50 a 100 mg/día de losartán sólo reduce la presión arterial en 3 mm de Hg. ⁽³⁹⁾

Presentaciones Comerciales⁽⁴²⁾

Losartán potásico solo

- COLIBS, comprimidos de 50 y 100 mg, SBL PHARMACEUTICALS.
- COOZAR, comprimidos de 12.5, 50 y 100 mg, MERCK SHARP and DOHME

Losartán potásico asociado con Hidroclorotiazida

- HYZAAR: comprimidos recubiertos de 50 mg LSK + 12.5 mg de HCTZ; 100 mg LSK + 12.5 mg HCTZ; 100 mg LSK + 25 mg HCTZ. MERCK SHARP DOHME

2.10.2 Monografía de la Hidroclorotiazida (HCTZ)

La hidroclorotiazida es un diurético tiazídico utilizado para el tratamiento del edema y de la hipertensión. ⁽³⁹⁾

Propiedades Fisicoquímicas

Es un polvo cristalino blanco o casi blanco. Ligeramente soluble en agua y muy soluble en solución de hidróxido de sodio.

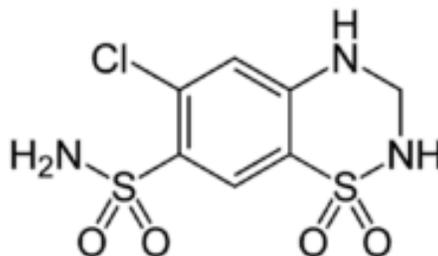
Tabla 6. Propiedades Fisicoquímicas de la hidroclorotiazida. ⁽³⁸⁾

Peso Molecular	297.7390 g/mol
Estado	Sólido
Punto de fusión	274°C
Solubilidad en agua	0.7 mg/mL
LogP/Hidrofobicidad Experimental	-0.5
pKa/punto isoeléctrico	7.9, 9.2

Nombre químico

6-cloro-1,1-dioxo-3,4-dihidro-2H-benzo[e][1,2,4]tiadiazina-7-sulfonamida

Estructura Química



Mecanismo de acción

La hidroclorotiazida es un diurético tiazídico que aumenta la excreción de sodio, cloruros y agua, inhibiendo el transporte iónico del sodio a través del epitelio tubular renal. El mecanismo principal responsable de la diuresis es la inhibición de la reabsorción del cloro en la porción distal del túbulo. No se sabe con exactitud como el transporte del cloro es inhibido. Las tiazidas aumentan igualmente la excreción de potasio y de bicarbonato y reducen la eliminación de calcio y de ácido úrico.

La hidroclorotiazida no es un antagonista de la aldosterona y sus efectos son independientes de una inhibición de la anhidrasa carbónica. Se desconoce el mecanismo antihipertensivo de la hidroclorotiazida. Usualmente, este fármaco no afecta la presión arterial cuando esta es normal. La presión sanguínea podría ser, en principio, reducida debido a una disminución del volumen plasmático y de los fluidos extracelulares, lo que a su vez, ocasionaría una reducción del gasto cardíaco. Cuando el gasto cardíaco retorna a la normalidad, y los volúmenes de plasma y fluidos extracelulares son ligeramente menores, las resistencias periféricas se encuentran reducidas y en consecuencia, la presión arterial también. Los diuréticos tiazídicos también disminuyen la filtración glomerular. ⁽³⁹⁾

La adición de hidroclorotiazida al Losartán o al amlodipino en bajas dosis está pensado en proveer una reducción de la presión arterial a través de una natriuresis (una excreción grande de sodio en la orina) y una vasodilatación directa de los vasos sanguíneos. ⁽²⁴⁾

Farmacocinética

La hidroclorotiazida se administra por vía oral. El comienzo de la acción diurética se observa a las dos horas, siendo los efectos máximos a las 4 horas, manteniéndose después 6-8 horas más. La absorción intestinal de la hidroclorotiazida depende de la formulación y de la dosis, pero generalmente suele ser del 50-60%. El fármaco cruza la barrera placentaria pero no la barrera hematoencefálica. La hidroclorotiazida no se metaboliza siendo eliminada inalterada en la orina. La vida media de eliminación es de 2.5 horas en los pacientes con la función renal normal. ^(37, 39)

Sistema de clasificación Biofarmacéutico

Clase IV (Baja solubilidad y Baja permeabilidad) ⁽³⁸⁾

Indicaciones

La hidroclorotiazida se usa para el tratamiento de la hipertensión. Se administra oralmente. En adultos inicialmente se recomienda una dosis de 12.5 a 25 mg una vez al día, dosis que pueden aumentarse hasta 50 mg/día en una o dos administraciones. Los expertos recomiendan que si las dosis de 25 -50 mg/día no controlan la hipertensión, no se deben aumentar las dosis de hidroclorotiazida, sino añadir un segundo antihipertensivo. Las dosis de hidroclorotiazida superiores a los 50 mg/día no producen una mayor reducción de la presión arterial, pero aumentan la pérdida de potasio. ⁽³⁹⁾

Presentaciones Comerciales⁽⁴²⁾

Hidroclorotiazida sola

- ROFUCAL Tabletas. 25 mg. PROBIOMED

Hidroclorotiazida asociada con otros agentes antihipertensivos

- ALMETEC-CO: Olmesartán. Comprimidos. 20 mg y 12.5 mg; 40 mg y 12.5 mg; y 40 mg y 25 mg de olmesartán medoxomilo e hidroclorotiazida. SCHERING-PLOUGH
- ATACAND PLUS: Candesartán. Tabletas. 16 mg candesartán y 12.5 mg HCTZ. ASTRAZENECA
- BICONCOR: Bisoprolol. Tabletas recubiertas. 2.5 mg, 5.0 mg ó 10 mg de Fumarato de bisoprolol; 6.25 mg HCTZ. MERCK
- BLOPRESS PLUS: Candesartán. Tabletas. Candesartán cilexetilo 16.0 mg, Hidroclorotiazida 12.5 mg. ABBOTT
- COAPROVEL: Irbesartán. Tabletas. Irbesartán 150.0 mg, 300.0 mg; 300.0 mg Hidroclorotiazida 12.5 mg, 12.5 mg, 25 mg. SANOFI-AVENTIS
- CO-CAPTRAL: Captopril.. Tabletas. Captopril: 25 mg, 50 mg Hidroclorotiazida: 12.5 mg, 25 mg. SILANES
- CO-DIOVAN: Valsartán.. Tabletas recubiertas. Valsartán: 80 mg, 160 mg, 160 mg Hidroclorotiazida: 12.5 mg, 12.5 mg, 25 mg. NOVARTIS
- DYNYEL: Ramipril. Tabletas. Ramipril: 2.5 mg, 5.0 mg Clorhidrato hidroclorotiazida: 12.5 mg, 25 mg. LABORATORIOS RAAM DE SAHUAYO
- GLIOTENZIDE: Enalapril. Tabletas. Maleato de enalapril: 5 mg, 10 mg, 20 mg. Hidroclorotiazida: 25 mg. ARMSTRONG

- HYZAAR: comprimidos recubiertos de 50 mg LSK + 12.5 mg de HCTZ; 100 mg LSK + 12.5 mg HCTZ; 100 mg LSK + 25 mg HCTZ. MERCK SHARP DOHME
- MICARDIS PLUS: Telmisartán. Tabletas. Telmisartán: 80 mg. Hidroclorotiazida: 12.5 mg. BOEHRINGER INGELHEIM
- PREDXAL PLUS: Telmisartán. Tabletas. Telmisartán: 40 mg, 80 mg. Hidroclorotiazida: 12.5 mg. ARMSTRONG
- SELOPRES ZOK: Metoprolol. Tabletas de liberación prolongada. Succinato de metoprolol 95 mg; Hidroclorotiazida 12.5 mg. ASTRAZENECA
- TEVETENZ DOX: Eprosartán. Tabletas recubiertas. Mesilato de eprosartán equivalente a 600.0 mg de eprosartán. Hidroclorotiazida 12.5 mg. ITALMEX
- TRITAZIDE: Ramipril. Tabletas. Ramipril. 2.5 y 5 mg. Hidroclorotiazida: 12.5 y 25 mg. SANOFI-AVENTIS
- ZESTORETIC: Lisinopril. Tabletas. Lisinopril: 20 mg. Hidroclorotiazida: 12.5 mg. ASTRAZENECA

2.10.3 Monografía del Amlodipino (AMD)

El amlodipino es un antagonista de canales de calcio (bloqueador de los canales lentos del calcio o antagonista de los iones calcio) del grupo de las dihidropiridinas, que impide el paso de los iones calcio a través de la membrana al músculo liso y cardiaco. La acción antihipertensiva del amlodipino es debida a un efecto que relaja directamente al músculo liso vascular.⁽³⁹⁾

Propiedades Fisicoquímicas

El amlodipino es un polvo blanco cristalino. Ligeramente soluble en agua y moderadamente soluble en etanol. Es fotosensible ya que la luz cataliza su oxidación al derivado de piridina, el cual no tiene efecto terapéutico.

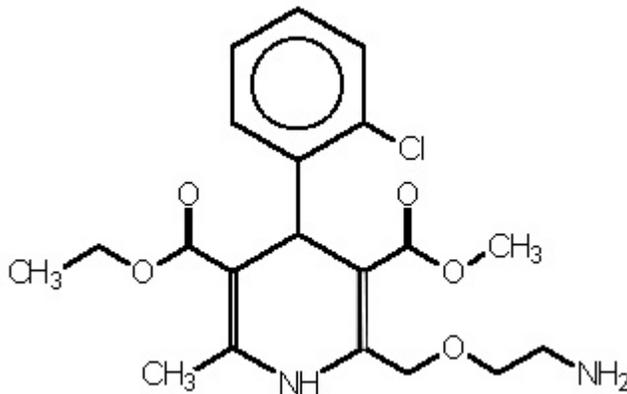
Tabla 7. Propiedades Fisicoquímicas del amlodipino ⁽³⁸⁾

Peso Molecular	408.8760 g/mol
Estado	Sólido
Punto de fusión	178-179°C
Solubilidad en agua	75.3 mg/L
LogP/Hidrofobicidad Experimental	1.9
pKa	8.6

Nombre químico

R,S-2-[(2-aminoetoxi)metil]-4-(2-clorofenil)-3-etoxicarbonil-5-metoxicarbonil-6-metil-1,4-dihidropiridina.

Estructura Química



Mecanismo de acción

El amlodipino es un bloqueador de los canales de calcio. Inhibe el flujo de calcio extracelular a través de la membrana celular del miocardio y del músculo liso vascular. Este decremento de calcio inhibe el proceso de contracción de las células del músculo liso del miocardio, generando dilatación de las arterias sistémicas y coronarias,

aumento en la oxigenación del tejido del miocardio, disminución de la resistencia periférica total y presión arterial sistémica.

Otro posible mecanismo de acción es que el amlodipino inhiba la actividad de la anhidrasa carbonica I, seguido de un incremento de pH, el cual puede estar involucrado en el flujo intracelular de calcio a través de los canales. ^(24, 39)

Farmacocinética

Después de la administración oral, el amlodipino se absorbe bien, alcanzando concentraciones máximas en la sangre de las 6-12 horas. La absorción de amlodipino no se modifica con la ingesta de alimentos. La biodisponibilidad absoluta ha sido estimada entre el 64 y el 80%. El amlodipino se metaboliza ampliamente en el hígado hasta metabolitos inactivos, eliminándose por la orina hasta el 10% del fármaco inalterado, y el 60% de metabolitos. ^(37, 39)

Sistema de clasificación Biofarmacéutico

Clase III (Alta solubilidad y Baja Permeabilidad) ⁽³⁸⁾

Indicaciones

El amlodipino está indicado como tratamiento de primera elección en la hipertensión arterial y puede usarse como monoterapia para el control de la presión arterial sanguínea en la mayoría de los pacientes. Aquellos enfermos que no estén adecuadamente controlados con un solo antihipertensivo pueden beneficiarse al agregar amlodipino, el cuál se ha utilizado en combinación con diuréticos tiazídicos, agentes bloqueadores de adrenorreceptores beta, bloqueadores alfa, o inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina. ⁽³⁹⁾

Presentaciones Comerciales ⁽⁴²⁾

Amlodipino Solo

- AMLIBON: Tabletas. Mesilato de amlodipino equivalente a 5 y 10 mg de amlodipino. SANDOZ, S.A. DE C.V
- AVISTAR: Tabletas. Besilato de amlodipino equivalente a 5 mg de amlodipino. WERMAR
- CROPINEX: Tabletas. Besilato de amlodipino equivalente a 5 mg de amlodipino. QUÍMICA SON'S
- NEXUS: Cápsulas. Besilato de amlodipino 5 mg. SENOSIAIN
- ORALCAM: Tabletas. Camsilato de amlodipino equivalente a 5 mg de amlodipino. LANDSTEINER SCIENTIFIC
- PRESONE-1: Tabletas. Besilato de amlodipino equivalente a 5.0 mg de amlodipino. LIOMONT
- SBL-CAR: Tabletas. Besilato de amlodipino equivalente a 5 mg de amlodipino. SBL PHARMACEUTICALS
- SISTOPRES: Tabletas. Besilato de amlodipino equivalente a 5 mg de amlodipino. MAVI

Amlodipino en combinación con otros agentes terapéuticos

- AMLIDUAL: Simvastatina. Tabletas. Mesilato de amlodipino equivalente a 5 mg de amlodipino. Simvastatina 10 mg y 20 mg. SANDOZ, S.A. DE C.V
- AMLIPRIL. Benazepril. Cápsulas. Besilato de amlodipino equivalente a 5 mg de amlodipino. Clorhidrato de benazepril 10 mg. SANDOZ, S.A. DE C.V

- EXFORGE: Valsartán. Antihipertensivo combinado. Comprimidos. Besilato de amlodipino equivalente a 5 mg, 5 mg, 10 mg amlodipino. Valsartán 80 mg, 160 mg, 160 mg. NOVARTIS
- NOVASIPINO: Acetilsalicílico, ácido. Tabletas. Besilato de amlodipino equivalente a 5 mg de amlodipino. Ácido acetilsalicílico 75 mg. RIMSA

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 Equipos, reactivos y sustancias utilizadas

Equipos

Disolutor Vankel VK7000

Potenciómetro Orion 410 A Plus

Balanza Analítica Sartorius

Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Shimadzu LC-10A

Columna LiChrospher RP-18EC, 150mm x 4.6 mm 5 µm. No. serie 609010691 Lote L57020637834.

Filtros de Teflón de 35µm Varian Lote: 70731A

Durómetro

Reactivos

- Acetonitrilo Mallinckrodt. Lote: 2856 C33D53
- MeOH HPLC J.T.Baker.Lote: G51C60
- Acido clorhídrico (37%) J.T.Baker. Lote: E37C30
- Fosfato de sodio monobásico, monohidratado J.T.Baker. Lote: K15460
- Cloruro de sodio (Cristal) (REPROQUIFIN), Reactivos y Productos Químicos Finos. Lote: 75260
- Hidróxido de sodio. (Escamas) J.T.Baker. Lote: B13C54
- Acido fosfórico. J.T.Baker. Lote: 38362
- FaSSIF phares SIF Powder Lote: PHA S0902016
- Trietilamina Merck
- Acetona R.A J.TBaker

Sustancias de referencia

- Losartán potásico

Fabricante Auctus Pharma Limited. Pureza 99.81% BH. Lote PL 022082008

- Besilato de Amlodipino

Fabricante: Cadila Healthcare L. Pureza 100.4% BH. Lote: AB/002/5042

- Hidroclorotiazida

Fabricante: IPCA Laboratories Limited. Pureza 99.65% BH. Lote: 8010HCR11

Productos (piloto y de referencia)

- Producto piloto. Producto conteniendo:

(Cápsulas con minitabletas: Amlodipino 5mg/Hidroclorotiazida 12.5mg/Losartán 50mg). Dentro de la cápsula, hay 2 tabletas de losartán, una tableta de hidroclorotiazida y 1 tableta de amlodipino.

Lote: LPD 09A035

- Producto innovador Norvas

(Tabletas con 5 mg de Amlodipino) Lote 0705311. Fecha de caducidad: Agosto 2011. Pfizer, S.A de C.V.

- Producto innovador Hyzaar

(Comprimidos con 50mg Losartán/ 12.5 mg Hidroclorotiazida) Lote D008669.

