



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN**

***“ESTUDIO COMPARATIVO DE LA
DISOLUCIÓN DE CÁPSULAS DE
CLORANFENICOL MEDIANTE UN MODELO
COMPARTIMENTAL SERIADO”***

T E S I S

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

**P R E S E N T A:
GABRIELA ARELI BARRAGAN GUERRERO**

**ASESOR:
Q.F.B JOSÉ ANTONIO GARDUÑO ROSAS**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 2015



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estudio comparativo de la disolución de cápsulas de cloranfenicol mediante un modelo compartimental seriado.

Que presenta la pasante: Gabriela Areli Barraquán Guerrero
Con número de cuenta: 305274210 para obtener el Título de la carrera: Química Farmacéutico Biológica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 29 de Junio de 2015.

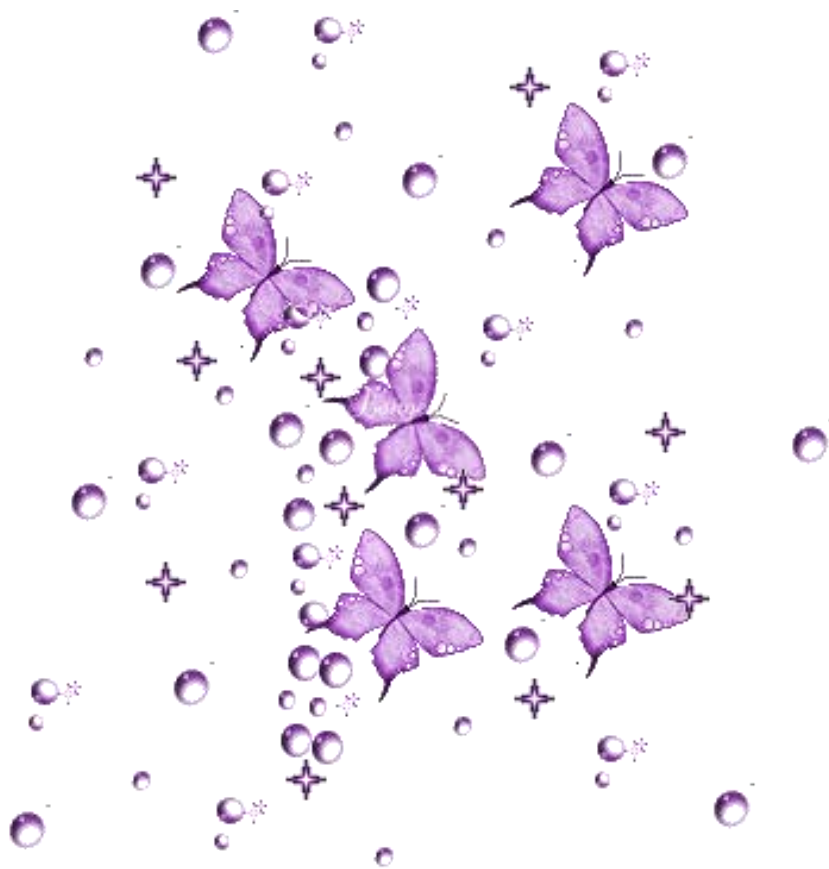
PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	D.A.R. Juan José Díaz Esquivel	
VOCAL	Q.F.B. José Antonio Garduño Rosas	
SECRETARIO	Q.F.B. Guadalupe Rebollar Barrera	
1er. SUPLENTE	M. en C. Gabriela Rodríguez Patiño	
2do. SUPLENTE	M. en C. Clara Luisa Domínguez Delgado	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/mmgm*

A mamá



Agradecimientos

Al Señor Jesucristo, mi Dios.

*...El Dios que me ha pastoreado toda mi vida hasta este día (Génesis 48:15).
...y el favor de Aquel que moró en la zarza... (Dt 33:16). Al que vive en mi espíritu.*

A mamá.

*Por todo, aunque todo significa nada; para mí todo, es el universo.
Ahora sé que para tí lo más importante es confiar en el Señor Jesús.*

A Vicente Flores L.

Por su apoyo y ser parte de la familia.

A mis hermanas: Noemi Barragan Guerrero y Alline Guadalupe Barragan Guerrero.

*No fue fácil para ninguna de nosotras llegar hasta donde estamos. Las amo, gracias
por su paciencia y por correr esta carrera juntas.*

A mi abuelita: María de Jesús García Araujo.

Por recibarnos en su casa, y por cuidarnos durante todo este tiempo.

A Rubén Guerrero García.

*Por escucharme, orientarme, animarme e incluso apoyarme a concluir el proceso de
titulación. Eres mi ejemplo a seguir.*

Tío, gracias por acércame nuevamente a Dios.

A Rosa María Guerrero García.

Tía te quiero mucho, gracias por tu apoyo incondicional.

A J. David Guerrero García.

*Las mariposas me recuerdan tanto a ti. Te echo mucho de menos, ciertamente valoré
el tiempo que compartimos juntos y aprendí a ser paciente, noble y valorar a la
familia.*

A Mi asesor QFB. José Antonio Garduño Rosas.

Por compartir su conocimiento y ser paciente, por dejarme errar (mientras hubiera reactivos), por hacer equipo conmigo.

Porque además de ser el director de este trabajo, es mi amigo.

¡Muchas gracias profesor Garduño!

Al jurado.

Muchas gracias por su tiempo; sus observaciones me fueron de mucha ayuda.

A la Dra. Raquel López Arellano y DAR Juan José Díaz Esquivel.

Gracias por su apoyo en el laboratorio, por las herramientas brindadas, y por su confianza.

Gracias por sus consejos, su tiempo y hacerme parte del equipo LEDEFAR.

A los chicos LEDEFAR: Mariana, Víctor Hugo, Uriel, Daniel, Bruno, Mario, Nancy, Miriam, Adriana, Hugo, Víctor Díaz, Gaby.

Mtra. Gaby Rodríguez Patiño.

Mil gracias, que Dios te bendiga, bendiga tus proyectos, y te de mucha sabiduría.

A mis amigas: Fabiola Hernández, Daniela Nava, Carmen Pacheco y Miriam Sánchez. Y las que faltan, muchas gracias. Y las no muy lejanas Químicas: Joselyn Cuellar y Zaira Flores García, gracias niñas.

Al Hombre Abedul...*nunca te olvidé, ni olvidé tu yelmo.*

A Pucca.

Por acompañarme, es una lástima que no pudiera despedirme de ti.

A Paris latosa-querida, a Lilan que te comiste mi gansito.

A mis hermanos en Cristo: Alfonso Cervantes Solís y Sarahí Ruíz Medina, Marcela Millares y Jenyfer Robles *gracias por sus oraciones, su cuidado y sus consejos.*

Los seres humanos y sus cosas, los seres humanos y los lazos que los unen... el tiempo. (FSK 23)

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	13
I. INTRODUCCIÓN.....	15
II. MARCO TEÓRICO.....	17
Biodisponibilidad y Bioequivalencia	17
Objetivos de los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia.....	17
Determinación de la biodisponibilidad y bioequivalencia	18
Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013: Biodisponibilidad y bioequivalencia	19
Disolución	28
Criterios y requisitos para la evaluación de perfiles de disolución	28
Análisis no compartimental	33
Momentos estadísticos.....	33
Tiempo medio de residencia (TMR)	33
Estimación de la constante de absorción	36
Porcentaje absorbido	38
Método Wagner- Nelson o de la absorción acumulativa	38
Sistema de Clasificación Biofarmacéutica	40
Modelos farmacocinéticos	43
Modelo compartimental seriado	44
Descripción del Simulador de Procesos Cinéticos seriados o Simulador de Procesos Farmacocinéticos	45
Validación de Métodos Analíticos	48
<i>Método del estándar adicionado</i>	49
III. OBJETIVOS	51
OBJETIVO GENERAL	51

OBJETIVOS PARTICULARES.....	51
IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL	52
A) Materiales, reactivos y equipos utilizados	52
B) Diagrama general de las actividades desarrolladas	55
C) Validación del método analítico para la cuantificar las muestras del medicamento de referencia.....	56
Precisión y exactitud	56
Linealidad del método	58
D) Condiciones de los ensayos de disolución	59
E) Ensayos para la obtención de los perfiles de disolución.	60
Procedimiento para la adaptación del montaje del simulador en el disolutor.	60
Procedimiento del ensayo de disolución.....	63
Descripción del proceso de ensayo para determinar la transferencia de Cloranfenicol en solución mediante el simulador de procesos cinéticos.	64
V. RESULTADOS	65
Perfiles de disolución en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8.	65
Perfiles de disolución en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5	70
Análisis estadístico del diseño de bloques	75
Análisis de Variancia para los parámetros cinéticos transformados.	77
Análisis de la constante de la velocidad de disolución aparente	79
Perfiles de transferencia de Cloranfenicol en Solución en agua desionizada.	81
Momentos estadísticos y números adimensionales	83
Porcentaje acumulado	86
Enfoque dependiente de modelo.....	88
VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	91
Comparación de los perfiles de disolución	91
VII. CONCLUSIONES.....	96
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	97