Fecha de caducidad: Abril 2011. Merck Sharp and Dohme de México S.A de C.V.

3.2 Preparación de soluciones

3.2.1 Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 (blanco de FaSSIF)

Pesar aproximadamente 0.348 g de hidróxido de sodio (NaOH), 3.954g de fosfato monobásico de potasio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y 6.186 g de cloruro de sodio (NaCl). Disolver en 800mL de agua desionizada. Ajustar el pH a 6.5 con NaOH 1M ó ácido clorhídrico (HCl) 1M. Transferir a un matraz de 1 L y aforar con agua desionizada.

3.2.2 Medio biorrelevante FaSSIF

De acuerdo a la guía de usuario proporcionada por Phares ⁽³⁶⁾, para la preparación de 1L de este medio, pesar exactamente 2.24g de SIF Powder, transferir a un matraz de 1 L, disolverlos en 500mL de solución amortiguadora de fosfatos de pH 6.5 y aforar con la misma solución amortiguadora. Dejar reposar el medio por 2h antes de utilizarse.

3.2.3 Solución de trietilamina pH 3

Disolver 7.0 mL de trietilamina en 800mL de agua desionizada. Ajustar el pH con ácido fosfórico 1M a pH 3.0 ± 0.1 . Aforar con agua desionizada a 1L.

3.2.4 Hidróxido de Sodio 1M

Pesar aproximadamente 4g de NaOH, disolver en 50mL de agua desionizada. Transferir a un matraz de 100mL y aforar con agua desionizada.

3.2.5 Ácido clorhídrico 1M

En un matraz de 100mL aforado, disolver 850 μ L de ácido clorhídrico concentrado en 50 mL de agua desionizada. Aforar con agua desionizada.

3.2.6 Ácido Fosfórico 1M

Vaciar 5.8 mL de ácido fosfórico concentrado en 50 mL de agua desionizada. Transferir a un matraz aforado de 100mL. Aforar con agua desionizada.

3.3 Determinación de las condiciones cromatográficas para la cuantificación de los analitos de interés

En las diferentes farmacopeas no se reporta una metodología para la valoración de un producto combinado que contenga los analitos de interés. Mediante la investigación hemerográfica, se encontraron reportadas diferentes metodologías para cuantificar por cromatografía de líquidos de alta resolución el losartán potásico junto con la hidroclorotiazida así como metodología para cuantificar amlodipino solo o en combinación. En la tabla 8, se presentan los métodos analíticos reportados.

Tomando como base esta información, se desarrolló el método analítico para la cuantificación de los 3 componentes en una sola corrida, con la finalidad de generar condiciones cromatográficas con las que se puedan obtener resultados reproducibles y con una buena resolución entre los picos. Para ello, se modificaron las variables tales como: velocidad de flujo, composición y la proporción de fase móvil.

Para seleccionar la fase móvil se evaluaron diferentes proporciones de metanol (MeOH) y acetonitrilo (ACN) así como diferentes soluciones amortiguadoras.

Las soluciones amortiguadoras que se evaluaron fueron: solución amortiguadora de fosfatos de pH 4, solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 y solución amortiguadora de trietilamina pH 3, para observar el efecto del pH en los picos de los diferentes analitos.

Para elegir la fase móvil, se buscó que los picos de los diferentes analitos estuvieran bien definidos, que los tiempos de retención fueran menores a los 10 minutos y que la resolución entre los picos fuese mayor de 3.

Tabla 8. Condiciones cromatográficas reportadas para la cuantificación de los analitos de interés

	HCTZ + LSK	HCTZ + LSK	Amlodipino	Amlodipino	Amlodipino	Amlodipino
Columna	C18	C18 150mm x 6mm	C18 250mm x 4 mm	C18 250mm x 4 mm	C18 150mm x 4.6 mm	C18
Fase móvil	ACN:Solución amortiguadora de fosfatos (0.1M, pH4.0) (35:65)	ACN:MeOH: Solución amortiguadora de fosfatos (10 mM, pH 5.5) (1:2:8)	ACN: Solución amortiguadora fosfatos (50mM, pH 3.0) (60:40)	ACN: Solución amortiguadora fosfatos (25mM, pH 4.5) (55:45)	(MeOH:ACN: solución amortiguadora de fosfatos (15mM, pH 5.33) (35:65)	ACN: MeOH: solución amortiguadora de trietilamina pH 3 (15:35:50)
Flujo (mL/min)	1	1	1	1	1.12	1
Longitud de onda (nm)	230	265	254	237	240	237
Intervalo de concentración (µg/mL)	2.1-5.24 HCZ 10-20.1 LSK	2-30 HCTZ 10-20 LSK	1-80	1-20	5-0.5	X
Tiempo de retención (min)	5.8 HCTZ 6.5 LSK	3.45 HCTZ 6.10 LSK	2.79	4.3	4	X
Referencia	(15)	(21)	(3)	(20)	(29)	(45)

Las condiciones cromatográficas que generaron los mejores resultados y con las que se llevó a cabo el análisis de las muestras fueron:

3.3.1 Condiciones cromatográficas finales

- Fase móvil: ACN: Solución de trietilamina pH 3 (35:65) v/v%
- Columna: Lichrospher RP-18EC, 150mm x 4.6 mm, 5 µm
- Flujo: 1.2 mL/min
- Longitud de onda: 240nm, detector ultravioleta
- Presión: 80Kgf/m²
- Volumen de inyección: 20µL
- Temperatura ambiente del automuestreador y de la columna
- Tiempo de corrida: 10 min

3.4 Uniformidad de contenido para la evaluación del producto piloto

Para la realización de esta prueba se seleccionaron 10 cápsulas las cuales contenían 2 tabletas conteniendo losartán, una tableta conteniendo amlodipino y una tableta conteniendo hidroclorotiazida.

La uniformidad de contenido se evaluó para cada cápsula y analito por separado siguiendo la metodología que plantea la USP XXXI ⁽⁴⁵⁾.

Para la valoración de las tabletas de losartán:

- Para las muestras, pesar las dos tabletas que equivalen a 50mg de losartán. Calcular el equivalente a 10 mg de losartán y pesar la cantidad correspondiente de polvo. Transferir a un matras de 25mL y disolver con metanol, tomar una alícuota de 5mL y transferir a un matras aforado de 10mL. Llevar a volumen con metanol. La concentración final de esta solución es de 200µg/mL.

- Para el estándar pesar el equivalente a 10mg de Losartán, transferir a un matraz aforado de 50mL y disolver con metanol. La concentración del estándar es de 200µg/mL.

Para la valoración de las tabletas de amlodipino:

- Para las muestras, moler individualmente las tabletas de amlodipino y transferir todo el polvo a un matraz de 25 mL disolver y aforar con una solución de trietilamina de pH 3: metanol:acetonitrilo (50:35:15) v/v%. Tomar una alícuota de 5mL y transferir a un matraz de 25mL, llevar a volumen con la misma solución. La concentración final de esta solución es de 40µg/mL.
- Para la preparación del estándar, pesar el equivalente a 10mg de amlodipino, transferir a un matraz de 50 mL y disolver con la misma solución con la que se disuelven las muestras. Tomar una alícuota de 10mL y transferir a un matraz de 50mL, llevar a volumen con la misma solución anterior. La concentración final es de 40µg/mL.

Para la valoración de las tabletas de hidroclorotiazida:

- Para las muestras, moler individualmente las tabletas de hidroclorotiazida presente en la cápsula y transferir todo el polvo a un matraz de 25mL. Adicionar 10mL de una solución de fosfato monobásico de sodio 0.1 M :ACN (9:1) ajustar la mezcla a un pH de 3. Sonicar por 5 minutos. Adicionar otros 10mL de solución y volver a sonicar por 10 minutos. Aforar el matraz. Filtrar la solución, desechar los primeros 10 mL del filtrado. Tomar una alícuota de 3 mL, transferir a un matraz de 10 mL y llevar a volumen con la misma solución. La concentración final es de 150µg/mL.
- Para el estándar, seguir el mismo procedimiento que se llevó a cabo para las muestras. La concentración final de la solución estándar debe ser de 150µg/mL.

Las soluciones de las diferentes muestras y de los estándares, se colocaron en viales y se inyectaron en el cromatógrafo directamente utilizando las fases móviles especificadas como: ACN: ácido fosfórico 0.1% (40:60) para el losartán, MeOH:ACN:triethylamina (15:35:50) para el amlodipino y Solución de fosfato monobásico de sodio:ACN (9:1).

3.5 Validación del método analítico para la cuantificación del producto en medio biorrelevante FaSSIF

La validación del método analítico se realizó de acuerdo a los parámetros que pide la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. Los parámetros se establecen en el apartado correspondiente a validación de métodos analíticos para perfiles de disolución. ⁽²³⁾

3.5.1 Validación del sistema

Preparación de la curva de calibración

Preparación de soluciones estándar de los tres analitos

Solución estándar de Besilato de Amlodipino

Pesar exactamente 0.0138g de besilato de amlodipino estándar de referencia, equivalente a 10mg de amlodipino. Transferir a un matraz aforado de 50 mL. Disolver con 3 mL de metanol y aforar con agua desionizada. La concentración final de esta solución es de 200 µg/mL de amlodipino.

Solución estándar de Hidroclorotiazida

Pesar exactamente 0.0125 g de hidroclorotiazida estándar de referencia. Transferir a un matraz de 25 mL. Disolver con 2 mL de acetona. Aforar con agua desionizada. La concentración final de esta solución es de 500 µg/mL de hidroclorotiazida.

Solución estándar de Losartán, Amlodipino e Hidroclorotiazida para la preparación de la curva patrón

Pesar exactamente 0.0109 g del estándar de losartán potásico, equivalente a 10mg de losartán, transferir a un matraz aforado de 50 mL el cual contiene 5 mL de la solución estándar de besilato de amlodipino (200µg/mL) y 5 mL de la solución estándar de hidroclorotiazida (500 µg/mL). Aforar con el medio biorrelevante FaSSIF.

La concentración final de esta solución es de 200µg/mL de losartán/ 20 µg/mL de amlodipino / 50 µg/mL de hidroclorotiazida.

A partir de esta última solución tomar diferentes alícuotas para la preparación de la curva de calibración, tal y como se muestra en la figura 3. Aforar a 10 mL con el medio biorrelevante FaSSIF.

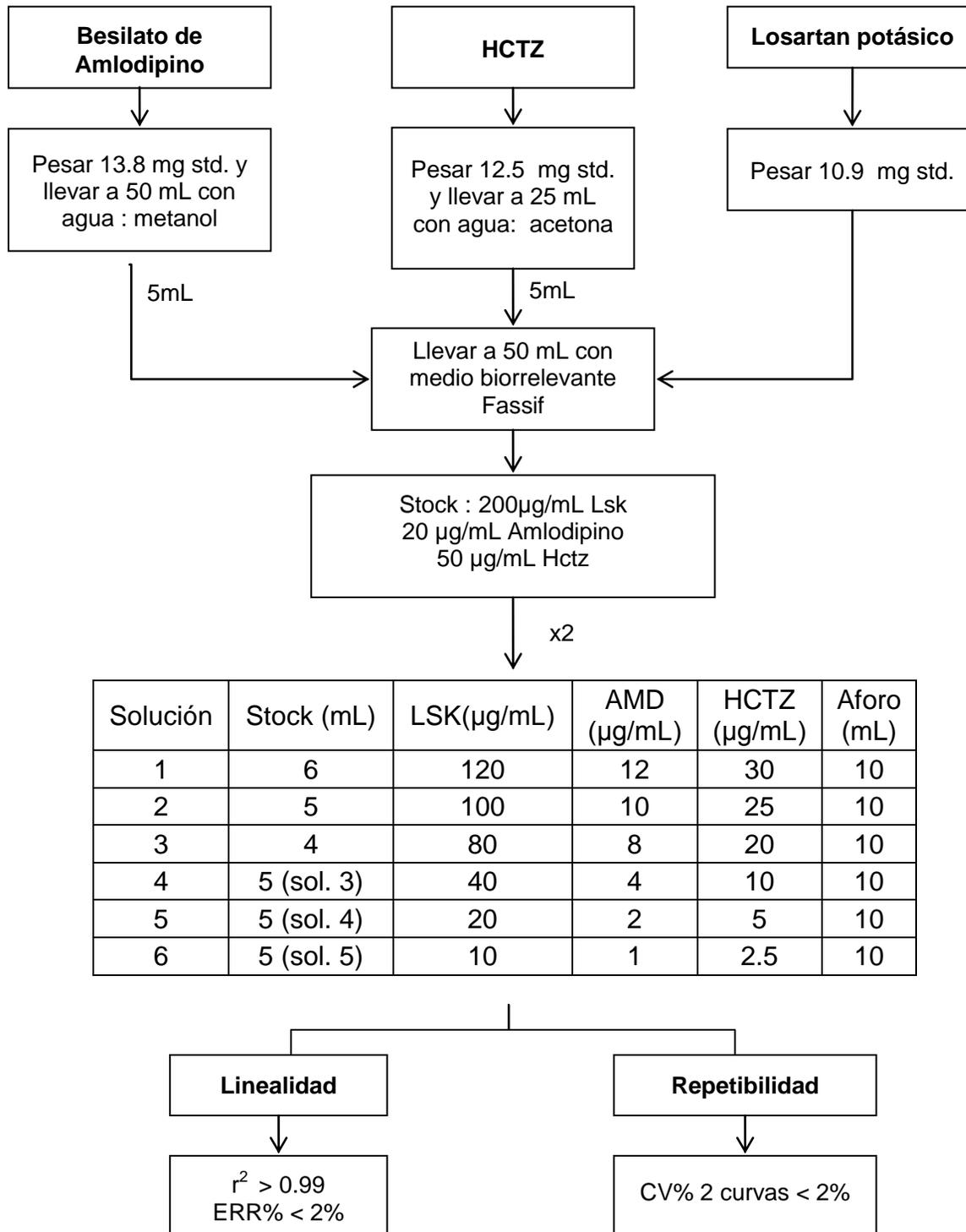


Figura 3. Procedimiento para la preparación de la curva de calibración

3.5.1.1 Linealidad del sistema

La linealidad es la capacidad que tiene un método analítico de obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra en un intervalo de trabajo.

Para evaluar la linealidad del sistema, preparar 2 curvas patrón de los analitos en el medio FaSSIF, en el intervalo de concentraciones establecido (figura 3).

Criterios de aceptación

Se debe demostrar una linealidad del sistema con al menos cinco puntos (excepto el cero) por duplicado, con un coeficiente de determinación (r^2) mayor o igual que 0.99 y un error relativo debido a la regresión (ERR%) no mayor que el 2%.

3.5.1.2 Precisión del Sistema (repetibilidad)

La precisión es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto.

Para evaluar la precisión del sistema calcular el factor de respuesta, dividiendo la respuesta obtenida para cada uno de los puntos de la curva (altura de los picos) entre su concentración correspondiente a partir de los datos de linealidad del sistema. Calcular el coeficiente de variación (CV%) para ambas curvas patrón.

Criterios de aceptación

De los datos de linealidad se debe demostrar que el CV% del factor de respuesta no sea mayor que el 2%.

3.5.2 Validación del Método

Preparación de la curva de calibración

Preparación de soluciones de los tres analitos a partir del producto piloto.

Del producto piloto, pesar de forma independiente 3 cápsulas conteniendo 4 tabletas en su interior, vaciarlas y pesarlas nuevamente. Calcular el peso promedio del contenido de las cápsulas.

Moler las tabletas contenidas en las 3 cápsulas. Pesar el equivalente a 10mg de losartán/1mg de amlodipino/2.5mg de hidroclorotiazida del polvo del producto. Transferir a un matraz aforado de 50mL. Aforar con medio biorrelevante Fassif.

La concentración final de esta solución es de 200µg/mL de losartán/ 20 µg/mL de amlodipino / 50 µg/mL de hidroclorotiazida.

A partir de esta última solución tomar diferentes alícuotas para la preparación de la curva de calibración, tal y como se mostró en la figura 3 (validación del sistema). Aforar a 10 mL con el medio biorrelevante FaSSIF.

3.5.2.1 Linealidad del Método

Para evaluar la linealidad del método, preparar 3 curvas patrón de los analitos a partir del producto piloto en el medio de disolución FaSSIF, en el intervalo de concentraciones establecido. De las tres curvas patrón, calcular el coeficiente de determinación(r^2), pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el error relativo debido a la regresión (ERR%).

Criterios de aceptación

El método debe demostrar una linealidad con al menos 5 puntos (que incluya los puntos extremos excepto el cero) por triplicado, con una r^2 mayor o igual que 0.99 y un ERR% no mayor que el 3%.

3.5.2.2 Precisión del método

La precisión del método se determina como repetibilidad y reproducibilidad.

La repetibilidad expresa la variación de un mismo analista, obtenida de determinaciones independientes y realizadas bajo las mismas condiciones. Ésta se calcula con el CV% para cada concentración de las 3 curvas correspondientes a linealidad del método.

La reproducibilidad expresa la variación de determinaciones independientes realizadas en diferentes condiciones de análisis, ya sean diferentes días de análisis, equipos o analistas. Se calcula el CV% para cada concentración de las 6 curvas de calibración; 3 de las cuales corresponden a un día de análisis y las otras 3 a un día diferente.

Criterios de aceptación

Repetibilidad. El CV% del porcentaje de recuperación de los datos de linealidad no debe ser mayor que el 3%.

Reproducibilidad. El CV% global para las 6 curvas patrón analizadas bajo condiciones diferentes no debe ser mayor que el 3%.

3.5.2.3 Exactitud del Método

Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor nominal. Se evalúa por medio del cálculo de la desviación estándar absoluta (DEA%) a partir de los datos obtenidos de 3 curvas de calibración.

Cálculo DEA%:

$$\text{DEA\%} = \frac{(\text{Concentración nominal}) - (\text{concentración experimental})}{(\text{Concentración nominal})} \times 100$$

Criterios de aceptación

El promedio de los datos de linealidad expresados en concentración no deben variar con respecto a la cantidad nominal en más de 3% en cada punto.

3.5.2.4 Estabilidad

Determinar las condiciones de temperatura y tiempo, en las que el compuesto permanece estable.

Temperatura ambiente en el cromatógrafo/4 h; Refrigeración/12h

Preparar por duplicado una solución de concentración al 100% de los analitos (100µg/mL de losartán/ 10 µg/mL de amlodipino / 25 µg/mL de hidroclorotiazida). Colocar esta solución en 4 viales diferentes. Conservar 2 viales en refrigeración (2-8°C) y colocar los otros 2 viales dentro del cromatógrafo.

Procesar las muestras a los tiempos de 0 a 4 h a temperatura ambiente y 0, 2, 4, 8 y 12 h en refrigeración.

Temperatura en baño a 37°C/120min

Para evaluar la estabilidad de los analitos preparar por duplicado una solución al 100% de 100µg/mL de losartán/ 10µg/mL de amlodipino / 25 µg/mL de hidroclorotiazida a partir del estándar de referencia. Transferir a un tubo de ensaye y colocar en un baño a 37°C.

A partir de esta solución tomar alícuotas de 1mL a los tiempos de muestreo de: 0, 10, 20, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos. Analizar las muestras directamente en el cromatógrafo.

Criterios de aceptación

El coeficiente de variación global de las muestras evaluadas bajo las diferentes condiciones establecidas, debe ser menor al 2%

3.5.2.5 Influencia del Filtro

Evaluar este parámetro mediante la preparación de una solución de concentración al 100% (100µg/mL de losartán/ 10 µg/mL de amlodipino / 25 µg/mL de hidroclorotiazida).

Tomar 25mL de la solución estándar de losartán, amlodipino e hidroclorotiazida (200µg/mL de losartán/ 20 µg/mL de amlodipino / 50 µg/mL de hidroclorotiazida).

Transferir a un matraz aforado de 50mL. Aforar con medio biorrelevante FaSSIF.

A partir de esta solución tomar una muestra sin filtrar y colocar en un tubo de ensaye.

Posteriormente tomar una muestra de 3 mL con el muestreador y un filtro de teflón de 35µm y colocar en otro tubo de ensaye. Repetir este procedimiento 6 veces utilizando el mismo muestreador con el mismo filtro de teflón.

De los tubos de ensaye tomar 1mL y colocarlo en un vial para ser procesados.

Criterios de aceptación

El porcentaje retenido del promedio de las muestras filtradas no debe ser mayor al 4%

3.5.2.6 Selectividad

Para evaluar este parámetro, se prepararon las siguientes soluciones, las cuales se inyectaron directamente al cromatógrafo:

- Fase Móvil: Acetonitrilo (ACN): Solución de trietilamina pH 3 (35:65)
- Medio FaSSIF
- Estándares de los 3 analitos en medio FaSSIF en una concentración al 120% (120µg/mL de losartán/ 12 µg/mL de amlodipino / 30 µg/mL de hidroclorotiazida)
- Producto piloto de los 3 analitos en medio FaSSIF en una concentración al 120% (120µg/mL de losartán/ 12 µg/mL de amlodipino / 30 µg/mL de hidroclorotiazida)

Criterio de aceptación

No debe haber interferencias en la señal cromatográfica de losartán, amlodipino o hidroclorotiazida.

3.6 Determinación de dureza de las tabletas del producto piloto

Se seleccionaron 10 cápsulas del producto piloto al azar, las cuáles contenían dos tabletas de losartán, una tableta de amlodipino y una tableta de hidroclorotiazida. Se determinó el peso de cada tableta así como su respectiva dureza.

3.7 Evaluación del perfil de disolución

Se evaluaron los perfiles de disolución de los siguientes productos empleando para ello el medio biorrelevante:

- Producto en combinación piloto losartán 50mg/ hidroclorotiazida 12.5mg/ amlodipino 5mg
- Producto innovador de amlodipino 5mg. NORVAS
- Producto innovador en combinación de losartán 50mg/ hidroclorotiazida 12.5mg. HYZAAR

3.7.1 Condiciones de la disolución y del disolutor

Las condiciones para la realización de los perfiles de disolución fueron:

Aparato: II (paletas)

Velocidad: 100 rpm

Volumen del medio: 500mL, volumen que corresponde al estado de ayuno

Medio de disolución: Medio biorrelevante FaSSIF, (no requiere desgasificación)

Tiempos de muestreo: 10, 20, 30, 45, 60 90 y 120 min

Volumen del muestreo: 3 mL (sin reposición del medio)

Temperatura: 37°C ± 0.5

Análisis

Una vez tomadas las muestras, se colocó 1 mL de cada muestra filtrada en un vial. Y se analizó de acuerdo al método descrito en 3.3.1.

Una vez obtenidos los resultados se interpolaron las alturas obtenidas de las muestras en una curva patrón preparada el mismo día de análisis a partir de los estándares y se calculó la cantidad disuelta de cada analito para cada tiempo de muestreo por cada vaso.

Se calculó la cantidad disuelta para cada tiempo de muestreo, así como el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de condiciones cromatográficas

Para determinar las mejores condiciones cromatográficas se evaluaron principalmente dos parámetros, la proporción de fase orgánica/ fase acuosa y el pH de la solución amortiguadora presentes en la fase móvil.

Los resultados que se obtuvieron al evaluar diferentes proporciones de fase orgánica/ fase acuosa se muestran en las tablas 10, 11 y 12.

En la tabla 10 se muestran los resultados que se obtuvieron con una fase móvil con diferentes proporciones de solución amortiguadora de fosfatos a pH 4 y ACN. En ella se puede observar que al emplear la fase móvil a pH de 4, con una mayor proporción de ACN los tres analitos presentan tiempos de retención bajos, pero la resolución entre los picos de amlodipino y Losartán disminuye. Estas condiciones no se consideraron apropiadas para el análisis de las muestras.

Tabla 10. Comparación en base a la proporción de fase orgánica/fase acuosa de la fase móvil

Fase Móvil			Tiempo de retención			Resolución AMD/LSK	Cromatograma
MeOH	ACN	Solución amortiguadora	HCTZ	AMD	LSK		
0	30	70 Fosfatos pH 4	2.183	14.292	12.85	2.14	
0	35	65 Fosfatos pH 4	1.967	6.192	6.85	1.84	
0	40	60 Fosfatos pH 4	1.758	3.783	4.133	1.45	

En la tabla 11 se observa que al emplear las fases móviles conteniendo metanol, acetonitrilo y una solución amortiguadora de fosfatos de pH 6.5, se obtuvo un pico bien definido con tiempos de retención menores a los 5 minutos para el Losartán. La adición de metanol a la fase móvil no favoreció la definición del pico de amlodipino, pero entre mayor fuera la proporción de metanol en la fase móvil, la resolución entre los picos de HCTZ y LSK aumentaba. La cantidad de ACN presente en la fase móvil influye directamente en el tiempo de retención de los analitos, ya que entre mayor sea la proporción de acetonitrilo, menores son los tiempos de retención. Esto se debe a que los compuestos de interés son solubles en el acetonitrilo favoreciendo su salida de la columna. Con respecto al amlodipino, sin importar la

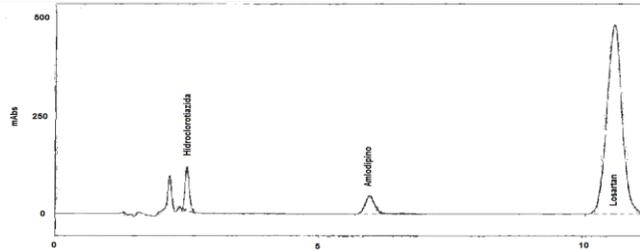
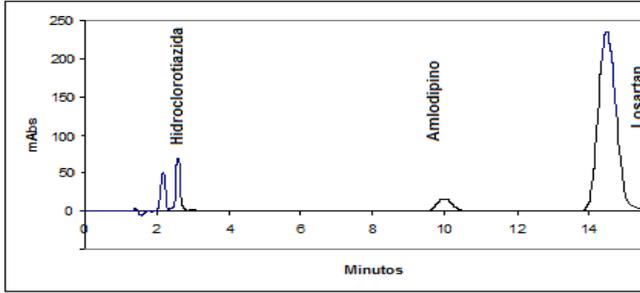
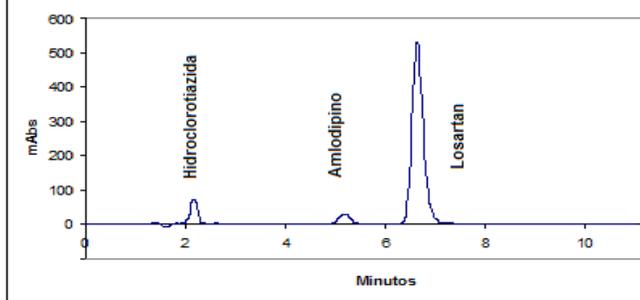
proporción de fase orgánica/fase acuosa de la fase móvil, a pH de 6.5 presenta una respuesta muy baja debido a que se retiene en la columna, por lo que no se alcanza a visualizar un pico definido.

Tabla 11. Comparación en base a la proporción de fase orgánica/fase acuosa de la fase móvil

Fase Móvil			Tiempo de retención			Resolución HCTZ/LSK	Cromatograma
MeOH	ACN	Solución amortiguadora	HCTZ	AMD	LSK		
0	35	65 Fosfatos pH 6.5	1.958	7.933	2.45	4.63	
5	35	60 Fosfatos pH 6.5	2.517	10.5	3.175	5.73	
10	35	55 Fosfatos pH 6.5	2.067	8.817	3.05	8.55	
30	20	50 Fosfatos pH 6.5	1.978	14.111	5.414	10.196	

La tabla 12 muestra los resultados obtenidos al probar diferentes fases móviles conteniendo metanol, acetonitrilo y solución amortiguadora de trietilamina a pH 3. Al emplear estas condiciones, el aumento de la proporción de metanol en la fase móvil no favoreció la definición del pico del amlodipino, sin embargo a este pH, el aumento de la cantidad de metanol y acetonitrilo en la fase móvil provocó una disminución en la resolución entre los picos de amlodipino y Losartán. Con estas condiciones cromatográficas una fase móvil sin metanol presentó la mejor resolución entre los picos. A este pH los picos para todos los analitos se encuentran bien definidos.

Tabla 12. Comparación en base a la proporción de fase orgánica/fase acuosa de la fase móvil

Fase Móvil			Tiempo de retención			Resolución AMD/LSK	Cromatograma
MeOH	ACN	Solución amortiguadora	HCTZ	AMD	LSK		
0	35	65 Trietilamina pH 3	2.5	5.975	10.592	10.85	
5	30	65 Trietilamina pH 3	2.601	10.003	14.495	5.764	
10	35	55 Trietilamina pH 3	2.2	5.202	6.641	2.195	

10	40	50 Trietilamina pH 3	1.965	3.663	4.543	2.524	
15	35	50 Trietilamina pH 3	2.006	5.035	5.622	1.455	
15	30	55 Trietilamina pH 3	2.141	7.559	8.769	2.032	

Con respecto al parámetro de pH de las fases móviles, los resultados de la tabla 13, muestran el efecto del pH sobre la resolución entre los picos y la definición de los picos para los tres analitos. A pH 6.5 se encontró una buena definición del pico de Losartán y un tiempo de retención bajo, debido a que a este pH, la molécula se encuentra ionizada por lo que se solubiliza fácilmente en la fase móvil y no se retiene en la columna. A pH de 4, el amlodipino presenta una mejor respuesta, pero a este pH la resolución entre el pico del amlodipino y del Losartán es baja. La HCTZ tanto para la fase móvil a pH 6.5 y a 4 presenta una buena definición y el mismo tiempo de retención, ya que a cualquiera de estos pH's la molécula se encuentra completamente ionizada y no se retiene en la columna.

La fase móvil que mostró las mejores respuestas en los picos para los tres analitos, con buena resolución entre ellos, fue aquella que contenía una proporción de 35 ACN: 65 solución amortiguadora de trietilamina pH 3. Por lo anterior, se eligió esta fase móvil para llevar a cabo el análisis. En la figura 4 se muestra un cromatograma típico obtenido bajo estas condiciones.

Tabla 13. Comparación en base al tipo de solución amortiguadora utilizada y el pH del mismo

Fase Móvil			Tiempo de retención			Resolución entre los picos más cercanos	Cromatograma
MeOH	ACN	Solución amortiguadora	HCTZ	AMD	LSK		
0	35	65 Fosfatos pH 6.5	1.958	7.933	2.45	4.63	
0	35	65 Fosfatos pH 4	1.967	6.192	6.85	1.84	
0	35	65 Trietilamina pH 3	2.5	5.975	10.592	10.85	

4.1.1 Condiciones cromatográficas finales

- Fase móvil: ACN: Solución amortiguadora de trietilamina pH 3 (35:65)
- Columna: Lichrospher RP-18EC, 150mm x 4.6 mm 5 μ m
- Flujo: 1.2 mL/min
- Longitud de onda: 240nm, detector ultravioleta
- Presión: 80Kgf/m²
- Volumen de inyección: 20 μ L
- Temperatura ambiente del automuestreador y de la columna
- Tiempo de corrida: 10 min

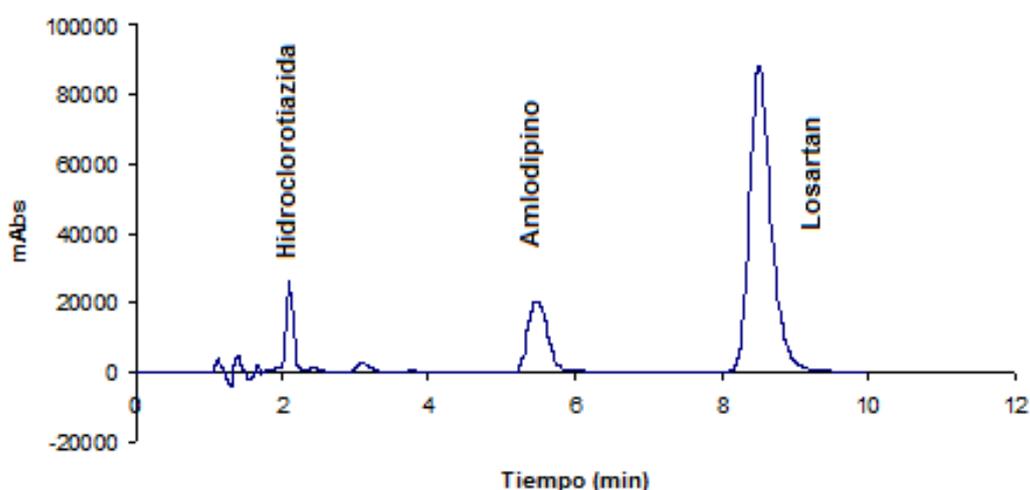


Figura 4. Cromatograma de los tres fármacos (LSK, AMD, HCTZ) utilizando las condiciones cromatográficas elegidas

4.2 Uniformidad de contenido para la evaluación del producto piloto

En la tabla 14 se presentan las especificaciones que marca la USP para los tres fármacos de forma individual, así como los resultados obtenidos. Se puede observar que el producto piloto no cumplió con las especificaciones farmacopeicas. Todos los analitos se encontraron debajo de lo establecido y el CV% fue muy alto, lo cual indica que existe una alta variabilidad con respecto a la uniformidad de contenido de este lote.