IX. ANEXOS	100
ANEXO A. Preparación de Soluciones	100
ANEXO B. Monografía de Cloranfenicol.....	100
ANEXO C. Generalidades de los medicamentos de prueba y referencia.....	102
ANEXO D. Desarrollo analítico	103
ANEXO F. Validaciones del método analítico	106
Linealidad y precisión del sistema.	106
Validación del método analítico para las cápsulas de 500 mg de Cloranfenicol por placebos cargados.	108
Validación del método analítico mediante la técnica de adiciones patrón para las cápsulas de referencia.	111
ANEXO G. Confiabilidad de las diluciones: 5 en 25 en los tres medio, 3 en 25 y diluciones: 5 en 25 y 10 en 25 en solución amortiguadora de acetatos y solución amortiguadora de fosfatos.	115
ANEXO H. C máx. y $ABC_{0-\infty}$.....	120
ANEXO I. Porcentaje de la cantidad total liberada por el método de Nelson-Wagner.	121

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1 Resumen de la aplicación y utilidad general de los estudio de biodisponibilidad.....</i>	<i>19</i>
<i>Tabla 2 Fundamentos de la transformación logarítmica.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabla 3 Sistema de Clasificación Biofarmacéutica.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 4 Material utilizado.....</i>	<i>52</i>
<i>Tabla 5 Reactivos utilizados con sus especificaciones y Marca.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabla 6 Equipos manejados.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabla 7 Softwares utilizados.....</i>	<i>54</i>
<i>Tabla 8 Preparación de las muestras disueltas del medicamento de referencia.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabla 9 Concentraciones teóricas y concentraciones a estimar de la precisión y exactitud. Método de adiciones patrón.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabla 10 Concentraciones teóricas y concentraciones a estimar de la linealidad al aplicar el método de adiciones patrón.....</i>	<i>58</i>
<i>Tabla 11 Orden de los ensayos de cada medicamento.....</i>	<i>63</i>
<i>Tabla 12 Concentraciones promedio del medicamento de prueba y de referencia respectivamente en la solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8.....</i>	<i>66</i>
<i>Tabla 13 Datos cinéticos de ambos medicamentos, prueba y referencia, obtenidos de los perfiles de disolución en solución amortiguadora de fosfatos.....</i>	<i>67</i>
<i>Tabla 14 Disponibilidad relativa (F) por día en el medio solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8.....</i>	<i>69</i>
<i>Tabla 15 Concentraciones promedio del medicamento de prueba y de referencia respectivamente en el medio solución amortiguadora de acetatos pH 4.5.....</i>	<i>71</i>
<i>Tabla 16 Datos cinéticos de ambos medicamentos, prueba y referencia, obtenidos de los perfiles de disolución en solución amortiguadora de acetatos.....</i>	<i>72</i>
<i>Tabla 17 Disponibilidad relativa (F) por día en el medio solución amortiguadora de acetatos pH 4.5.....</i>	<i>74</i>
<i>Tabla 18 Análisis de variancia para la C_{máx} de los perfiles de disolución en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8.....</i>	<i>76</i>
<i>Tabla 19 Análisis de variancia para la C_{máx} de los perfiles de disolución en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5.....</i>	<i>76</i>

<i>Tabla 20 Análisis de variancia para la ABC 0-∞ de los perfiles de disolución en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8.....</i>	<i>76</i>
<i>Tabla 21 Análisis de variancia para la ABC 0-∞ de los perfiles de disolución en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5.....</i>	<i>77</i>
<i>Tabla 22 Análisis de variancia para el LnCmáx de los perfiles de disolución en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8.....</i>	<i>77</i>
<i>Tabla 23 Análisis de variancia para el LnCmáx de los perfiles de disolución en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5.....</i>	<i>78</i>
<i>Tabla 24 Análisis de variancia para el lnABC 0-∞ de los perfiles de disolución en solución amortiguadora de fosfatos</i>	<i>78</i>
<i>Tabla 25 Análisis de variancia para el lnABC 0-∞ de los perfiles de disolución en solución amortiguadora de acetatos</i>	<i>78</i>
<i>Tabla 26 Comparación de la disponibilidad relativa de los parámetros Cmáx y ABC 0-inf en cada uno de los medios. Intervalos de confianza clásicos.</i>	<i>79</i>
<i>Tabla 27 Promedio e intervalos de confianza de las constantes de liberación.</i>	<i>79</i>
<i>Tabla 28 Resultados de los perfiles obtenidos mediante la transferencia de Cloranfenicol en Solución mediante el Simulador de Procesos Cinéticos (SIPROCIN)</i>	<i>81</i>
<i>Tabla 29 Parámetros cinéticos de los perfiles de transferencia de Cloranfenicol en solución.</i>	<i>82</i>
<i>Tabla 30 Parámetros estadísticos de la pendiente obtenida de la función de Weibull. Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8.</i>	<i>89</i>
<i>Tabla 31 Parámetros estadísticos del intercepto obtenida de la función de Weibull. Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8.</i>	<i>89</i>
<i>Tabla 32 Parámetros estadísticos de la pendiente obtenida de la función de Weibull. Solución amortiguadora de acetatos pH 4.5.</i>	<i>89</i>
<i>Tabla 33 Parámetros estadísticos de intercepto obtenida de la función de Weibull. Solución amortiguadora de acetatos pH 4.5.</i>	<i>90</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 Representación gráfica de un perfil de concentraciones plasmáticas tras la administración extravasal de un fármaco en escala numérica (A) y escala semilogarítmica (B)</i>	36
<i>Figura 2 Representación de un perfil de disolución tras el ensayo de disolución de Cloranfenicol en el simulador de procesos cinéticos en escala numérica (A) y escala semilogarítmica (B).</i>	37
<i>Figura 3 Porcentaje acumulado: absorción-tiempo de la ecuación $(Q_a t/Q_a \text{ inf}) * 100$.</i>	39
<i>Figura 4 Diagrama de la disolución de la cápsula de Cloranfenicol.</i>	41
<i>Figura 5 Transporte de masa a través de un tubo. Permeabilidad y concentración.</i>	42
<i>Figura 6 Esquema del modelo compartimental seriado.</i>	44
<i>Figura 7 Representación del simulador de procesos cinéticos seriados.</i>	45
<i>Figura 8 Aparato de disolución I (A), el eje propulsor y la canastilla cilíndrica (B).</i>	46
<i>Figura 9 Imagen frontal del simulador de procesos cinéticos.</i>	47
<i>Figura 10 Esquemas: (A) de la bomba y cánula, (B) la cánula en el dispositivo de entrada.</i>	48
<i>Figura 11 Representación esquemática del método del estándar adicionado</i>	49
<i>Figura 12 Representación esquemática de la técnica de adiciones estándar secuencial</i>	50
<i>Figura 13 Diagrama de las actividades desarrolladas.</i>	55
<i>Figura 14. Gráfico de la concentración de la muestra versus concentración adicionada. Método estándar adicionado.</i>	57
<i>Figura 15 Imagen lateral izquierdo del simulador de procesos cinéticos.</i>	61
<i>Figura 16 Imagen lateral derecho del simulador de procesos cinéticos.</i>	62
<i>Figura 17 Perfiles de disolución promedio de Cloranfenicol de los medicamentos prueba y referencia en medio solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8.</i>	65
<i>Figura 18 Perfiles de disolución de ambos medicamentos: referencia y prueba en la solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 en los diferentes días.</i>	68
<i>Figura 19 Disponibilidad relativa (relación de los $C_{m\acute{a}x}$ y ABC respectivo, del medicamento de prueba/medicamento de referencia) en el medio solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8.</i>	69

<i>Figura 20 Perfiles de disolución promedio de Cloranfenicol de los medicamentos prueba y referencia en medio solución amortiguadora de acetatos pH 4.5.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 21 Perfiles de disolución de ambos medicamentos: referencia y prueba en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5 en los diferentes días.</i>	<i>73</i>
<i>Figura 22 Disponibilidad relativa: F (relación de los C_{máx} y ABC respectivo, del medicamento de prueba/medicamento de referencia) en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5.....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 23 Gráfico de barras de los valores de las constantes de liberación por día en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8.....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 24 Gráfico de barras de los valores de las constantes de liberación por día en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5.....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 25 Perfil de la transferencia de Cloranfenicol materia prima en solución.....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 26 Intervalos de confianza de los momentos estadísticos: tiempo medio de residencia (TMR), tiempo medio de disolución (TMD) y tiempo medio de Absorción (TMA) y números adimensionales que describen el proceso de absorción “in vivo” y el proceso de entrada para el modelo compartimental seriado en el medio solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 parte I.</i>	<i>83</i>
<i>Figura 27 Intervalos de confianza de los momentos estadísticos: tiempo medio de residencia (TMR), tiempo medio de disolución (TMD) y tiempo medio de Absorción (TMA) y números adimensionales que describen el proceso de absorción “in vivo” y el proceso de entrada para el modelo compartimental seriado en el medio solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 parte II.</i>	<i>84</i>
<i>Figura 28 Gráfico de la relación de TMD- prueba/TMD -referencia medio fosfatos pH 6.8....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 29 Intervalos de confianza de los momentos estadísticos: tiempo medio de residencia (TMR), tiempo medio de disolución (TMD) y tiempo medio de Absorción (TMA) y números adimensionales que describen el proceso de absorción “in vivo” y, el proceso de entrada para el modelo compartimental seriado en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5.</i>	<i>85</i>
<i>Figura 30 Gráfico de la relación de TMD- prueba/TMD -referencia medio acetatos pH 4.5... </i>	<i>86</i>
<i>Figura 31 Perfil del porcentaje de la cantidad total liberada obtenido mediante el método de Wagner-Nelson en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8.....</i>	<i>87</i>
<i>Figura 32 Perfil del porcentaje de la cantidad total liberada obtenido mediante el método de Wagner-Nelson en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5.....</i>	<i>88</i>
<i>Figura 33 Línea de tiempo de los momentos estadísticos y su relación con el modelo compartimental seriado.....</i>	<i>93</i>

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

C_{máx}	Concentración máxima.
μg	Microgramos.
ABC	Área Bajo la Curva.
An	Número de absorción.
ANADEVA	Análisis de Variancia.
BPC	Buenas Prácticas Clínicas.
C	Concentración.
CI	Depuración.
CME	Cuadrado Medio del Error.
Co	Concentración inicial.
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.
CONBIOÉTICA	Comisión Nacional de Bioética.
C_p	Concentración plasmática de fármaco.
C_t	Concentración en un tiempo t.
CV	Coefficiente de Variación.
D	Dosis.
DCI	Denominación Común Internacional.
Desvest.	Desviación estándar.
D_n	Número de disolución.
Do	Número de dosis.
D_i	Diferencia estadística.
dt	Diferencial de tiempo.
f₂	Factor de similitud.
μ	Micras.
h	Horas.
HCl	Ácido Clorhídrico.
IC	Intervalos de confianza.
IC I	Intervalos de confianza inferior.
IC S	Intervalos de confianza superior.
IV	Intravenoso.
gl	Grados de libertad.
K_a	Constante de absorción.
K_e	Constante de entrada.
kg/m²	Kilogramo por metro cuadrado.
KI	Constante de liberación.
K_s	Constante de salida.
Ln	Logaritmo natural.
log	Logaritmo.

mg	Miligramos.
min	Minutos.
ml	Mililitros.
MP	Medicamento de prueba.
MR	Medicamento de referencia.
NOM	Norma Oficial Mexicana.
pH	Potencial de Hidrógeno ($\log [H^+]$).
Pi	Promedio del porcentaje disuelto del medicamento de prueba en el i-ésimo tiempo de muestreo.
PNO	Procedimiento normalizado de operación.
Qa	Cantidad absorbida a tiempo t.
Qc	Cantidad que permanece en el cuerpo en un tiempo t.
Qe	Cantidad eliminada.
R	Radio del tubo.
R2	Coefficiente de determinación.
Ri	Promedio del porcentaje disuelto del medicamento de referencia en el i-ésimo tiempo de muestreo.
rpm	Revoluciones por minuto.
SCB	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica.
t	Tiempo.
t_{1/2}	Tiempo de vida media.
TMA	Tiempo medio de Absorción.
tmáx	Tiempo en el que se alcanza la concentración máxima.
TMD	Tiempo medio de disolución.
TMR	Tiempo Medio de Residencia.
Vd	Volumen de distribución.
λe	Constante de eliminación.
UV	Ultravioleta.
nm	Nanómetros.

I. INTRODUCCIÓN

Desde hace más o menos 50 años los científicos se dieron cuenta de la importancia de los procesos de disolución en la biodisponibilidad de los fármacos, ya que tras la administración de las formas farmacéuticas sólidas se asume que el proceso de absorción del fármaco desde el tracto gastrointestinal es rápido, entonces la velocidad de disolución del fármaco puede ser el paso que controla su aparición en circulación general. Como resultado de esto, se aprobó la prueba con el aparato con canastilla, aparato I USP, como una prueba oficial de la disolución de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) y el Formulario Nacional (NF) en 1970. Y durante esta evolución, se adoptaron: el método de paleta, aparato II USP, en 1978; En 1990, el cilindro de vaivén, el aparato 3 USP, y para los productos de liberación prolongada en 1991 el aparato de celda de flujo continuo (aparato USP 4).

Actualmente los ensayos de disolución se utilizan en la industria farmacéutica para el control de calidad y para ayudar en la determinación de bioequivalencia. Además, las pruebas de disolución proporcionan información útil en varias etapas del desarrollo de medicamentos. Aunque los científicos desean establecer correlaciones *in vitro-in vivo* entre la liberación del fármaco desde la formulación y la absorción, el escaso conocimiento de la composición compleja y la hidrodinámica de los fluidos gastrointestinales sigue siendo un obstáculo real (Dokoumetzidis et al., 2006).

Es para el año de 1995 cuando surge el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB) que se basa en la solubilidad y la permeabilidad para clasificar a un fármaco, y plantea como objetivo, la posibilidad de establecer correlaciones *in vitro- in vivo* que permitan sustituir los ensayos realizados en humanos por ensayos de disolución *in vitro* de acuerdo con la clasificación obtenida para cada fármaco. Con base en la Clasificación Biofarmacéutica, la bioequivalencia puede ser demostrada por métodos *in vitro* para medicamentos de liberación inmediata, siendo un método la comparación de perfiles de disolución (Baena, y otros, 2008).

Con fines de intercambiabilidad, un laboratorio comparó la disolución de Cloranfenicol en cápsulas con el aparato II de la USP, los perfiles de disolución resultaron similares estadísticamente. La comparación de dichas cápsulas, se hizo tomando como referencia dos cápsulas de 250 mg de Cloranfenicol y como prueba una cápsula de 500 mg, en tanto que el estudio de bioequivalencia mostró diferencias significativas en la concentración máxima.

El propósito de este estudio es comparar la disolución *in vitro* de las mismas cápsulas utilizadas en el estudio *in vivo*, las cuales no son equivalentes farmacéuticos porque la cápsula del producto de prueba es de 500 mg de Cloranfenicol y dos cápsulas de 250 mg de dicho activo como producto de referencia. La comparación de los perfiles se realizó mediante el uso de un simulador de procesos cinéticos diseñado y elaborado en el Laboratorio Experimental Multidisciplinario de Farmacia (LEM Farmacia) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Los perfiles de disolución obtenidos a partir del simulador de procesos cinéticos bajo el modelo compartimental

seriado (el modelo matemático) simulan a los perfiles de concentración plasmáticas cuando se administra un medicamento, puesto que no hay saturación del medio de disolución, como ocurre en las pruebas de disolución comunes (aparato 1 y 2 USP). Es importante que a partir de este perfil se pueda obtener una serie de parámetros cinéticos que sirvan para caracterizar un medicamento, a fin de realizar comparaciones cuantitativas de dos formulaciones diferentes.

El motivo por el cual se utilizaron dos cápsulas de Cloranfenicol, es que no hay una referencia a la cantidad de activo (500 mg). La referencia a esta forma farmacéutica son las cápsulas 250 mg de activo (Medicamentos de Referencia, 2013). El cual cumple con los lineamientos de referencia designado por Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS).

Para la comparación cuantitativa en este estudio de disolución de las cápsulas de Cloranfenicol se utilizó: 1) la obtención de la constante de velocidad de disolución aparente, 2) el análisis de variancia de la $C_{máx}$ y ABC $0-\infty$ como parámetro de disponibilidad y equivalencia *in vitro* bajo los criterios de biodisponibilidad y bioequivalencia, 3) la comparación por métodos independientes del modelo: momentos estadísticos y los números adimensionales, y 4) métodos basados en modelado que recomienda la FDA y la NOM-177-SSA1-2013.

Para la cuantificación de Cloranfenicol en los medios de disolución se recurrió a un método analítico espectrofotométrico en el cuál se utilizó el análisis multivariante por mínimos cuadrados parciales, dicho método se validó conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos., 2013 y la Guía de validación de métodos analíticos. Para cuantificar la concentración de Cloranfenicol de las cápsulas de referencia se dio confiabilidad al adaptar la técnica del estándar adicionado o adiciones patrón al método analítico.

Los resultados obtenidos se clasificaron en dos partes:

La primera referente al método analítico, el cual es confiable para cuantificar Cloranfenicol en ambas cápsulas: referencia y prueba; y además, se realizó en tres medios de disolución.

La segunda, a los perfiles de disolución, que mediante el uso del simulador de procesos cinéticos seriados en la solución amortiguadora de acetatos hay un efecto discriminativo, capaz de dar diferencias en el proceso de la disolución de Cloranfenicol. Y que por lo tanto, se concluye que las cápsulas de referencia y prueba presentan diferencias en el $C_{máx}$ bajo el análisis estadístico como un estudio de disponibilidad y equivalencia *in vitro*.

II. MARCO TEÓRICO

Biodisponibilidad y Bioequivalencia

La Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 define como:

Biodisponibilidad: Es la proporción de fármaco que se absorbe a la circulación general después de la administración de un medicamento y el tiempo que requiere para hacerlo.

Biodisponibilidad comparativa: Es la relación entre biodisponibilidades de dos formas farmacéuticas administradas por vía extravascular.

Bioequivalencia: Es la relación entre dos equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuando al ser administrados bajo condiciones similares producen biodisponibilidades semejantes.