Tabla 14. Contenido % presente del principio activo en el producto piloto

	LSK		AMD		HCTZ	
	Altura pico	Contenido %	Altura pico	Contenido %	Altura pico	Contenido %
Estándar	304811	100	78571	100	30463	100
Promedio 10 muestras	205101.5	67.2881	71001.3	90.3658	26912	88.3432
DE	15416.0815	5.0576	4853.0149	6.1766	1937.6640	6.3607
CV%	7.5163	7.5163	6.8351	6.8351	7.2000	7.2000
Especificaciones	98.5-101.0 %		97.0-102.0 %		90-110 %	

4.3 Validación del método analítico para la cuantificación del producto en medio biorrelevante FaSSIF

4.3.1 Validación del sistema

4.3.1.1 Linealidad y Precisión del Sistema (repetibilidad)

En las figuras 5, 6 y 7 se muestra la relación entre respuesta y concentración de los analitos de interés, mientras que en las tablas 15 a 17 se muestran los valores de cantidad recuperada, desviación absoluta, CV% y ERR%, para los tres analitos evaluados, resultantes de las 2 curvas de calibración preparadas en el medio biorrelevante FaSSIF.

Tabla 15. Linealidad y precisión del sistema para cuantificar hidroclorotiazida

Linealidad	Altura del pico		Conc. Experimental [µg/mL]		Factor de respuesta	
	Curva 1	Curva 2	Curva 1	Curva 2	Curva 1	Curva 2
Conc. [mg/mL]						
2.50	2490	2580	2.4195	2.5063	996.00	1032.00
5.00	5002	5226	4.8427	5.0588	999.67	1044.43
10.00	10133	10397	9.7923	10.0470	1013.30	1039.70
20.00	21234	20883	20.5009	20.1623	1061.70	1044.15
25.00	25938	26082	25.0386	25.1775	1037.52	1043.28
30.00	30515	30411	29.4538	29.3535	1017.17	1013.70
m	1034.2465	1023.6605	0.9926		CV%	1.9674
b	-59.9323	147.7754	0.0599			
r²	0.9991	0.9994	0.9993			
ERR%	1.8646		IC (95%)	-0.615 < b < 0.735		

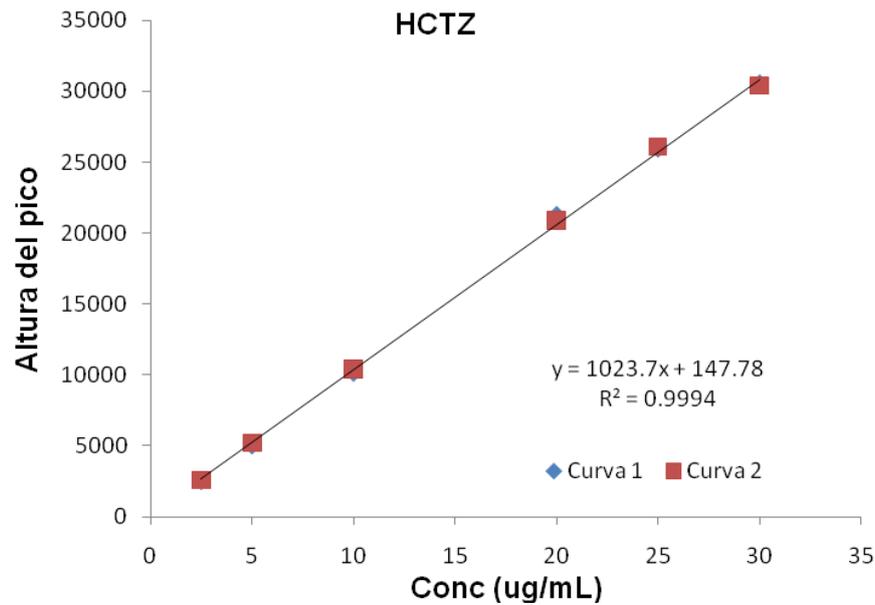


Figura 5. Linealidad del Sistema para la cuantificación de hidroclorotiazida en medio FaSSIF

Tabla16. Linealidad y precisión del sistema para cuantificar losartán potásico

Linealidad	Altura del pico		Conc. Experimental [µg/mL]		Factor de respuesta	
	Curva 1	Curva 2	Curva 1	Curva 2	Curva 1	Curva 2
Conc. [mg/mL]						
10.00	12240	13848	8.3562	8.0308	1224.00	1384.80
20.00	26951	27788	19.9812	19.3606	1347.55	1389.40
40.00	54252	54723	41.5551	41.2522	1356.30	1368.08
80.00	104699	106777	81.4197	83.5593	1308.74	1334.71
100.00	128307	129343	100.0754	101.8999	1283.07	1293.43
120.00	151765	146565	118.6125	115.8972	1264.71	1221.38
m	1246.7140	1208.5506	1.0000		CV%	3.9034
b	3431.3953	6023.5581	0.0000			
r²	0.9994	0.9952	0.9980			
ERR%	2.9568		IC (95%)	-3.948 < b < 5.171		

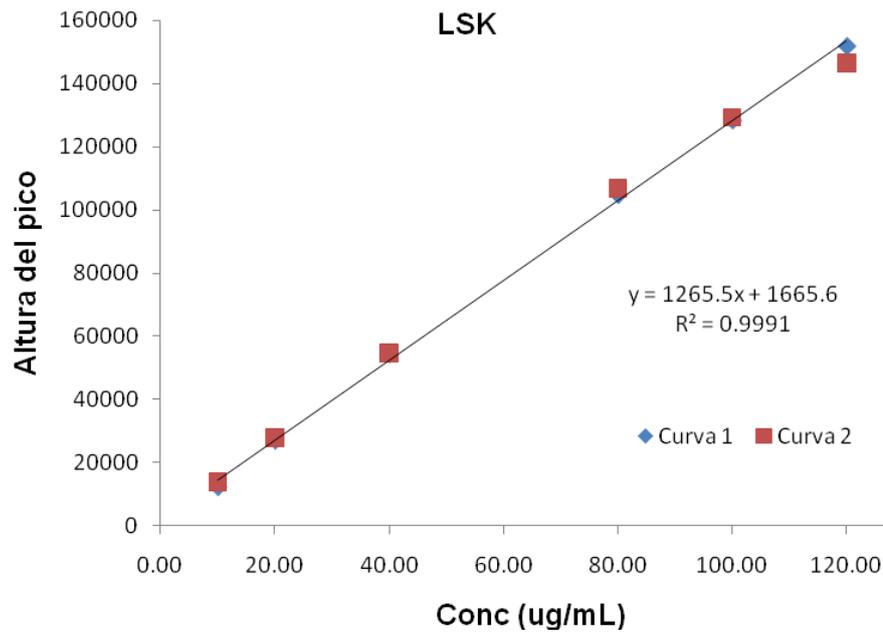


Figura 6. Linealidad del Sistema para la cuantificación de losartán potásico en medio FaSSIF

Tabla 17. Linealidad y precisión del sistema para cuantificar besilato de amlodoipino

Linealidad	Altura del pico		Conc. Experimental [µg/mL]		Factor de respuesta	
	Curva 1	Curva 2	Curva 1	Curva 2	Curva 1	Curva 2
Conc. [mg/mL]						
1.00	2392	2368	0.9589	0.9339	2392.00	2368.00
2.00	4583	4536	1.8879	1.8621	2291.50	2268.00
4.00	9586	9634	4.0094	4.0446	2396.50	2408.50
8.00	19546	19746	8.2328	8.3738	2443.25	2468.25
10.00	24382	23842	10.2834	10.1274	2438.20	2384.20
12.00	27552	27418	11.6276	11.6583	2296.00	2284.83
m	2460.7500	2335.7884	1.0000		CV%	2.4987
b	-205.9500	186.6380	0.0000			
r²	0.9999	0.9971	0.9972			
ERR%	3.4631		IC (95%)	-0.486 < b < 0.582		

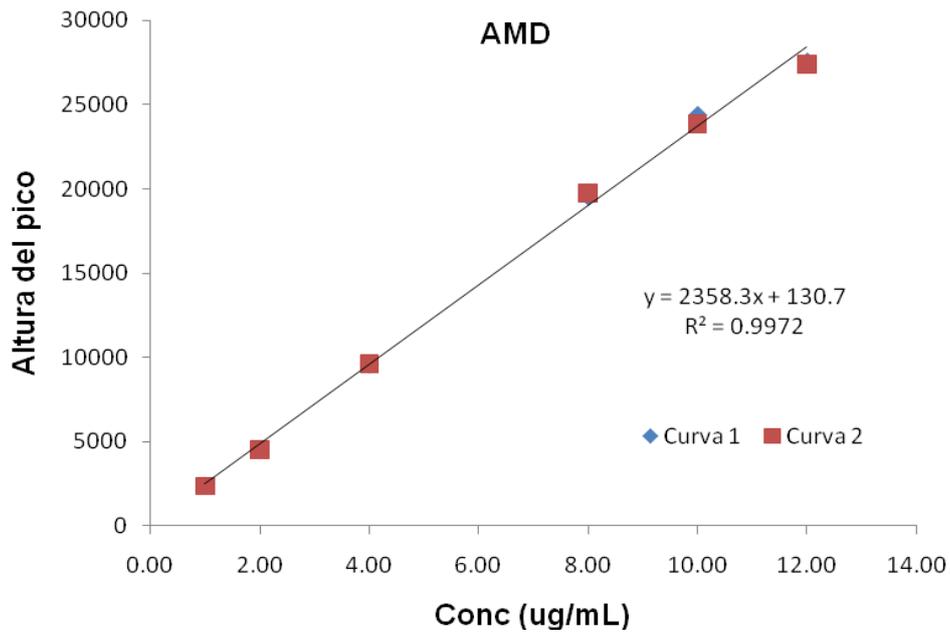


Figura 7. Linealidad del Sistema para la cuantificación besilato de amlodipino en medio FaSSIF

Como se puede observar en las tablas 15 a 17 y en las figuras 5, 6 y 7, el sistema es lineal en el rango de concentraciones utilizadas, ya que para los tres analitos, el coeficiente de determinación (r^2) es mayor a 0.99.

Los datos presentados en las tablas 15 a 17 muestran una relación lineal entre las concentraciones nominales y las experimentales debido a que la pendiente presenta un valor de 1 y la ordenada al origen es de 0.

Para la hidroclorotiazida el sistema cumple con los parámetros de CV%, planteados por la NOM 177 al presentar un valor de 1.9674 %.

Para el losartan y el amlodipino, los valores de CV % obtenidos son 3.9034% y 2.4987% respectivamente, este valor de CV% puede deberse a que el medio biorrelevante FaSSIF posee entre sus componentes tensoactivos y sales minerales que hacen que la viscosidad y densidad del medio sean muy diferentes a las de un medio acuoso.

Los criterios que se consideraron de mayor importancia para la validación del sistema, fueron la pendiente y ordenada al origen calculadas a partir de los datos de concentración experimental vs concentración nominal. Los valores deseables son: 1 para la pendiente (m) y cercano a cero para la ordenada al origen (b). En el caso de la hidroclorotiazida la ordenada al origen fue de 0.0599, por lo que se calculó el intervalo de confianza (IC) para aceptar la

linealidad del sistema. El intervalo de confianza fue de $-0.615 < b < 0.735$, por lo que el valor de 0.0599 se acepta.

4.3.2 Validación del Método

4.3.2.1 Linealidad y Repetibilidad del Método

Los datos obtenidos a partir de las curvas generadas a partir del producto piloto para validar el método analítico, se muestran en las tablas 18, 19 y 20 y en las figuras 8, 9 y 10.

Tabla 18. Linealidad y Repetibilidad del método para la cuantificación de la hidroclorotiazida

Conc.($\mu\text{g/mL}$)	Linealidad		Precisión (Repetibilidad)	
	Altura promedio pico		Día II	
	Día I	Día II	DE	CV%
2.20	2295	2117	0.0109	0.4993
4.41	4577	4308	0.0387	0.8881
8.83	9227	8857	0.0030	0.0337
17.66	18257	17830	0.0810	0.4566
26.48	26641	26590	0.2401	0.9087
m	1005.8580	1010.0302		
b	213.7289	-94.9864		
r²	0.9996	0.9999		
ERR%	0.9940			

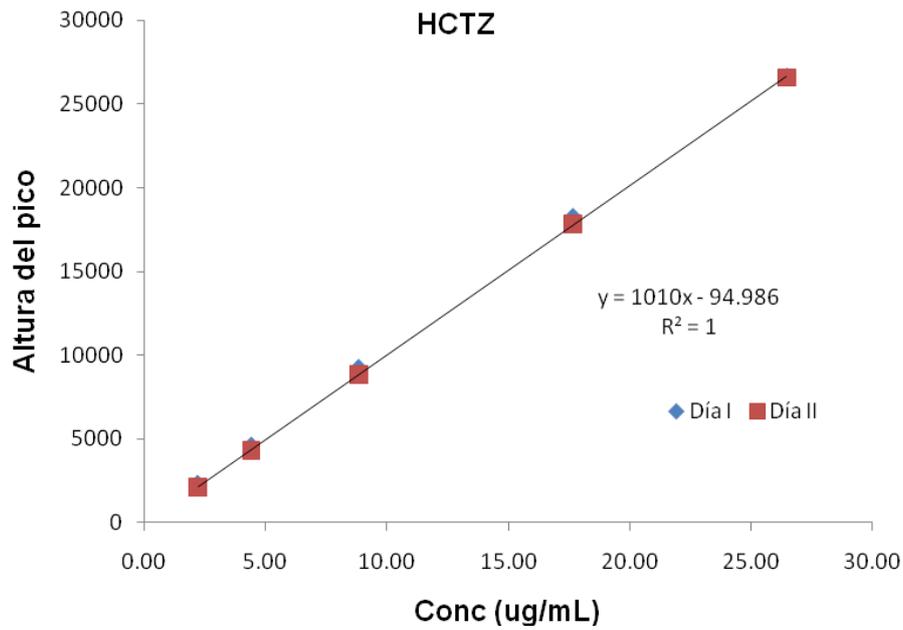


Figura 8. Linealidad del método para la cuantificación de hidroclorotiazida en medio biorrelevante

Tabla 19. Linealidad y Repetibilidad del método para la cuantificación de losartán potásico

Conc.(µg/mL)	Linealidad		Precisión (Repetibilidad)	
	Altura promedio pico		Día I	
	Día I	Día II	DE	CV%
7.02	7482	7315	0.1941	2.8151
14.05	15634	15495	0.015	0.1072
28.09	31382	31542	0.1589	0.5677
56.19	63615	64185	0.0924	0.1624
84.28	96974	96926	1.6797	2.0033
m	1155.8259	1159.5030		
b	-818.4521	-882.7100		
r²	0.9999	1.0000		
ERR%	2.1139			

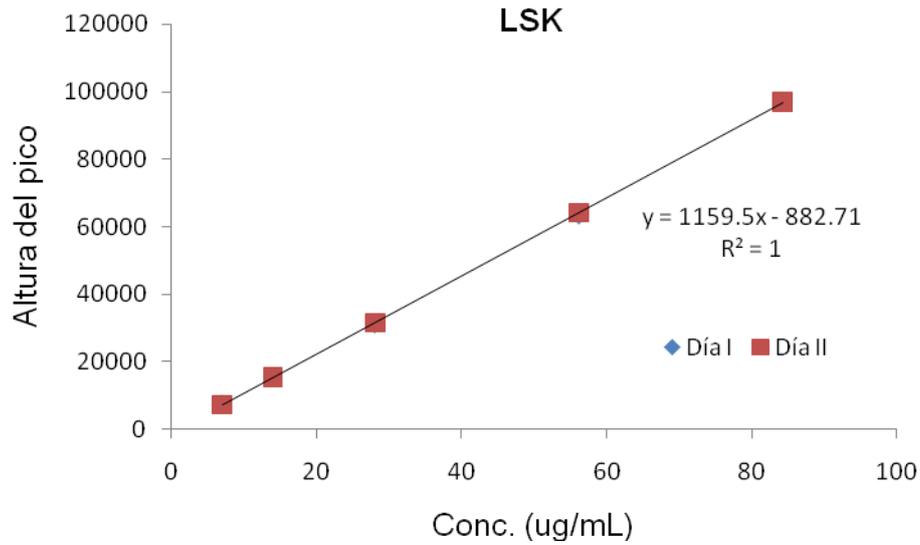


Figura 9. Linealidad del método para la cuantificación de losartan potásico en medio biorrelevante