Objetivos de los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia

Los estudios de biodisponibilidad pueden estar encaminados hacia objetivos, como son:

- a) Determinación de la biodisponibilidad de un principio activo como parámetro biofarmacéutico equivalente a una propiedad intrínseca del mismo.
- b) Determinación de la biodisponibilidad de un principio activo en la forma farmacéutica diseñada, como control biológico de calidad de la forma farmacéutica.
- c) Determinación de la biodisponibilidad de un principio activo en términos comparativos, con la finalidad de comprobar si se presentan modificaciones de este parámetro bajo las siguientes circunstancias:
 - Cuando se ha modificado el proceso de fabricación de la forma que contiene el fármaco (al existir factores tecnológicos que pueden influir en la biodisponibilidad).
 - Cuando se ha modificado, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo, sustancialmente la formulación de una determinada forma farmacéutica; el diseño de la forma de dosificación puede modificar la biodisponibilidad, en función de los distintos excipientes incluidos en la formulación.
 - En los ensayos de bioequivalencia encaminados a comprobar la similitud de la biodisponibilidad de las alternativas farmacéuticas y equivalentes farmacéuticos, que son la base científica para poder realizar la sustitución terapéutica con las máximas garantías de seguridad y eficacia.

De todos estos objetivos se desprende el carácter eminentemente aplicado a los estudios de biodisponibilidad y el papel que juegan en el desarrollo de nuevos fármacos y en el diseño de nuevas formas farmacéuticas (Cárdenas Rodríguez et al., 1996).

Una de las finalidades principales del concepto de biodisponibilidad es poner en evidencia las diferencias entre medicamentos que contienen un mismo principio activo, generalmente a las mismas dosis nominales y susceptibles de ser considerados como equivalentes.

Se aplica en la concepción y desarrollo farmacéutico de un nuevo medicamento, permite una selección de las formas estudiadas fundadas sobre un criterio riguroso, así como la selección de la presentación farmacéutica adecuada para resolver mejor los problemas terapéuticos (Aïache et al., 1983).

Determinación de la biodisponibilidad y bioequivalencia

La cantidad de fármaco administrado que accede a la circulación sistémica puede determinarse a partir de las curvas de niveles plasmáticos o a partir de datos de excreción urinaria, al ser la sangre y la orina dos líquidos biológicos totalmente muestreables.

Las concentraciones plasmáticas que se obtienen con un principio activo después de su administración se pueden presentar de forma gráfica según su relación entre concentraciones plasmáticas a distintos tiempos.

En una curva de concentraciones plasmáticas con respecto al tiempo, se aprecian dos fases. En la primera fase predomina la absorción y existe un aumento de concentraciones en el plasma hasta que se alcanza el valor máximo de concentraciones ($C_{m\acute{a}x}$). El tiempo al que se alcanza el valor máximo comienza la segunda fase en la que predomina la eliminación y disminuyen los valores de concentraciones plasmáticas. Se puede calcular la biodisponibilidad según el valor de Área Bajo la Curva (ABC) que se obtiene al representar las concentraciones plasmáticas frente al tiempo.

Tabla 1 Resumen de la aplicación y utilidad general de los estudio de biodisponibilidad.

Estudios de Biodisponibilidad (Cárdenas Rodríguez et al., 1996)	
Para nuevas moléculas	<ul style="list-style-type: none"> - Determinar la eficiencia de absorción o fracción disponible, por distintas vías de administración (intravascular y extravascular). - Determinar la influencia de las formulaciones y diversos procesos de manufactura del medicamento, sobre la biodisponibilidad del principio activo que contienen. - Determinar la posible necesidad de un rediseño molecular de un principio activo, a fin de modificar sus características de disolución, absorción, distribución y/o excreción en su caso, para mejorar su efecto farmacológico.
Para productos genéricos	<ul style="list-style-type: none"> - Determinar bioequivalencia entre medicamentos genéricos (biodisponibilidad comparativa). - Determinar la biodisponibilidad de un fármaco contenido en distintas formas farmacéuticas.
Para diversos fines	<ul style="list-style-type: none"> - Apoyar estudios de correlación entre concentraciones plasmáticas de fármaco y la respuesta farmacológica observada. - Apoyar el ajuste de regímenes de dosificación diseñados con bases farmacocinéticas. - Apoyar al monitoreo de concentraciones plasmáticas de fármacos de empleo delicado.

Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013: Biodisponibilidad y bioequivalencia

En la NOM-177-SSA1-2013 se establecen:

a. Criterios generales de Intercambiabilidad (biodisponibilidad o bioequivalencia).

La norma cubre cuatro criterios generales:

- I. Las pruebas de intercambiabilidad.
- II. Medicamentos.
- III. Prueba de bioequivalencia para otras concentraciones.
- IV. Exención de la prueba de bioequivalencia para otras concentraciones.

I. Para las pruebas de intercambiabilidad.

- a) Los tipos de prueba que pueden realizarse están basados en documento: Acuerdo que determina el tipo de prueba para demostrar intercambiabilidad de medicamentos genéricos y sus actualizaciones.
- b) Dichas pruebas se realizan en territorio nacional con población mexicana y además, deberán realizarse por Terceros Autorizados.

II. Medicamentos.

- a) Las pruebas de intercambiabilidad se realizan con un lote de producción elaborado de acuerdo con la NOM-059-SSA1-2013, y debe contar con un certificado de análisis.
- b) Los medicamentos de prueba y de referencia deben contar con un certificado de análisis en el que se señalen las pruebas de control de calidad realizadas (valoración, uniformidad de dosis, y si aplica disolución) ya sea proporcionado por el patrocinador o por un laboratorio de prueba, Tercero Autorizado. En cantidad suficiente para todo el estudio y otro tanto para resguardo.
- c) El porcentaje de valoración del medicamento de prueba debe estar dentro de los límites farmacopeicos y no debe diferir en más del 5% del medicamento de referencia.
- d) El medicamento de referencia es indicado por la autoridad sanitaria competente.
- e) Cuando el medicamento de prueba contienen más de un fármaco de efecto sistémico, se realiza la prueba de intercambiabilidad para cada uno de ellos.
- f) La fecha de caducidad debe ser vigente en ambos medicamentos, prueba y referencia, durante todo el estudio clínico y la elaboración de los perfiles de disolución.
- g) Las conclusiones de la prueba de intercambiabilidad sólo son válidas para los lotes subsecuentes del medicamento de prueba que se elaboren de acuerdo con la NOM-059-SSA1-2013, que incluyan la validación del proceso de producción y no presenten cambios en la formulación o en el proceso de producción del medicamento que puedan modificar la farmacocinética del medicamento.

III. Prueba de bioequivalencia para otras concentraciones.

- a) En caso de que no se comercialice la concentración a comparar del medicamento de referencia, se podrá utilizar una concentración proporcionalmente mayor o menor, siempre y cuando esté definido como referencia y previa consulta a la COFEPRIS.
- b) Para salvaguardar la integridad de los sujetos de investigación participantes en un estudio, la prueba de bioequivalencia se podrá realizar a una dosis diferente a la máxima, cuando se establezca que el uso de la dosis máxima provoca reacciones adversas conocidas, que podrían poner en riesgo la integridad de los sujetos de investigación. Esto debe establecerse claramente en el protocolo.

IV. Exención de la prueba de bioequivalencia para otras concentraciones.

a) Para aquellos medicamentos que se presentan en más de una concentración, en la misma forma farmacéutica, se puede realizar el estudio de bioequivalencia con una de las concentraciones, siempre y cuando estén consideradas en el medicamento de referencia. Los resultados pueden ser extrapolables para las otras concentraciones, cumpliendo con los siguientes requisitos:

1.1 Existe proporcionalidad en el contenido del (os) fármaco(s) y aditivo(s) en la fórmula cuali-cuantitativa con respecto al medicamento que fue declarado bioequivalente. La proporcionalidad se determina bajo los siguientes criterios:

1.1.1 El o los fármaco(s) y el o los aditivo(s) se encuentran en la misma proporción entre las diferentes concentraciones.

1.1.2 El o los fármaco(s) y el o los aditivo(s) no se encuentran exactamente en la misma proporción entre las diferentes dosis, pero la relación de ingredientes activos con respecto al peso total de la forma de dosificación puede variar hasta un 10% sin que exista impacto en la velocidad de disolución del fármaco.

1.1.3 Para fármacos de alta potencia, en donde la cantidad de éstos dentro de la forma de dosificación es muy baja, es decir, menores a 10 mg, y el peso total de la forma de dosificación es igual en todas las dosis, existe proporcionalidad, si éstas no varían en más del 10% del peso total de la forma de dosificación.

1.1.4 En el caso de formulaciones de liberación inmediata, los componentes de la recubierta, colorantes, saborizantes y cubierta de la cápsula no deben ser considerados en los cálculos para establecer la proporcionalidad de las fórmulas.

1.2 El perfil de disolución es similar entre el medicamento bioequivalente y el medicamento con la concentración a exentar, mismo que deberá ser realizado por un Tercero Autorizado.

1.3 Deberá presentar la evidencia científica suficiente, para demostrar que el medicamento presenta una farmacocinética lineal en el intervalo de las concentraciones solicitadas.