Tabla 20. Linealidad del método para la cuantificación de Besilato de Amlodipino

Conc.($\mu\text{g/mL}$)	Linealidad		Precisión (Repetibilidad)	
	Altura promedio pico		Día II	
	Día I	Día II	DE	CV%
0.9	1804	1813	0.0102	1.2029
1.81	3526	3532	0.031	1.7459
3.61	7054	7071	0.0273	0.7454
7.22	14031	14089	0.0823	1.1191
10.84	20203	19878	0.0617	0.574
m	1863.6969	1836.0380		
b	235.8413	323.7115		
r²	0.9992	0.9982		
ERR%	1.9597			

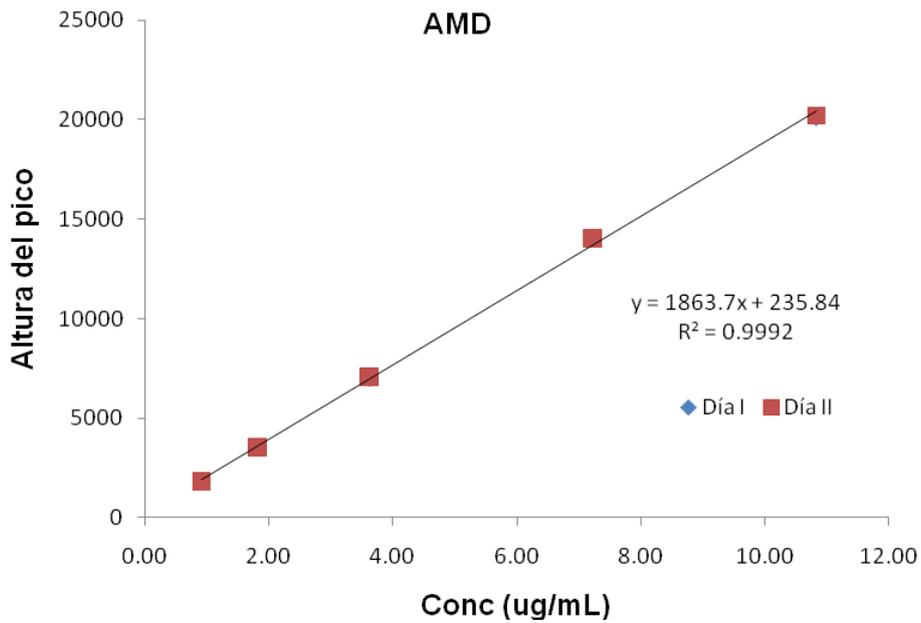


Figura 10. Linealidad del método para la cuantificación de besilato de amlodipino en medio biorrelevante.

El método es lineal y repetible en el rango de concentraciones evaluado para los 3 principios activos, debido a que, el coeficiente de determinación (r^2) es mayor a 0.99, el error relativo debido a la regresión es menor al 3% y el CV% para las 3 curvas preparadas en un día presenta valores menores del 3% a partir de los valores de concentración experimental.

Estos resultados pueden observarse en las tablas 18, 19 y 20.

4.3.2.2 Precisión (reproducibilidad) del método

En las tablas 21, 22 y 23, se presentan los valores promedio de las concentraciones experimentales de las 6 curvas patrón realizadas empleando la forma farmacéutica. Las primeras 3 curvas realizadas en un día de análisis y las otras 3 curvas realizadas en un segundo día de análisis. En ellas se puede observar que el método analítico es reproducible para los tres principios activos, ya que los valores de coeficiente de variación fueron menores a 3%.

Tabla 21. Reproducibilidad del método para la cuantificación de hidroclorotiazida

Conc.(µg/mL)	Reproducibilidad		
	Conc. Experimental (µg/mL) Promedio día 1 y día 2	DE	CV%
2.20	2.1298	0.0616	2.8927
4.41	4.3487	0.0809	1.8597
8.83	8.9119	0.0766	0.8595
17.66	17.8427	0.1369	0.7674
26.48	26.3468	0.1705	0.6473

Tabla 22. Reproducibilidad del método para la cuantificación de losartán potásico

Conc.(µg/mL)	Reproducibilidad		
	Conc. Experimental (µg/mL) Promedio día 1 y día 2	DE	CV%
7.02	6.9511	0.1381	1.9862
14.05	13.9894	0.1853	1.3247
28.09	28.0154	0.2544	0.9081
56.19	56.6882	0.6085	1.0734
84.28	83.9904	2.3155	2.7568

Tabla 23. Reproducibilidad del método para la cuantificación de besilato de amlodipino

Conc.(µg/mL)	Reproducibilidad		
	Conc. Experimental (µg/mL) Promedio día 1 y día 2	DE	CV%
0.90	0.8441	0.0143	1.5255
1.81	1.7676	0.0215	1.0972
3.61	3.6545	0.0303	0.7478
7.22	7.3969	0.0721	0.8796
10.84	10.7179	0.0818	0.6889

4.3.2.3 Exactitud del Método

Este parámetro se evaluó mediante el cálculo de la DEA% a partir del promedio de 3 curvas patrón realizadas el mismo día. Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas.

Tabla 24. Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método para la cuantificación de hidroclorotiazida

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. Experimental ($\mu\text{g/mL}$)				DEA%
	Curva I	Curva II	Curva III	Promedio	
2.20	2.1722	2.2009	2.1979	2.1904	0.4386
4.41	4.2068	4.4167	4.4543	4.3593	1.1505
8.83	8.7472	8.9403	8.9017	8.8631	0.3747
17.66	17.5777	17.8598	17.8044	17.7473	0.4943
26.48	26.4507	26.5180	26.2913	26.4200	0.2266

Tabla 25. Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método para la cuantificación de losartán potásico

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. Experimental ($\mu\text{g/mL}$)				DEA%
	Curva I	Curva II	Curva III	Promedio	
7.02	6.6730	6.9939	7.0227	6.8965	1.8078
14.05	13.9745	13.9485	13.9745	13.9658	0.5778
28.09	27.8155	28.1057	28.0730	27.9981	0.3413
56.19	57.0370	56.8957	56.8630	56.9319	1.3239
84.28	84.7892	84.8344	81.9028	83.8421	0.5219

Tabla 26. Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método para la cuantificación de besilato de amlodipino

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. Experimental ($\mu\text{g/mL}$)				DEA%
	Curva I	Curva II	Curva III	Promedio	
0.90	0.8934	0.9667	0.9337	0.9313	3.1292
1.81	1.7654	1.8152	1.8270	1.8025	0.1913
3.61	3.5537	3.5280	3.6382	3.5733	1.0715
7.22	7.1196	7.2601	7.3172	7.2323	0.1154
10.84	10.8328	10.9134	10.7785	10.8416	0.0513

Como se puede observar en las tablas 24, 25 y 26, los valores correspondientes a las concentraciones experimentales son muy cercanos a los valores de las concentraciones nominales, por lo que se considera el método exacto para los tres analitos.

La hidroclorotiazida (tabla 24) y el losartán (tabla 25), presentan una desviación estándar absoluta (DEA%) menor al 3% para todo el intervalo de

concentraciones. Para el amlodipino (tabla 26) se observan valores de DEA% menores al 3% en el intervalo de concentraciones de 1.81 a 10.84 µg/mL.

4.3.2.4 Estabilidad

Para evaluar este parámetro se monitoreó la respuesta de cada uno de los analitos presentes en una muestra por CLAR a diferentes tiempos.

En la tabla 27 se reporta el porcentaje de recobro y las alturas de los picos obtenidos de dos muestras que permanecieron dentro del cromatógrafo a temperatura ambiente.

En la tabla 28 se presentan los mismos datos con la diferencia de que las dos muestras se conservaron en refrigeración.

La figura 11 muestra el monitoreo de estabilidad de las muestras bajo las distintas condiciones de almacenamiento.

De acuerdo a los resultados presentes en las tablas 27 y 28, en el medio biorrelevante FaSSIF, las muestras presentaron mejor estabilidad almacenándose en refrigeración hasta las 12 horas, debido a que los valores de CV% fueron menores al 2% para los 3 compuestos. Al almacenar las muestras a temperatura ambiente, el losartán, la hidroclorotiazida y el amlodipino se mantienen estables hasta las 4 horas de almacenamiento ya que presentan valores de CV% menores al 2%.

Esta evaluación de la estabilidad nos indicó que deben refrigerarse las muestras en caso de que el tiempo de análisis sea muy prolongado. Las muestras deben de analizarse antes de las 4 horas si van a permanecer a temperatura ambiente.

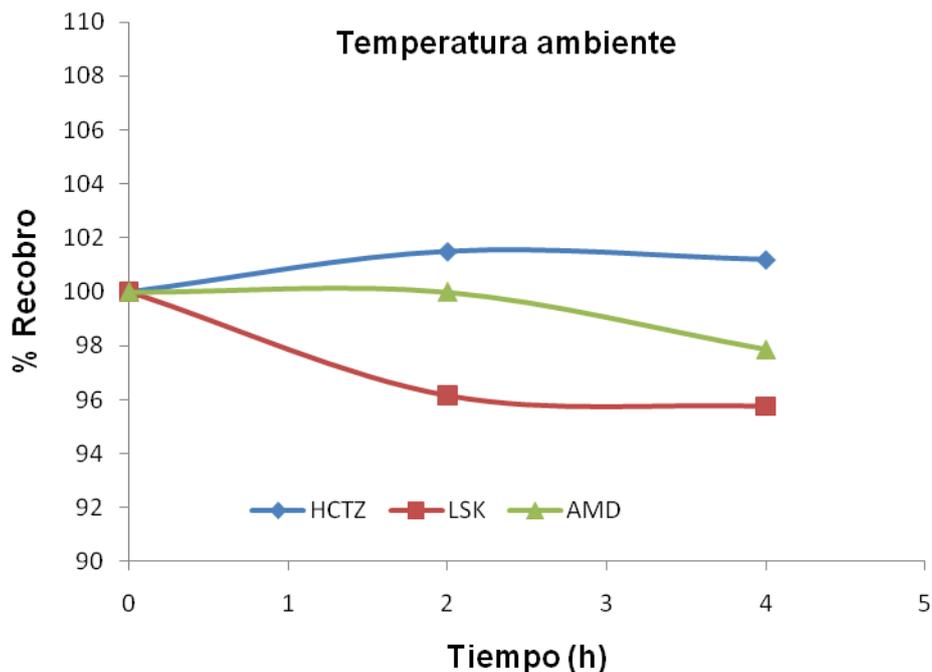
4.3.2.4.1 Estabilidad de las muestras a temperatura ambiente en el cromatógrafo/4h y en refrigeración/12h

Tabla 27. Estabilidad de las muestras a temperatura ambiente

Temperatura ambiente/Cromatógrafo						
Tiempo(h)	Promedio Altura del pico			% Recobro		
	HCTZ	LSK	AMD	HCTZ	LSK	AMD
0	35259	194734	28485	100	100	100
2	35789	193924	28085	101.5032	99.5840	100.0000
4	35682	189363	27488	101.1997	97.2419	97.8743
X	35576.6667	192673.6667	28019.3333			
DE	280.2612	2895.5846	501.7333			
CV%	0.7878	1.5028	1.7907			

Tabla 28. Estabilidad de las muestras almacenadas en refrigeración

Temperatura (2-8°C)/Refrigeración						
Tiempo(h)	Promedio Altura del pico			% Recobro		
	HCTZ	LSK	AMD	HCTZ	LSK	AMD
0	35356	194023	28434	100	100	100
2	35567	193957	27980	100.5968	99.9660	98.4033
4	35536	194407	28135	100.5091	100.1979	98.9484
8	35474	195977	28211	100.3337	101.0071	99.2157
12	35865	200427	27581	101.4396	103.3006	97.0001
X	35559.6000	195758.2000	28068.2000			
DE	188.8526	2735.2582	317.7290			
CV%	0.5311	1.3973	1.1320			



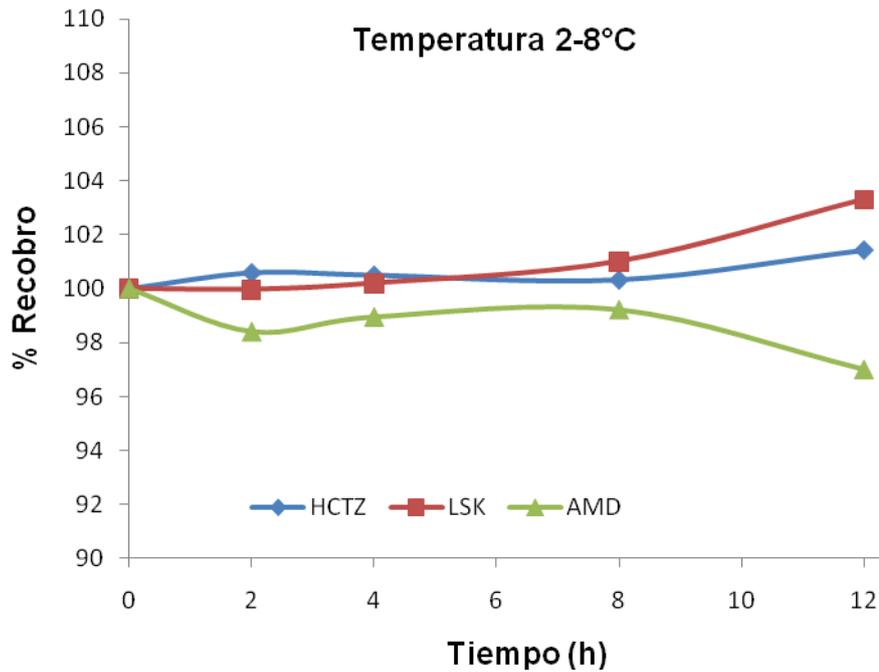


Figura 11. Estabilidad de las muestras bajo diferentes condiciones de almacenamiento

4.3.2.4.2 Estabilidad de las muestras en un baño a 37°C/120min

Con respecto a la estabilidad del estándar para los tres analitos en un baño a temperatura constante de 37°C (tabla 29), se observan CV% por debajo del 2% a las 2 horas, por lo que no hay problemas de estabilidad a esta temperatura, inclusive se observa un aumento en la respuesta de los analitos desde los 10 minutos, que puede ser interpretada como un aumento en la solubilidad del estándar en el medio biorrelevante al ser sometido a una temperatura por arriba de la temperatura ambiente.