1.4 Los procesos de fabricación estén validados.

b. Criterios y requisitos para realizar pruebas de intercambiabilidad (biodisponibilidad o bioequivalencia) en humanos.

Conforme a la NOM-177SSA1-2013

A. Normatividad.

A.1. Estos criterios y requisitos aplican para los medicamentos con prueba C del: Acuerdo que determina el tipo de prueba para demostrar intercambiabilidad de medicamentos genéricos. El cual aplica para las cápsulas de Cloranfenicol (Juan, 2005)

B.2. Los estudios deben realizarse con base en lo dispuesto en la Ley General de Salud, en el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, en las Normas Oficiales Mexicanas, en lo dispuesto por la Comisión Nacional de Bioética (CONBIOÉTICA), en las Buenas Prácticas Clínicas (BPC), en las Buenas Prácticas de Documentación y en las demás disposiciones jurídicas aplicables.

B. Tamaño de la muestra.

B.1 El número de sujetos de investigación a incluir en un estudio convencional de bioequivalencia debe basarse en:

- Diseño experimental: En paralelo, cruzado, replicado, William o secuencial
- Cálculo apropiado del tamaño de muestra, el cual debe obtenerse a partir del CV% intrasujeto del parámetro farmacocinético ($C_{m\acute{a}x}$, ABC_0-t o $ABC_0-\infty$) con mayor variabilidad, el cual a su vez debe obtenerse del cuadrado medio del error (CME) obtenido en el Análisis de varianza (ANADEVA).
- La información se obtiene de un estudio piloto o en la bibliografía científica reconocida internacionalmente.

B.2 El tamaño de la muestra debe satisfacer los criterios a cumplir con respecto al nivel de significancia deseado o error tipo I (a), el error tipo II (b) y una diferencia mínima a detectar, con relación a la biodisponibilidad promedio entre el medicamento de prueba y el medicamento de referencia, la potencia estadística no debe ser menor al 80%, el error tipo I debe ser menor o igual al 5%.

B.3 El número de sujetos de investigación evaluables no debe ser menor a 12 y se debe especificar previamente en el protocolo y en el informe.

B.4 Todos los sujetos de investigación tratados deben ser incluidos en el análisis estadístico, sin embargo, los sujetos de investigación que en un diseño cruzado no proporcionen datos evaluables, tanto del medicamento de prueba como del medicamento de referencia, o que no presentan datos evaluables en el único período de un diseño en paralelo, no deben ser incluidos en el análisis estadístico.

B.5 No se permite la sustitución o reemplazo de sujetos de investigación.

C. Protocolo Clínico para las Pruebas de Bioequivalencia.

a. Normatividad

1. Cada protocolo de un estudio clínico, debe ser previamente evaluado y dictaminado por el Comité de Ética en Investigación y por el Comité de Investigación, así como autorizado por la COFEPRIS.
2. El protocolo debe cumplir con lo señalado en la Ley General de Salud, en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, en las Normas Oficiales Mexicanas, en las BPC, en las Buenas Prácticas de Documentación y en las demás disposiciones jurídicas aplicables.
3. Los protocolos deben ser supervisados por el Investigador Principal y autorizados por el Responsable Sanitario.

D. Selección de sujetos de investigación.

a. Los sujetos de investigación son registrados en el programa de sujetos de investigación de la COFEPRIS antes de iniciar el primer período del estudio.

b. No debe existir relación de subordinación entre los sujetos de investigación y los investigadores.

c. Los sujetos de investigación deben ser remunerados en función del riesgo y tiempo empleado en el estudio.

d. La selección de un solo género de sujetos de investigación para participar en un estudio debe estar justificada en el protocolo (diferencias farmacocinéticas, aspectos éticos, etc).

Los criterios de inclusión, exclusión y eliminación se establecen en el protocolo correspondiente de acuerdo al perfil del medicamento a estudiar.

e. Se debe contar con una descripción detallada de las características antropométricas y exploración física de los sujetos de investigación, así como una historia clínica completa, conforme a las disposiciones jurídicas aplicables.

f. El sujeto de investigación sólo podrá participar en un estudio cada 3 meses.

g. Los sujetos de investigación deben contar con las siguientes características:

- Ser personas clínicamente sanas y sin antecedentes de hipersensibilidad o alergias al fármaco bajo estudio.
- Deben tener una edad entre 18 y 55 años
- El índice de masa corporal debe ser entre 18.0 a 27.0 kg/m².
- Las pruebas clínicas de laboratorio deben ser como mínimo: Examen general de orina, química sanguínea, biometría hemática completa con cuenta diferencial, y los estudios para descartar la presencia de hepatitis B y C, VIH y VDRL. La vigencia de estas pruebas será como máximo de 3 meses siempre que no existan datos clínicos que indiquen algún cambio en el estado de salud de los sujetos de investigación. Además, deben incluir: electrocardiograma con vigencia de 3 meses, a menos que haya patología reportada en ese período.
- Las pruebas cualitativas de abuso de drogas y de embarazo se deben realizar durante el proceso de selección y previo al ingreso en cada período del estudio. Estas pruebas deben realizarse en laboratorios clínicos y de gabinete que cumplan con las disposiciones jurídicas aplicables; previamente auditado por el Tercero Autorizado y que cuenten con su Licencia Sanitaria y permisos correspondientes.
- No deben tener antecedentes de abuso y dependencia de alcohol, sustancias psicoactivas o uso crónico de medicamentos.
- No deben haber consumido café, tabaco o bebidas que contengan xantinas como cafeína, teobromina, teofilina, entre otros, que afecten la farmacocinética del fármaco en evaluación, al menos 10 h antes del inicio del estudio.

E. Administración del medicamento.

- Los medicamentos que se administren por vía oral deben ingerirse con 250 mL de agua a temperatura ambiente.
- Las condiciones de ayuno deben ser por lo menos 10 h antes de la administración del medicamento y por 2 h como mínimo después de la administración.
- El ayuno previo al estudio debe asegurarse mediante internamiento de los sujetos de investigación una noche previa al inicio del estudio.

F. Toma de muestras.

Los tiempos para la toma de las muestras deben diseñarse de tal manera que se puedan caracterizar los parámetros farmacocinéticos, particularmente ABC y C_{máx}, definiendo el tiempo de tolerancia en el protocolo. Es decir, que permita caracterizar el 80% del ABC (mínimo 4 t_{1/2} de eliminación, con al menos cuatro muestras durante la fase log-terminal para obtener la constante de velocidad de eliminación) a excepción de estudios truncados.

Debe ser recolectado un número suficiente de muestras para describir el perfil de concentración plasmática respecto al tiempo.

G. Manejo de muestras.

- Las muestras deben manejarse de acuerdo a los procedimientos normalizados de operación (PNO) establecidos y aprobados en la unidad respectiva, que aseguren su correcta separación (pre-proceso), identificación, almacenamiento, trazabilidad, manejo, conservación e integridad, así como traslado y disposición final de las mismas.

H. Parámetros farmacocinéticos¹.

- Después de la administración del medicamento, se deben calcular los siguientes parámetros farmacocinéticos: ABC_{0-t}, ABC_{0-∞}, C_{máx}, t_{máx}, λ_e y la t_{1/2} estimada en la fase terminal. También debe reportarse el TMR.

- a. Área bajo la curva de concentración en plasma o sangre en función del tiempo cero hasta un tiempo t (ABC_{0-t}), calculada por la regla de los trapecios, en donde t es el tiempo en el último punto medido.
- b. Área bajo la curva de concentración en plasma o sangre en función del tiempo cero hasta tiempo infinito (ABC_{0-∞}), en donde:

$$ABC_{0-\infty} = ABC_t + \frac{C_t}{\lambda_e}$$

C_t, es la última concentración de fármaco medido y λ_e es la constante de velocidad de eliminación terminal calculada conforme a un método adecuado.

- c. La vida media de eliminación del fármaco (t_{1/2}).

Esta se determina mediante la siguiente fórmula:

¹ Para el modelo compartimental seriado: Parámetros cinéticos.

$$t_{1/2e} = \frac{\ln(2)}{\lambda_e}$$

d. Concentración máxima del fármaco ($C_{m\acute{a}x}$) y tiempo para alcanzarla ($T_{m\acute{a}x}$), obtenidos directamente a partir de datos sin interpolación (USP30, 2007).

e. Los Tiempos Medios de Residencia (MTR)

$$MTR = \frac{ABCM(0 - \infty)}{ABC(0 - \infty)}$$

-En estudios farmacocinéticos se deben usar métodos no compartimentales para la determinación de los parámetros farmacocinéticos, el uso de métodos compartimentales no será aceptable.

c. Análisis de datos y bioestadística de Bioequivalencia.

a. Los parámetros a evaluar para establecer la conclusión acerca de la posible bioequivalencia de los productos, será $C_{m\acute{a}x}$ como indicativo de la velocidad, y el ABC como indicativo de la cantidad absorbida, según corresponda al diseño.

b. El criterio para determinar bioequivalencia entre los medicamentos prueba y referencia:

- Intervalos de confianza (IC) al 90% de la media geométrica, de los cocientes de los parámetros $C_{m\acute{a}x}$ y ABC de acuerdo al diseño, los cuales se deben encontrar entre 80% y 125%.

- Estos parámetros farmacocinéticos deben analizarse mediante procedimientos estadísticos para determinar que el producto de prueba es equivalente estadísticamente al producto de referencia.

c. Se calcula el IC para el cociente (o diferencia) de los promedios de las variables farmacocinéticas entre los productos de prueba y de referencia. Los límites de IC para las medias de poblaciones, así como el nivel de confianza.

d. Transformación de los parámetros cinéticos (USP30, 2007).

Tabla 2 Fundamentos de la transformación logarítmica.

Fundamento clínico	Fundamento farmacocinético	Fundamento estadístico
<p>Utilizando la transformación logarítmica, el modelo estadístico lineal general, en el análisis de datos de equivalencia, es posible realizar una inferencia entre las diferencias de dos medias en escala logarítmica, la cual cuando es retransformada, se aplica al cociente de los promedios de la escala original.</p>	<p>Suponiendo que la eliminación es de primer orden y que solamente ocurre a partir de un compartimento central:</p> $ABC_{0-\infty} = F \cdot \frac{D}{cl} \quad F = \frac{D}{Vd} * \lambda e$ <p>La transformación logarítmica de los datos ABC permitirán que el $Cl(Vd * \lambda e)$ como término de la ecuación dé lugar a un efecto aditivo: Después de la transformación logarítmica:</p> $\ln ABC_{0-\infty} = \ln F + \ln Vd * \ln \lambda e$	<p>La transformación logarítmica de los datos obtenidos de estudios en bioequivalencia debe utilizarse para evitar el uso de estimadores del promedio del producto de referencia, con el fin de calcular el IC para el cociente de los promedios de los productos.</p> <p>La transformación logarítmica permite corregir ambas situaciones y da lugar a que las variancias sean independientes de la media, y que la simetría desaparezca.</p> <p>Los parámetros farmacocinéticos ABC y $C_{m\acute{a}x}$ deben ser transformados a su logaritmo.</p>

Por lo anterior, el ANADEVa debe llevarse a cabo con la transformación logarítmica de las variables farmacocinéticas ABC y $C_{m\acute{a}x}$ o variables equivalentes.

f. Pruebas estadísticas y criterios

- Se puede llevar a cabo la prueba T doble unilateral (Schuirman) con los datos obtenidos de la transformación logarítmica de ABC y $C_{m\acute{a}x}$ mediante la construcción de un IC al 90% para el cociente entre los promedios de los medicamentos prueba y referencia.
- ANADEVa
- Se puede ejecutar con la ayuda de paquetes estadísticos.
- Debe aplicarse considerando la suma de cuadrados tipo III.
- Se debe reportar en la tabla ANADEVa las fuentes de variación, grados de libertad, cuadrados medios.
- El efecto de secuencia debe evaluarse usando la media de cuadrados del sujeto de investigación, anidando la secuencia como término de error.
- Todos los demás efectos principales debe evaluarse contra el error residual (media del cuadrado del error) y reportar los valores de F, respectivamente, así como indicar si la fuente de variación es significativo o no, considerando un error de tipo I de 0.05.

Disolución

La disolución es definida como un proceso mediante el cual se dispersa una sustancia sólida en el disolvente para producir una solución. Este proceso se controla fundamentalmente por la afinidad entre la sustancia sólida y el disolvente, y consiste en dos fases consecutivas:

El primer paso consiste en la liberación de moléculas de la fase sólida a la capa líquida cerca de la superficie sólida (una reacción interfacial entre la superficie sólida y el disolvente). Es seguido por el transporte de solutos desde la interfase sólido-líquido hasta el seno de la solución. La disolución de la sustancia sólida sigue el modelo basado en la relativa significación de estos dos pasos del transporte.

El modelo de capa de difusión propuesto por Nernst y Brunner es ampliamente utilizado para describir la disolución de sustancias sólidas puras. En este modelo, se asume que una capa de difusión (o una capa de película líquido estancado) de espesor X rodea la superficie de una partícula. La reacción en la interfase sólido-líquido se supone que es instantánea. Por lo tanto, existe un equilibrio en la interfaz, y por lo tanto, la concentración de la superficie es la solubilidad saturada de la sustancia. Una vez que las moléculas de soluto difunden a través de la capa de película y llegan a la interfaz de disolvente, se lleva a cabo una mezcla rápida, lo que resulta en una concentración mayor uniforme. Sobre la base de esta descripción, la velocidad de disolución se determina totalmente por difusión movimiento browniano de las moléculas en las capas de difusión (Rajesh et al., 2008).

El Perfil de disolución es la determinación experimental de la cantidad de fármaco disuelto a diferentes tiempos, en condiciones experimentales controladas, a partir de la forma farmacéutica (Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013).

Criterios y requisitos para la evaluación de perfiles de disolución

Conforme a la NOM-177-SSA1-2013 y guías de la Food and Drug Administration (FDA).

A) Perfil de disolución como prueba de intercambiabilidad.

1. Todos los métodos analíticos empleados para la cuantificación de muestras provenientes de un perfil de disolución, deben ser validados por el Tercero Autorizado en el sitio de análisis.
2. Las condiciones para la prueba de perfiles de disolución deben ser las establecidas en la FEUM y sus suplementos vigentes. Cuando en éstos no aparezca la

información, podrá recurrirse a farmacopeas de otros países cuyos procedimientos de análisis se realicen conforme a especificaciones de organismos especializados y, en última instancia, a otra bibliografía científica reconocida internacionalmente.

3. El estudio del perfil de disolución se debe registrar en un protocolo antes de su realización. El protocolo debe contener:

3.1 Portada.

3.1.1. Contenido:

Título del protocolo, clave del protocolo, nombre del laboratorio patrocinador, tercero autorizado que realizó el estudio, nombre y firma del responsable o coordinador del estudio, nombre y firma del responsable de aseguramiento de calidad, y fecha de emisión del protocolo.

3.2 Índice.

3.3 Objetivo.

3.4 Alcance.

3.5 Generalidades del fármaco.

3.5.1 Debe contener:

Fórmula desarrollada, fórmula condensada, peso molecular, propiedades fisicoquímicas, apariencia, solubilidad, punto de fusión, pKa, precauciones y medidas de seguridad.

3.6 Generalidades de los medicamentos de prueba y de referencia.

3.6.1 Contenido:

Descripción DCI, denominación genérica, denominación distintiva, forma farmacéutica, dosis, número de lote, número de registro del medicamento de referencia, fabricante, fecha de caducidad, recepción criterios, manejo y almacenamiento, pruebas de valoración, uniformidad de dosis y disolución.

3.7 Procedimiento Analítico.

3.7.1 Incluye:

Equipos e Instrumentos, reactivos, materiales, tipo de filtro, sustancia(s) de referencia, y preparación de la curva de calibración.

3.8 Controles de calidad de la prueba.

3.9 Resumen de la validación del método analítico (previo a la prueba).

3.10 Desarrollo de la prueba del perfil de disolución.

3.10.1 Preparación del o los medios de disolución.

3.10.1.1 Método de desgasificación.

3.10.1.2 Prueba B de perfil de disolución; preparar el medio de disolución indicado de acuerdo a la monografía.

3.10.1.3 Prueba B2 de perfil de disolución; preparar los siguientes medios:

Medio de disolución 1: pH 1.2, medio de disolución 2: pH 4.5, medio de disolución 3: pH 6.8.

3.10.2 Descripción del aparato de disolución.

3.10.3 Condiciones de la Prueba.

3.10.4 Volumen del medio de disolución con o sin reposición.

3.10.5 Volumen de alícuota.

3.10.6 Velocidad de agitación.

3.10.7 Temperatura.

3.10.8 Tiempos de muestreo.

3.10.9 Forma de muestreo.

3.10.10 Forma de colocar la unidad de dosis.

3.10.11 Unidades de dosis empleadas.

3.11 Ejecución de la prueba (comparación de los perfiles).

3.12 Método de análisis validado.

3.13 Fórmula de cálculo del porcentaje disuelto.

3.14 Criterios de aceptación de los perfiles.

3.15 Tablas a reportar y gráficos.

3.16 Análisis de datos y evaluación estadística para cada de las condiciones analizadas.

3.16.1 Método de cálculo f_2 o en su caso, el modelo y método estadístico de comparación y su justificación.

3.17 Referencias y bibliografía.

4. Donde se especifiquen estudios de perfiles de disolución en tres medios se llevarán a cabo con el aparato I a 100 rpm o el aparato II a 50 rpm empleando 900 mL de los medios de disolución.
 5. Se realizan los perfiles de disolución con 12 unidades, tanto del medicamento de prueba como el de referencia, en cada uno de los medios de disolución.
 6. Para realizar el perfil de disolución, deben seleccionarse por lo menos 5 tiempos de muestreo, que permitan caracterizar apropiadamente la curva ascendente y la fase de meseta. Únicamente dos puntos estarán en la meseta de la curva y los otros tres distribuidos entre la fase ascendente y de inflexión.
 7. En los medios de disolución en los que tanto el medicamento de prueba como el medicamento de referencia se disuelva en más del 85% en 15 minutos o menos, no es necesario emplear el f_2 y por lo tanto no es necesario caracterizar la curva ascendente.
 8. En cada uno de los medios de disolución utilizar una curva de calibración del estándar de referencia para calcular por interpolación la concentración del fármaco disuelto.
 9. El volumen extraído puede o no reemplazarse; cuando no se reemplace el volumen, no se debe extraer más del 10% del medio de disolución.
 10. Los métodos de análisis para la cuantificación del fármaco de interés deben validarse por el Tercero Autorizado.
 - 10.1. La validación del método debe estar descrita en un protocolo, aprobado por el responsable del área analítica, el método analítico para cuantificar muestras de perfiles de disolución, debe cumplir al menos con las siguientes cualidades de desempeño:
 - Linealidad.
 - Precisión.
 - Estabilidad de la muestra.
 - Influencia del filtro. Determinar que no exista adherencia del fármaco al filtro.
- Parámetros de validación con el medicamento:
Validar el método, tanto para el medicamento de prueba como para el medicamento de referencia.
- Selectividad.
 - Linealidad.
 - Exactitud.
 - Precisión: Repetibilidad y reproducibilidad.