Tabla 29. Estabilidad de los estándares a 37°C

Tiempo (min)	X Alturas de los picos			% Recobro		
	HCTZ	AMD	LSK	HCTZ	AMD	LSK
0	29735	16123	113463.5	100	100	100
10	30114	16506.5	116071.5	101.2746	102.3786	102.2985
20	30201	16495.5	116087.5	101.5672	102.3104	102.3126
30	30390	16773	117381.5	102.2028	104.0315	103.4531
45	30253.5	16807.5	116575.5	101.7437	104.2455	102.7427
60	30123.5	16756.5	116670	101.3065	103.9292	102.8260
90	29819.5	16797.5	116603	100.2842	104.1835	102.7669
120	29549.5	16794	115965.5	99.3762	104.1618	102.2051
X	30023.25	16631.6875	116102.25			
DE	289.4434	242.9810	1159.8277			
CV%	0.9641	1.4610	0.9990			

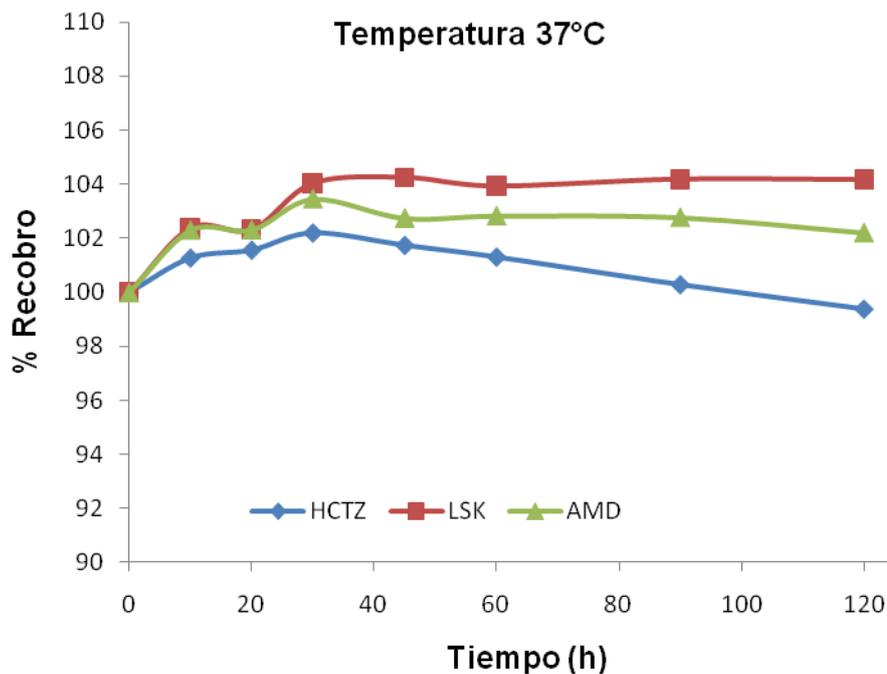


Figura 12. Estabilidad del estándar en baño a 37°C

De acuerdo a los resultados reportados, los tres analitos de interés son estables a las diferentes temperaturas que se evaluaron durante las 2 h que dura el estudio del perfil de disolución.

4.3.2.5 Influencia del Filtro

Los resultados de influencia del filtro se presentan en la tabla 30. En ella se puede observar que el uso del filtro de teflón de 35µm para la toma de muestra en el perfil de disolución, no afecta la cantidad de fármaco cuantificado, ya que se presenta una retención del fármaco en el filtro menor del 4%, por lo que el uso de este tipo de filtros es adecuado para realizar la toma de muestra en el estudio del perfil de disolución.

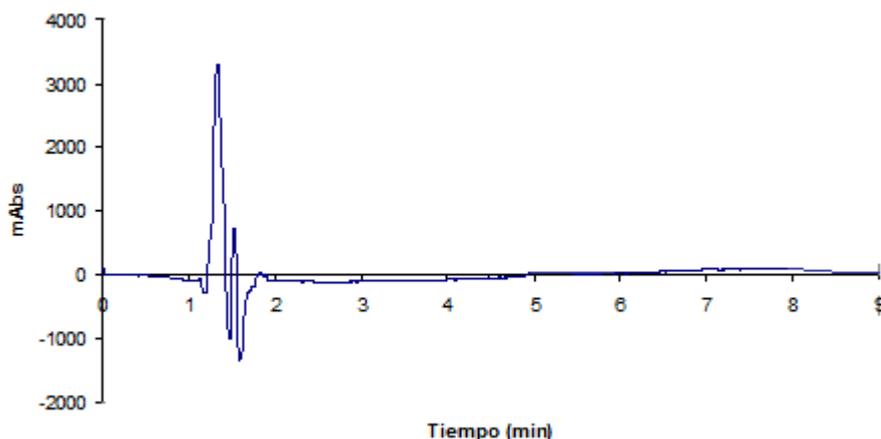
Tabla 30. Evaluación de la influencia del filtro en los tres analitos de interés

Influencia del filtro			
	HCTZ	AMD	LSK
Muestra 100%	25ug/mL	10ug/mL	100ug/mL
Sin filtrar	35031.000	28786.000	187641.000
Filtradas (Teflón 35µm)			
Promedio	34370.500	27749.333	191255.500
DE	287.2294	1142.9145	2962.9205
% CV	0.8357	4.1187	1.5492
% Retenido	1.8855	3.6013	1.9263

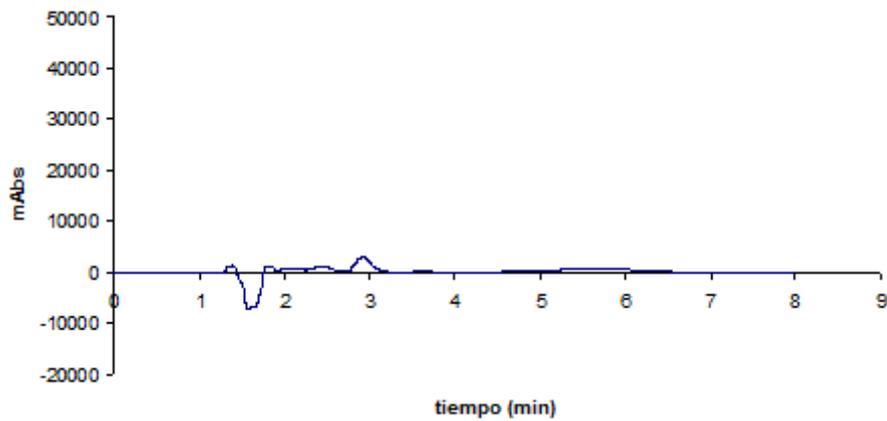
4.3.2.6 Selectividad

Los resultados de selectividad se presentan en la figura 13. En ella se puede observar que no existe interferencia entre los compuestos de interés con los componentes de la formulación o del medio biorrelevante FaSSIF, por lo que el método se considera selectivo.

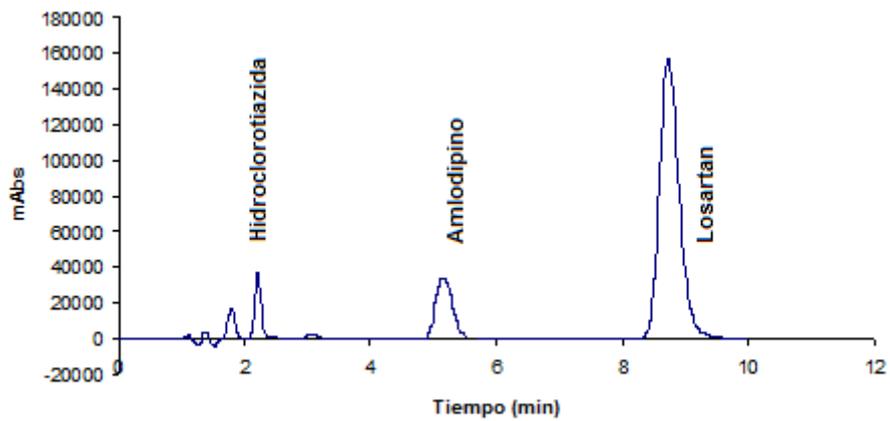
Fase Móvil: ACN: Solución de trietilamina pH 3 (35:65) v/v



Medio Fassif



Estándares de los 3 analitos en medio FaSSIF



Producto piloto (3 principios activos con excipientes) en medio FaSSIF

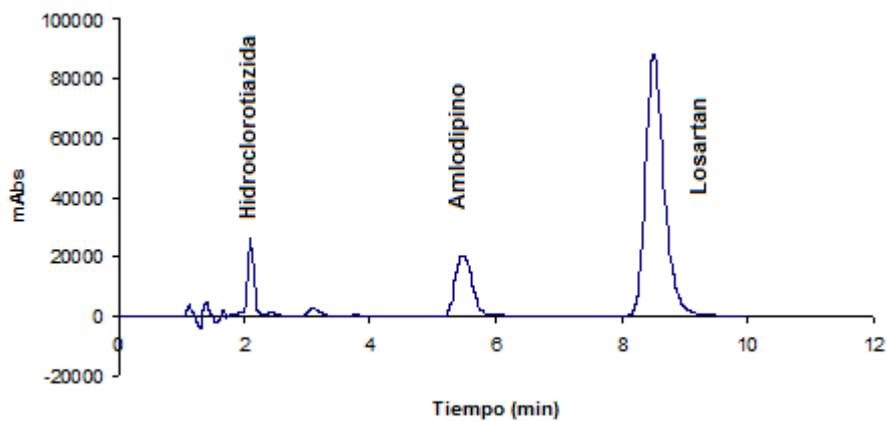


Figura 13. Cromatogramas de las diferentes soluciones inyectadas al cromatógrafo para evaluar la interferencia entre los componentes del producto piloto, la fase móvil y el medio biorrelevante en los 3 analitos de interés

4.4 Determinación de dureza de las tabletas presentes en el producto piloto

En la tabla 31 se muestran los resultados de peso y dureza de las tabletas presentes dentro de las 10 cápsulas que se tomaron como una muestra representativa. Para los 3 analitos se encontró una gran variabilidad en la dureza de las tabletas.

De acuerdo a especificaciones, las tabletas convencionales deben tener una dureza entre los 7 y los 9 KgF, por lo que las únicas tabletas que cumplen con la especificación son las tabletas de hidroclorotiazida.

Comparando las tabletas de los diferentes analitos en relación al peso y a su dureza respectiva, las tabletas de losartán y de hidroclorotiazida son semejantes, ya que su peso se encuentra alrededor de los 0.07 g, sin embargo, la dureza de las tabletas de hidroclorotiazida es 1.4 veces más alta que las de Losartán.

Con respecto a las tabletas de amlodipino, la dureza es semejante a la de las tabletas de losartán, sin embargo el peso las tabletas de amlodipino es 1.35 veces menor con una dureza 1.02 veces mayor.

Tabla 31. Dureza de las tabletas presentes en las cápsulas

Cápsula	Tabletas de LSK				Tabletas de HCTZ		Tabletad de AMD	
	Peso (g)		Dureza (kgF)		Peso (g)	Dureza (kgF)	Peso (g)	Dureza (kgF)
1	0.070	0.076	4.400	6.800	0.070	8.100	0.053	5.300
2	0.070	0.073	4.300	5.500	0.070	7.000	0.052	4.800
3	0.073	0.072	6.400	5.400	0.069	8.300	0.054	6.000
4	0.073	0.071	5.600	4.900	0.069	7.800	0.054	6.000
5	0.071	0.073	4.800	5.400	0.070	7.400	0.054	5.800
6	0.073	0.070	5.400	4.400	0.071	8.500	0.053	5.500
7	0.073	0.069	5.400	4.300	0.069	8.200	0.053	5.200
8	0.072	0.073	5.400	5.600	0.071	6.500	0.054	5.400
9	0.070	0.071	4.600	5.400	0.071	8.200	0.050	4.400
10	0.073	0.072	5.200	5.800	0.070	8.500	0.054	5.200
X	0.072		5.250		0.070	7.850	0.053	5.360
DE	0.002		0.668		0.001	0.675	0.001	0.508
CV	2.296		12.718		1.166	8.603	2.423	9.481

4.5 PERFILES DE DISOLUCIÓN

En las tablas 32 y 33 se reportan los datos del perfil de disolución del producto piloto así como el promedio entre los 6 vasos, la desviación estándar y el CV% respectivo. En la figura 14 se muestran los perfiles de disolución del losartán potásico presente en el producto piloto obtenidos para cada vaso, mientras que en la figura 15 se muestran los perfiles de disolución del besilato de amlodipino presente en el mismo producto piloto.

4.5.1 Perfil de disolución del producto piloto

Tabla 32. Cantidad disuelta de Losartán potásico en el medio biorrelevante

	mg disueltos						
Tiempo (min)	10	20	30	45	60	90	120
Promedio	3.51	12.44	16.88	25.56	34.92	40.46	42.19
DE	4.98	13.25	15.12	13.49	8.02	4.05	2.55
CV (%)	142.04	106.49	89.61	52.78	22.98	10.02	6.04

Tabla 33. Cantidad disuelta de besilato de amlodipino en el medio biorrelevante

	mg disueltos						
Tiempo(min)	10	20	30	45	60	90	120
Promedio	0.10	0.08	0.14	0.29	0.46	1.12	1.47
DE	0.07	0.07	0.15	0.24	0.38	1.32	1.46
CV (%)	65.85	93.89	101.71	80.43	81.46	117.27	98.91

Hay que hacer notar que las tabletas que contenían hidroclorotiazida, no se disgregaron, por lo que no se detectó el fármaco en el medio de disolución.

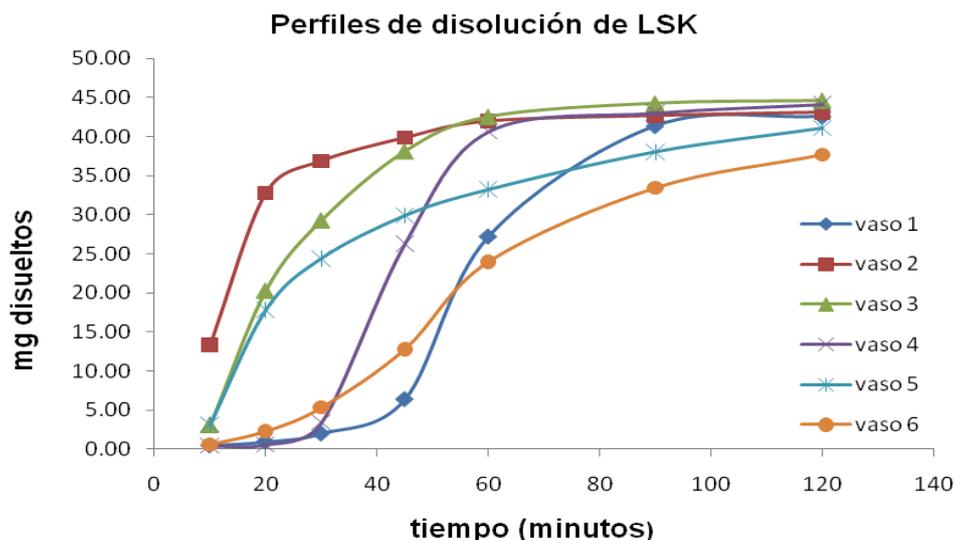


Figura 14. Perfiles de disolución del losartán potásico presente en el producto piloto

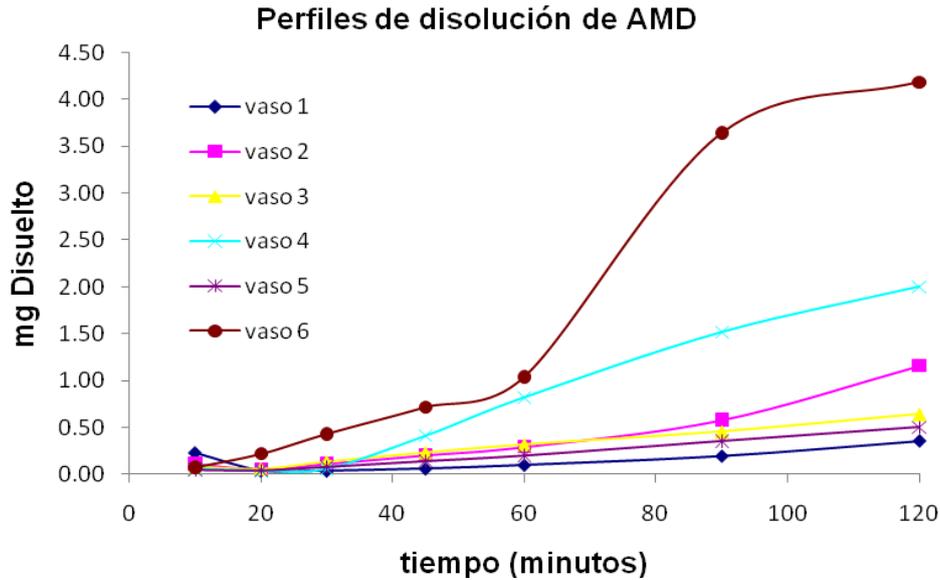


Figura 15. Perfiles de disolución del besilato de amlodipino presente en el producto piloto

Con respecto a los perfiles de disolución del losartán en el producto piloto (tabla 32), se observa una variación muy grande de la cantidad disuelta entre los diferentes vasos del disolutor hasta los 90 minutos de muestreo. En este producto se disuelven 42.10 mg a los 120 minutos.

Con respecto al perfil de disolución del besilato de amlodipino (tabla 33), se observa una disolución muy baja en la mayoría de los vasos, debido a que a los 120 minutos sólo hay 1.47 mg disueltos en promedio.

La diferencia que se observa en los perfiles de disolución entre los vasos de ambos analitos como se observa en las figuras 14 y 15, se adjudica a la variabilidad presente en las tabletas con respecto a su uniformidad de contenido como se mostró en la tabla 14. También puede influir la diferencia en el peso y la dureza de las tabletas contenidas en las cápsulas, como se reportó en la tabla 31. Con respecto a la baja variación en los primeros tiempos de muestreo para el amlodipino, esta se debe a la baja disolución que presentan las tabletas, por lo que no se observa diferencia entre los vasos.

A pesar de que la FDA reporta tiempos de muestreo hasta los 60 minutos, se decidió aumentar el tiempo hasta los 120 minutos, para evaluar algún aumento en la cantidad disuelta ya fuera del amlodipino o de la hidroclorotiazida. Para el amlodipino, la cantidad disuelta se incrementó de 1.12 mg a 1.47 mg disueltos,

mientras que para la hidroclorotiazida no hubo ningún cambio y la tableta no se disolvió en el medio biorrelevante.

La baja disolución de las tabletas de hidroclorotiazida y amlodipino en el medio de disolución se puede deber a los excipientes presentes en la formulación.

4.5.2 Perfiles de disolución de los productos comerciales

Debido a que no existe en el mercado una forma farmacéutica que contenga los tres analitos de interés, se decidió comparar los perfiles de disolución del producto bajo estudio con los productos innovadores, uno conteniendo amlodipino y otro conteniendo losartán en combinación con hidroclorotiazida.

Los resultados, que se presentan en las tablas 34, 36 y 37 y en la figura 16 y 18 muestran que los productos innovadores se disuelven fácilmente en el medio biorrelevante y alcanzan porcentajes de disolución altos desde los primeros tiempos de muestreo.

La evaluación de estos productos comerciales se hizo hasta los 90 minutos debido a que presentaron una rápida disolución en el medio de disolución y no se consideró necesario prolongar el tiempo de muestreo.

4.5.2.1 Perfil de disolución del producto NORVAS

Este medicamento contiene al principio activo amlodipino en una dosis de 5mg.

Tabla 34. Cantidad disuelta de Besilato de Amlodipino, producto innovador, en el medio biorrelevante

Tiempo (min)	mg disueltos					
	10	20	30	45	60	90
Promedio	3.40	3.81	4.10	4.14	4.21	4.24
DE	0.45	0.38	0.48	0.43	0.38	0.40
CV (%)	13.16	10.01	11.75	10.45	9.10	9.52

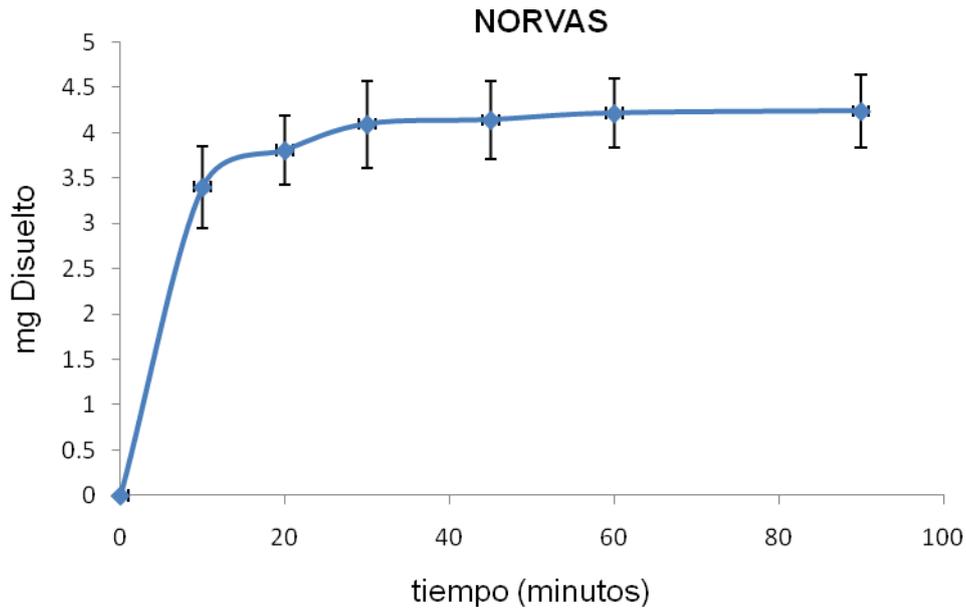


Figura 16. Perfil de disolución amlodipino, producto innovador

De acuerdo a los resultados que se presentan en la tabla 34 y en la figura 16 el producto NORVAS se disolvió rápidamente en el medio biorrelevante, con un 70% equivalente a los 3.4 mg disueltos a los 10 minutos. Rasul Dragica ⁽²⁷⁾, demostró que la disolución de las tabletas de besilato de amlodipino fue rápida y completa en el medio FaSSIF, ya que a los 5 minutos, se disolvió más del 85%. Con los datos obtenidos en este trabajo, se confirma una buena disolución del fármaco (amlodipino) en el medio de disolución FaSSIF.

Comparando el perfil de disolución obtenido para este producto innovador en un medio biorrelevante y en una solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 reportado en la tesis de Soriano Razo Marisol ⁽²⁸⁾ se encontró que la disolución es mayor en el medio FaSSIF que en fosfatos (tabla 35 y Figura 17).

Al comparar los perfiles mediante el cálculo del factor de similitud (F2), se encontró un valor de 48.26 y para el factor de diferencia (F1) un valor de 18.62, lo que indica que los perfiles no son similares.

Tabla 35. Comparación entre el perfil de disolución obtenido con diferentes medios de disolución del producto innovador NORVAS

Tiempo (min)	Fassif pH 6.5		Fosfatos pH 6.8		F2	F1
	% disuelto	CV%	% disuelto	CV%		
10	68.4368	13.2	52.363	17.87	48.2602	18.6239
20	76.5764	10	63.287	10.42		
30	82.3952	11.7	67.702	10.2		
45	83.3302	10.4	73.599	7.36		
60	84.8012	9.1	76.489	6.52		
90	85.2826	9.5				

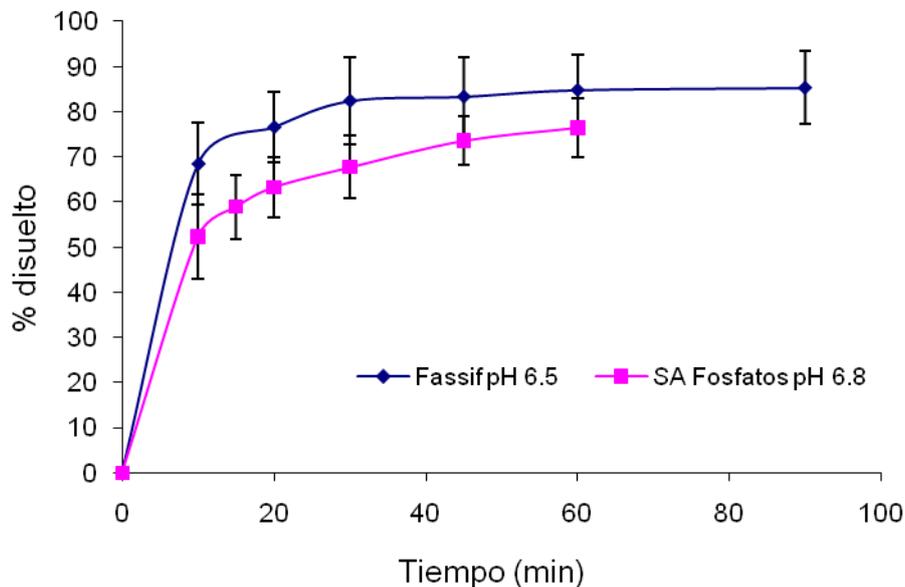


Figura 17. Perfil de disolución de amlodipino en diferentes medios de disolución

4.5.2.2 Perfil de disolución del producto HYZAAR

Los resultados reportados en las tablas 36 y 37 y en la figura 18 nos muestran que el producto innovador que contiene losartán e hidroclorotiazida en combinación también se disuelve rápidamente en el medio biorrelevante.

En la tabla 36 y en la Figura 18 se muestra que la disolución del losartán (LSK) alcanza el 90% (45.53 mg) a los 30 minutos. De esta forma se confirma que se trata de un fármaco de rápida disolución, ya que a los 30 minutos se disolvió más del 85%.

A pesar de que la hidroclorotiazida está clasificada como de baja solubilidad, a los 30 minutos, se disolvió más del 85 % (10.82 mg), lo que indica que en este medio biorrelevante presenta una buena liberación.

Tabla 36. Cantidad disuelta de Losartán potásico en combinación con hidroclorotiazida, producto innovador, en el medio biorrelevante

Losartán Potásico

Tiempo (min)	mg disueltos					
	10	20	30	45	60	90
Promedio	20.15	38.99	45.53	46.85	47.03	47.50
DE	1.35	1.76	1.02	0.55	0.35	0.56
CV (%)	6.71	4.51	2.25	1.18	0.74	1.18

Tabla 37. Porcentaje disuelto de Hidroclorotiazida en combinación con losartán potásico, producto innovador, en el medio biorrelevante

Hidroclorotiazida

Tiempo (min)	mg disueltos					
	10	20	30	45	60	90
Promedio	3.83	8.58	10.82	11.61	11.66	11.69
DE	0.27	0.76	0.45	0.16	0.09	0.15
CV (%)	7.18	8.84	4.20	1.35	0.77	1.32

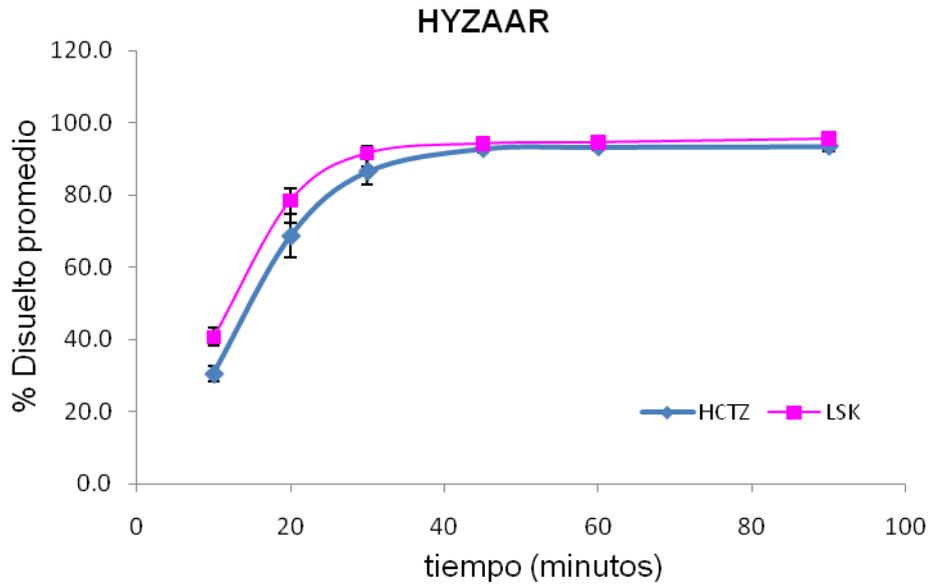


Figura 18. Perfil de disolución del losartán potásico y de hidroclorotiazida presente en el producto de referencia Hyzaar

4.6 Comparación de Perfiles de disolución

En la figuras 19 y 20 se presentan los resultados comparativos entre el producto piloto y los innovadores respectivos. En el caso de las tabletas conteniendo losartán del producto piloto presentó una disolución muy lenta. A pesar de que la prueba se realizó en el mismo medio biorrelevante, a los 30 minutos el producto piloto mostró un 30 % (16.88 mg) disuelto, mientras que el producto innovador a ese tiempo se disolvió en un 90% (45.53 mg). Por lo anterior, el valor de F2 fue muy bajo: 21.19.

Esta diferencia entre los perfiles también puede adjudicarse a que las tabletas del producto piloto que contienen losartán, presentan mucha variabilidad en el contenido del principio activo.

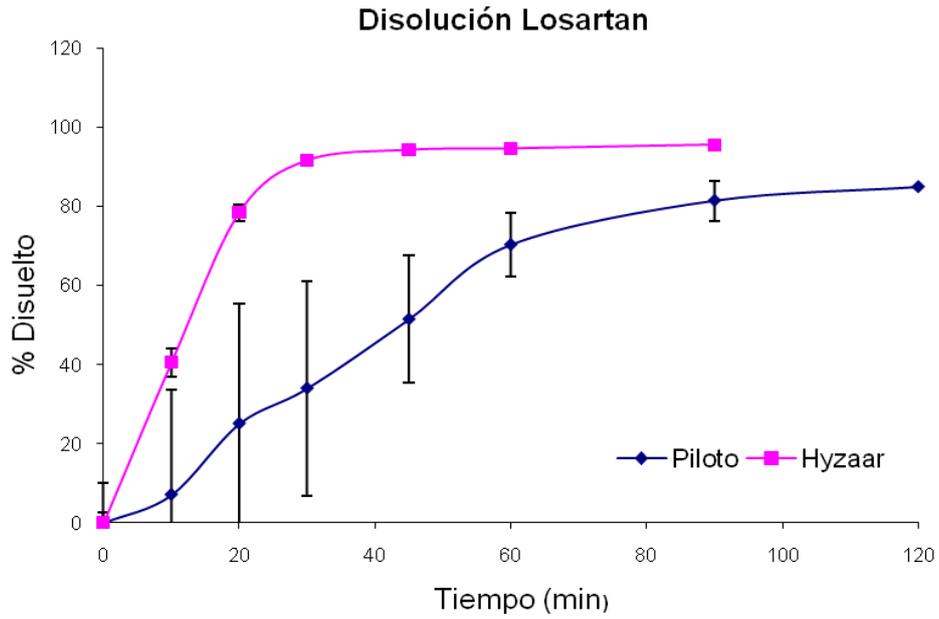


Figura 19 Perfiles de disolución del losartán presente en medicamentos diferentes

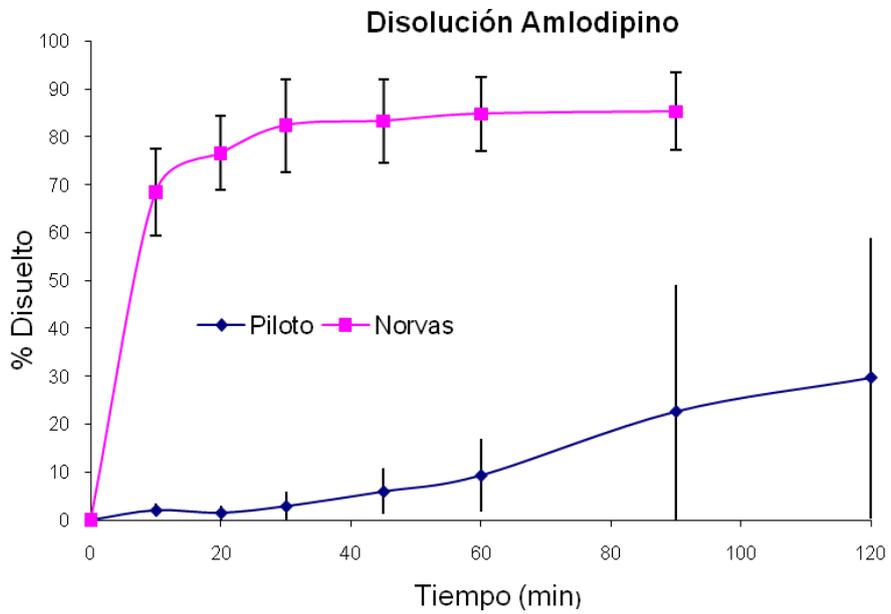


Figura 20. Perfiles de disolución del amlodipino presente en medicamentos diferentes

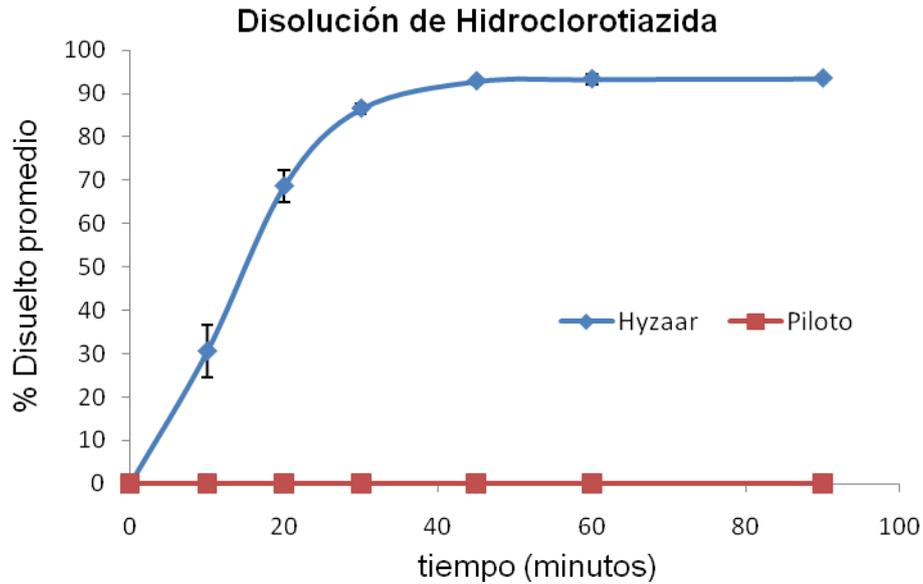


Figura 21. Perfiles de disolución de hidroclorotiazida presente en medicamentos diferentes

De igual manera, se encontraron diferencias en los perfiles de disolución del amlodipino (figura 20). A los 10 minutos el producto innovador presenta un 70% (3.40 mg) disuelto mientras que el producto piloto sólo un 2% (0.10 mg). Esta diferencia se mantiene en todos los tiempos de muestreo. Así, a los 90 minutos, el producto piloto presenta un 22% (1.12 mg) disuelto y el producto innovador un 85% (4.24mg). Esta diferencia se ve reflejada en los valores del factor de similitud (F2) y el factor de diferencia (F1), donde el valor de F2 (8.50) está muy por debajo de 50 y F1 (90.78) muy cercano a 100. Estos valores nos indican que ambos perfiles de disolución son muy diferentes entre si.