11. Evaluación de perfiles de disolución.

11.1 El porcentaje disuelto debe calcularse con respecto a la dosis nominal del fármaco.

11.2 Se deben reportar los porcentajes disueltos a cada tiempo de muestreo en cada unidad de dosificación, así como los porcentajes disueltos promedio, los coeficientes de variación y los valores máximo y mínimo en cada uno de los medios de disolución.

11.3 Se deben graficar los porcentajes disueltos promedio en cada uno de los medios de disolución.

11.4 Si el CV% del porcentaje disuelto es menor o igual que el 20% para el primer tiempo de muestreo y menor o igual que el 10% para los tiempos subsecuentes, se comparan los perfiles de disolución usando el f2 definido en la siguiente ecuación:

$$f2 = 50 * \log \left[\frac{100}{\sqrt{1 + \frac{1}{t} \sum_i^t (Ri - Pi)^2}} \right]$$

Donde:

t = número de tiempos de muestreo.

Ri= Promedio del porcentaje disuelto del medicamento de referencia en el i-ésimo tiempo de muestreo.

Pi= Promedio del porcentaje disuelto del medicamento de prueba en el i-ésimo tiempo de muestreo.

11.5 Calcular el valor de f2 en cada uno de los medios de disolución, comparar los valores promedio desde el primer tiempo de muestreo hasta máximo un tiempo de muestreo después de que el medicamento de referencia ha alcanzado el 85% del fármaco disuelto con un mínimo de 3 puntos

12. Criterios de evaluación de los perfiles de disolución

a. Si el valor de f2 es mayor o igual a 50, en el medio o en los 3 medios de disolución, según aplique los perfiles de disolución son similares.

b. Cuando el medicamento de prueba y de referencia se disuelvan el 85% o más en 15 min, en el medio de disolución, no es necesario emplear el f2 dado que los productos se clasifican como de muy rápida disolución.

Análisis no compartimental

La farmacocinética no compartimental se basa en la aplicación de criterios estadísticos al análisis de las curvas de nivel plasmático, de modo que se obtengan parámetros representativos de las mismas sin considerar el concepto compartimiento (Doménech Berrozpe et al., 2001).

Momentos estadísticos

Una metodología para el análisis de fármaco disuelto, que sea independiente del modelo de disolución, aporta una gran ventaja para el análisis comparativo de este proceso. Una técnica de este tipo, es la denominada de *momentos estadísticos*.

La teoría de los momentos estadísticos se basa en el supuesto de que el movimiento individual de una molécula de fármaco a través de un sistema, está gobernado por la probabilidad (proceso estocástico), en la que la variable aleatoria que se considera es el tiempo que el fármaco permanece en el organismo (Doménech Berrozpe et al., 2001).

En el caso de la disolución, una molécula de fármaco contenida en la tableta o cápsula, se transfiere con cierta probabilidad desde el estado sólido al estado disuelto: el resultado que se observa experimentalmente, es el resultado promedio de numerosas moléculas (Cárdenas Rodríguez et al., 1996).

Empleando el concepto de momentos estadísticos de Pearson para caracterizar la distribución de frecuencias, es posible evaluar los resultados experimentales *in vitro* o *in vivo* debido a que los perfiles de disolución, excreción o concentraciones plasmáticas pueden ser vistas como curvas de distribución de frecuencias de los tiempos individuales en que las moléculas de una dosis de fármacos residen o permanecen dentro del sistema, es decir, dentro del medio de disolución.

Los tres primeros parámetros cuantitativamente útiles para caracterizar la distribución de frecuencias por medio de los momentos estadísticos son:

- Área bajo la curva (ABC)
- Tiempo Medio de Residencia (TMR)
- Variancia del Tiempo Medio de Residencia (VTMR)

El Tiempo Medio de Residencia (TMR) se explicará a continuación puesto que es de interés para este estudio.

Tiempo medio de residencia (TMR)

El TMR es la media estadística de los tiempos de las moléculas individuales en el sistema a tiempo cero, que son retenidas dentro de este sistema antes de su liberación

(disolución *in vitro*) o de su eliminación de un organismo *in vivo*, o de su liberación dentro del mismo organismo (disolución del fármaco *in vivo*).

La expresión matemática es (Cárdenas Rodríguez et al., 1996):

$$TMR = \frac{\int_0^{\infty} t C_p dt}{\int_0^{\infty} C_p dt}$$

Donde:

t: tiempo; Cp: Concentración plasmática de fármaco; dt: Diferencial de tiempo

Es decir:

$$TMR = \frac{ABCM(0 - \infty)}{ABC(0 - \infty)}$$

El momento cero de la curva, corresponde al área bajo la curva de dicho perfil. El Área Bajo la Curva (ABC) tiene la siguiente expresión:

$$ABC = \int_0^{\infty} C_p dt$$

Para la determinación del ABC (0-∞) existen métodos como el trapezoidal, el logotrapezoidal y el mixto (Doménech Berrozpe et al., 2001).

El primer momento (ABCM) se define como el tiempo promedio durante el cual las moléculas de fármaco intacto permanecen en el organismo durante su tránsito a través de él, hasta ser eliminadas por biotransformación o eliminación (Cárdenas Rodríguez et al., 1996).

La expresión matemática que describe el Área Bajo la Curva del Primer Momento (ABCM) es la siguiente:

$$ABCM \int_0^{\infty} t C_p dt$$

Para calcular el Área Bajo la Curva del Primer Momento la ecuación a utilizar es la siguiente:

$$ABCM(0 - \infty) = ABCM_{0-t} + ABCM_{t-\infty}$$

En donde:

$$ABCM(0 - \infty) = \sum_{t=0}^{t=n} t C_p \Delta t$$

$$ABC(t - \infty) = \frac{t C_{pf}}{\lambda e} + \frac{C_{pf}}{\lambda e^2}$$

Determinación del tiempo medio de residencia (TMR)

1. Obtener la constante de eliminación mediante la regresión de los puntos de la fase terminal del perfil.
2. Estimar el ABC (0-∞) del momento cero a partir del método de los trapecios.
3. Calcular el ABCM (0-t)
 - Obtener la diferencia de los tiempos
 - Multiplicar el tiempo por la concentración.
 - Calcular el promedio del primer producto del paso anterior con el segundo producto.
 - Multiplicar la diferencia de los tiempos por el valor de cada promedio.
 - Sumar
4. Calcular ABC (t-∞) con la fórmula.
5. Obtener el ABCM (0-∞) = ABCM0-t + ABCM t-∞
6. Mediante la razón de las ABC del primer momento sobre el ABC de momento cero calcular el TMR.

Tiempo medio de Absorción (TMA)

Se define como el tiempo medio de residencia de una molécula de fármaco en la zona de absorción hasta alcanzar circulación sistémica (Doménech Berrozpe et al., 2001). Las moléculas de fármaco deben hallarse disueltas en el lugar de absorción para poder absorberse; por este motivo, si el fármaco se administra, en una forma farmacéutica, el TMA representa una función de entrada.

$$MTR \text{ oral} = TMA + TMR \text{ iv}$$

Para el modelo monocompartimental, $MRT \text{ iv} = 1/\lambda e$

$$MAT = MRT \text{ oral} - 1/\lambda e$$

En algunos casos, los datos IV no están disponibles y un MTR de una solución puede ser calculado. El tiempo medio de disolución (TMD) o el tiempo medio de disolución *in vivo* para el medicamento sólido es:

$$TMD = TMR \text{ solido} - TMR \text{ solución}$$

El TMD refleja el tiempo para que el fármaco se disuelva *in vivo*. TMD ha sido evaluado para una serie de medicamentos, pero se estima más fácilmente por los medicamentos que siguen la cinética del modelo de un solo compartimiento. TMD se considera

modelo independiente porque MTR es independiente del modelo. MDT se ha aplicado para evaluar la biodisponibilidad de productos genéricos y en la comparación de la disolución *in vitro* versus biodisponibilidad *in vivo* de la comparación para los medicamentos de liberación prolongada.

Estimación de la constante de absorción.