Finalmente con respecto a la disolución de la hidroclorotiazida, los perfiles no pueden ser comparados debido a que en el producto piloto, las tabletas que contenían a la hidroclorotiazida no se disgregaron, por lo que este analito no se encontró en el medio de disolución, mientras que la disolución del producto de referencia mostró que a los 30 minutos, más del 85% se había disuelto.

Los resultados del presente estudio muestran que el medio biorrelevante es un buen medio de disolución para losartán, amlodipino e hidroclorotiazida, a pesar de que éste último compuesto se encuentre clasificado como un fármaco de baja solubilidad.

El medio FaSSIF es un medio que se recomienda para la evaluación de la formulación de una forma farmacéutica, ya que simula las condiciones del tracto gastrointestinal en el estado de ayuno y nos muestra de forma indirecta que tan buena disponibilidad se puede obtener de un fármaco que va a ser administrado oralmente. Es por ello que los resultados obtenidos en este medio biorrelevante para el producto piloto, nos indican que la formulación es inadecuada ya que la tableta de hidroclorotiazida no se disgrega, el amlodipino se disuelve en muy baja proporción, el losartán presenta una disolución lenta y se observa una alta variabilidad en los resultados.

4.7 Cinéticas de disolución

El perfil de disolución de losartán presente en el producto piloto se ajustó a la función de Primer orden, por medio del programa Stat Graphics.

La ecuación de primer orden es: $A_{inf} \cdot (1 - \exp(-k_d \cdot \text{tiempo}))$

Donde k_d es la constante de velocidad de disolución de primer orden y A_{inf} es el porcentaje liberado a tiempo infinito.

En la tabla 38 se presentan los valores obtenidos de la constante de disolución de primer orden, el porcentaje liberado a tiempo infinito y el coeficiente de determinación para el losartán presente en el producto piloto.

El perfil de disolución obtenido para el amlodipino no se ajustó a ningún modelo cinético.

Tabla 38. Valores de A_{inf} y K_d obtenidos al ajustar a la ecuación de primer orden el porcentaje disuelto del losartán presente en el producto piloto

	A_{inf}	K_d	r^2
Losartán	109.27	0.01415	97.0273

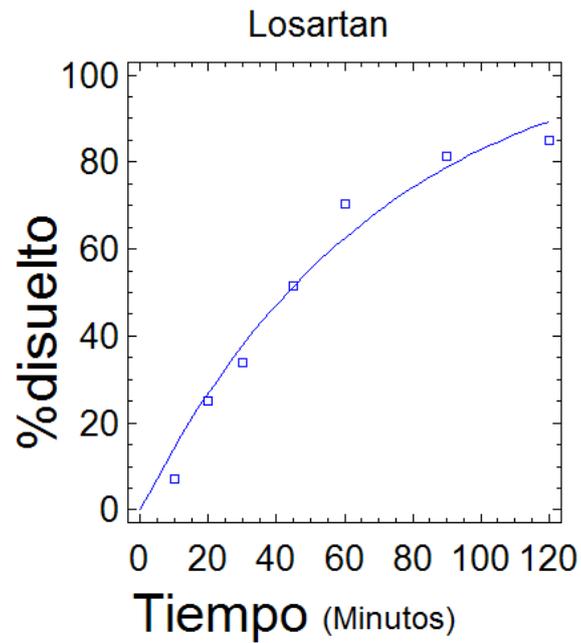


Figura 22. Cinética de disolución para el losartán presente en el producto piloto en medio biorrelevante ajustada a la ecuación de primer orden

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Se desarrolló un método para cuantificar simultáneamente losartán, amlodipino e hidroclorotiazida en un medio de disolución biorrelevante FaSSIF. El método fue lineal, preciso y exacto en el rango de 0.90-10.84 µg/mL para el amlodipino; 7.02-84.28 µg/mL para el losartán y de 2.20-26.48 µg/mL para hidroclorotiazida. Las condiciones cromatográficas que favorecieron la resolución entre los picos de losartan, amlodipino e hidroclorotiazida fueron una fase móvil con 35 % de acetonitrilo y 65% de solución de trietilamina a pH 3, una columna Lichrospher C18, y una velocidad de flujo de 1.2 mL /min.

Los productos innovadores, Norvas conteniendo amlodipino e Hyzzar conteniendo losartan e hidroclorotiazida presentaron una buena disolución en el medio FaSSIF, con un porcentaje disuelto mayor al 80% a los 30 min en todos ellos.

El amlodipino, y losartán contenidos en el lote del producto piloto presentaron una gran variabilidad y una baja disolución en el medio FaSSIF. Las tabletas que contenían hidroclorotiazida no se disgregaron. Lo cual indica que el medio biorrelevante es una herramienta útil para discernir entre productos conteniendo amlodipino, losartán e hidroclorotiazida ya sea solos o en combinación.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Abrahamsson Bertil; Albery Tamsin; Eriksson Anna; Gustafsson Ingrid; Sjöberg Marie. 2004. Food effects on tablet disintegration. *Pharmaceutical Sciences*. 22 165-172.(9)
2. Beyssac E. and Lavigne J. Dissolution Study of Active Pharmaceutical Ingredients Using the Flow Through Apparatus Usp 4. [Fecha de consulta 11 de enero 2010] Disponible en:http://www.dissolutiontech.com/DTresour/200505Articles/DT200505_A04.pdf
3. Bharat Ganeshbhai Chaudhari; Natvarlal Manilal Patel; Paresh Bhagvatiprasad Shah. 2007. Stability Indicating RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Atorvastatin and Amlodipine from Their Combination Drug Products. *Chem. Pharm. Bull.* 55(2) 241—246.
4. Brown Cynthia K.; Chokshi Hitesh P.; Nickerson Beverly; Reed Robert A.; Rohrs Brian R.; Shah Pankaj A. 2004. Acceptable Analytical Practices for Dissolution Testing of Poorly Soluble Compounds. *Pharmaceutical Technology*. 56-65. (6)
5. Custodio Joseph M.; Wu Chi-Yuan; Benet Leslie Z. 2008. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60.717-733. (1)
6. Dressman Jennifer; Amidon G.; Reppas Ch.; Shah V. 1998.Review. Dissolution Testing as a Prognostic Tool for Oral Drug Absorption: Immediate Release Dosage Forms. *Pharmaceutical Research*. 15(1):11-22.(3)
7. Dressman Jennifer, Butler James, Hempenstall John, and Reppas Christos. (2001) The BCS: Where do we go from here?. *Pharmaceutical Technology*. 68-76.
8. Dressman J.; Reppas Ch. 2000. In Vitro-in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. *Pharmaceutical Sciences*. 11(2) s73-s80. (8)
9. Dressman J.B, Vertzoni M., Goumas K., Reppas C. 2007. Estimating drug solubility in the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 59 591-602. (18)
10. Flack John M., Saunders Elijah, Gradman Alan, Kraus William E., Lester Martin, Pratt Howard, Alderman Michael, Green Stephen, Vargas Ramon, Espenshade Melanie, Ceesay Paulette, Alexander Joe, Goldberg Allan. 2001. Antihypertensive Efficacy and Safety of Losartan Alone and in Combination with Hydrochlorothiazide in Adult African Americans with Mild to Moderate Hypertension. *Clinical Therapeutics*. 23 8 1193-1208. (23)
11. Galia E.; Nicolaidis E.; Hörter D.; Löbenberg R.; Reppas C. y Dressman J. 1998. Evaluation of Various Dissolution Media for Predicting In Vivo

- Performance of Class I and Class II Drugs. *Pharmaceutical Research*. 15(5) 698-705.(7)
12. Hörter D., Dressman J.B. 2001. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Advanced drug delivery reviews*. 46. 75-87. (16)
13. Jaber Jaber Emami. 2006. In vitro - In vivo Correlation: From Theory to Applications. *J Pharm Pharmaceut Sci*. 9 (2): 31-51.
14. Kevine Cindy B.; Fahrbach Kyle R.; Frame Diana; Connelly Janet E.; Estok Rhonda P.; Stone Linda R.; Ludensky Veronica. 2002. Effect of Amlodipine on Systolic Blood Pressure. *Clinical Therapeutics*. 35-57.(22)
15. Maggio Rubén M.; Castellano Patricia M.; Kaufman Teodoro S. 2008. A multivariate approach for the simultaneous determination of losartan potassium and hydrochlorothiazide in a combined pharmaceutical tablet formulation. *Anal Bioanal Chem*, 391:2949–2955.
16. Manolis Athanasios J.; Grossman Ehud; Jelakovic Bojan; Jacovides Andrew; Bernhardt David C.; Cabrera, Walter J.; Watanabe Luis A.; Barragan Jaime; Matadamas Norberto; Mendiola Alfred; Woo K.S.; Zhu Jun R.; Mejia Agnes D.; Bunt Ton; Dumortier Thomas; Smith RonaM D. 2000. Effects of Losartan and Candesartan Monotherapy and Losartan/Hydrochlorothiazide Combination Therapy in Patients with Mild to Moderate Hypertension. *Clinical therapeutics*. 22 10 1186-1203.
17. Marques Margareth. 2004. Dissolution Media Simulating Fasted and Fed States [Fecha de consulta 09 de enero del 2010]. Disponible en: tt.paper6.com/tt/attachment/1220705824.pdf
18. Mithani Sabena D., Bakatselou Vassiliki, TenHoor Christopher N., and Dressman Jennifer B. 1996. Estimation of the increase in solubility of drugs as a function of bile salt concentration. *Pharmaceutical Research*. 13 (1) 163-167. (17)
19. Min Choi Seul, Jeong Seo Mi, Kyung Koo Kang, Jeong Hoon Kim, Byoung Ok Ahn, and Moohi Yoo. 2009. Beneficial Effects of the Combination of Amlodipine and Losartan for Lowering Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. *Archives of Pharmaceutical Research*. 32 3. 353-358. (24)
20. Mohammadia A.; Rezanour N.; M. Dogaheh Ansari; F. Bidkorbeh Ghorbani; Hashem M.; Walker R.B. 2007. A stability-indicating high performance liquid chromatographic (HPLC) assay for the simultaneous determination of atorvastatin and amlodipine in commercial tablets. *Journal of Chromatography B*. 846. 215–221.

21. Nevin Erk. 2001. Analysis of binary mixtures of losartan potassium and hydrochlorothiazide by using high performance liquid chromatography, ratio derivative spectrophotometric and compensation technique. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 24 .603–611.
22. Nikhil K Sachan, A Bhattacharta, Seema Pushkar, A Mishra. (2009) Biopharmaceutical classification system: A strategic tool for oral drug delivery technology. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 76-81.
23. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas NOM177(13)
24. Oparil Suzanne, Barr Eliav, Elkins Michelle, Liss Charles, Vrecenak Arthur, Edelman Jonathan. 1996. Efficacy, Tolerability, and Effects on Quality of Life of Losartan, Alone or with Hydrochlorothiazide, Versus Amlodipine, Alone or with Hydrochlorothiazide, in Patients with Essential Hypertension. 18. 4 608-625. (19)
25. Pérez Navarro Nancy Montserrat. 2009. Estudios del perfil de disolución de capsulas de 5-o-[beta-d-apiofuranosil-(1→6)-beta-d-glucopiranosil]-7-metoxi-3', 4 '-dihidroxi-4-fenilcumarina a pH 4.5 por CLAR. Tesis licenciatura. (15)
26. Ragno Gaetano; Garofalo Antonio; Vetuschi Claudio. 2002. Photodegradation monitoring of amlodipine by derivative Spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 27. 19–24
27. Rausl Dragica; Fotaki Nikoletta; Zanoski Ruzica; Vertzoni Maria; Cetina-Cizmek Biserka; Khan M. Zahiruli; Reppas Christos. 2006. Intestinal permeability and excretion into bile control the arrival of amlodipine into the systemic circulation after oral administration. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 58 (6). 827-836
28. Soriano Razo Claudia Marisol. 2009. Evaluación de Perfiles de Disolución de productos comerciales conteniendo Amlodipino a 3 pH's. Tesis de licenciatura.
29. Thanikachalam Sivakumar; Rajappan Manavalan; Chandrasekharan; Muralidharan; Kannappan Valliappan. 2007. An improved HPLC method with the aid of a chemometric protocol: Simultaneous analysis of amlodipine and atorvastatin in pharmaceutical formulations. *J. Sep. Sci.* 30, 3143 – 3153.
30. Volpe Massimo; Junren Zhu; Maxwell Thomas; Rodriguez Aldo; Gamboa Raul; Gomez-Fernandez Pablo; Gin& Ortega-Gonzalez; Matadamas Norberta; Rodriguez Freddy; Dass Badal; Kyle Chris; Laurent Clar; Moreno-Heredia Ernesto; Alfonso Bryce; Giuseppe Germano; Leen Gilles; Ronald D.

- Smith; Sanderson John E. 2003. Comparison of the Blood Pressure-Lowering Effects and Tolerability of Losartan- and Amlodipine-Based Regimens in Patients with Isolated Systolic Hypertension. *Clinical Therapeutics*. 1469-1489.(21)
31. Guidance for Industry. Dissolution Testing of immediate release solid oral dosage forms.
www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070237.pdf (4) [Consulta 11 enero 2010]
32. Reviewer guidance. Validation of chromatographic methods.
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM134409.pdf> [Consulta 28 enero 2010] (10)
33. Guidance for industry. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology.
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm073384.pdf> [Consulta 28 enero 2010] (11)
34. http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1225.html(validación y tabla que justifica parámetros a validar en el método) [Consulta 28 enero 2010] (12)
35. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/index.cfm>
[Consulta 28 enero 2010] (14)
36. http://www.ephares.com/PDF/Phares_SIF_56g_User_Guide.pdf [Consulta 28 enero 2010]
37. http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo_gbc.php?bib_vv=17 [Consulta 08 de marzo 2010] (25)
38. <http://www.drugbank.ca/drugs> [Consulta 08 de marzo 2010] (26)
39. <http://www.tsrlinc.com/services/bcs/results.cfm> [Consulta 08 de marzo 2010] (27)
40. <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04.htm> [Consulta 08 de marzo 2010] (28)
41. <http://www.uv.es/~mbermejo/LiberacionTema26.pdf> [Consulta 08 de marzo 2010]
42. http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo_gbc.php?bib_vv=6 [Consulta 10 marzo 2010]
43. FDA Guidance for Industry. Bioavailability and Bioequivalence studies for orally administered drug products, general considerations.

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070124.pdf>

44. FDA. Guidance for Industry. Extended release oral dosage forms: Development, Evaluation, and application of in vivo/in vitro correlations. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070239.pdf>
45. USP XXXI NP 26 2008