I. Método de la retroproyección o de los residuales.

El método se basa en utilizar las curvas de niveles plasmáticos obtenidas, por ejemplo, en voluntarios humanos tras la administración extravasal de la forma de dosificación en la cual se supone que el fármaco presenta una absorción completa, es decir, se libera y se absorbe la dosis que contiene (Doménech Berrozpe et al., 2001).

Cuando se administra un fármaco de características monocompartmentales por vía extravasal, los perfiles de concentración plasmática tienen la siguiente morfología análoga.

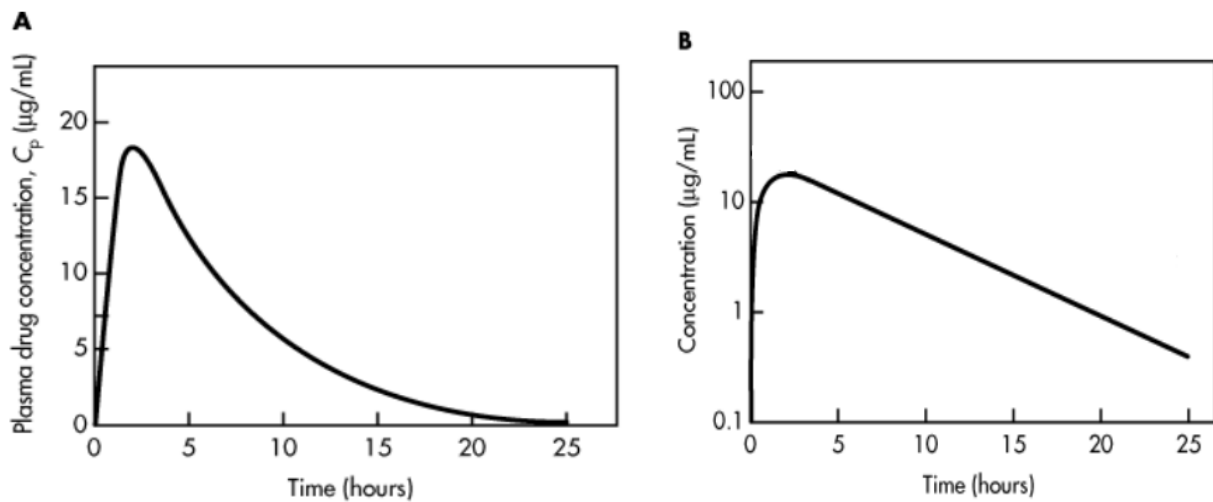


Figura 1 Representación gráfica de un perfil de concentraciones plasmáticas tras la administración extravasal de un fármaco en escala numérica (A) y escala semilogarítmica (B) (Shargel et al., 2004).

Cuando se efectúan ensayos de disolución en el simulador de procesos cinéticos, mediante un modelo matemático, y dado que los fármacos tienen constantes de liberación que les son características dependientes de sus propiedades intrínsecas y que pueden ser estimadas al ser sometidos a condiciones de liberación semejantes a las que suceden in vivo desde el punto de vista cinético (Nazario López, 2010). Esto permite obtener perfiles de disolución con características semejantes a los perfiles de concentración plasmática (la fase de absorción que equivale a una fase de entrada, la concentración plasmática máxima equivalente a la concentración máxima y una fase de eliminación o de salida). Por ejemplo:

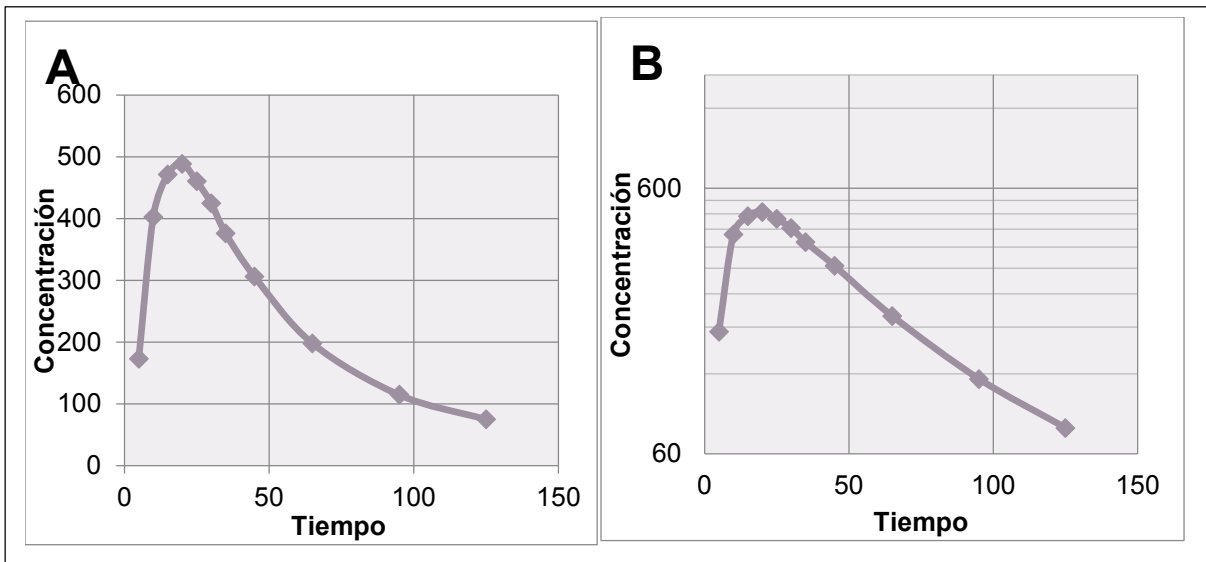


Figura 2 Representación de un perfil de disolución tras el ensayo de disolución de Clorfenicol en el simulador de procesos cinéticos en escala numérica (A) y escala semilogarítmica (B).

Estas representaciones tienen su origen en el modelo compartimental extravasal, es decir, a pesar de que el modelo considera al organismo como un único compartimiento, el proceso global que sufre el fármaco se realiza en dos compartimientos. Uno externo y otro interno (dispositivo de entrada y otro de salida). El proceso de desaparición del fármaco del lugar de absorción y el de eliminación del organismo se asume que presentan cinéticas de primer orden; es decir, que corresponden matemáticamente a procesos exponenciales.

$$\frac{dC}{dt} = (ka * A) - (\lambda e * C)$$

Esta ecuación expresa el proceso global que sufre el fármaco. La variación de la concentración del fármaco en función del tiempo en el compartimiento interno (dispositivo de entrada) proviene de la ganancia instantánea de fármaco por la absorción y de la pérdida instantánea de fármaco por la eliminación (Doménech Berrozpe et al., 2001) (Nazario López, 2010).

Si se toman logaritmos neperianos, se transforma en una ecuación representativa de una recta descendente en función del tiempo:

$$\ln C = -\lambda e * t + \ln C_0$$

Esto indica que al realizar una regresión lineal de los valores de tiempo frente a Ln de la concentración se asume que la fase de absorción es depreciable, por lo tanto se extrapolan los valores de concentración, lo que permite que a los valores extrapolados se resten los valores de concentración y obtener valores residuales.

Porcentaje absorbido

Un método alternativo, que no requiere que se asuma un proceso de absorción de orden cero o uno, es realizando y evaluando gráficos de porcentaje absorbido- tiempo, que se pueden obtener mediante el método de Wagner-Nelson, y el método Loo-Riegman, éste último método es aplicado a modelos multicompartimentales, por lo tanto, el método aplicado al modelo compartimental seriado es el método de Wagner-Nelson.

Método Wagner- Nelson o de la absorción acumulativa

(Doménech Berrozpe et al., 2001)

Este método se basa en el hecho de que la cantidad de fármaco absorbido a tiempo infinito es igual a la cantidad eliminada.

$$Q_a = Q_c + Q_e$$

Q_a: Cantidad absorbida

Q_c: Cantidad que permanece en el cuerpo

Q_e: Cantidad eliminada

De acuerdo con el tratamiento matemático aplicado al método de absorción acumulativa, en cualquier unidad de tiempo se cumple:

$$Q_a = C * V_d + \lambda e * V_d * ABC_{0-t}$$

Y a tiempo infinito:

$$Q_{a\infty} = \lambda e * V_d * ABC_{0-\infty}$$

El método de Wagner-Nelson no requiere una administración intravenosa del fármaco, puesto que los parámetros farmacocinéticos que se precisan son las concentraciones plasmáticas de fármaco tras la administración extravasal. Por lo tanto, se desconoce el valor de V_d , y el valor de λ_e se obtienen de la fase terminal del perfil de concentraciones plasmáticas.

El método de Wagner y Nelson se denomina también método de índice o coeficiente de absorción y se expresa según el siguiente cociente:

$$\frac{Q_a t}{Q_a \infty}$$

Por lo anterior:

$$\frac{Q_a t}{Q_a \infty} = \frac{C \cdot V_d + \lambda_e \cdot V_d \cdot ABC_{0-t}}{\lambda_e \cdot V_d \cdot ABC_{0-\infty}}$$

Dividiendo ambos lados por V_d :

$$\frac{Q_a t}{Q_a \infty} = \frac{C + \lambda_e \cdot ABC_{0-t}}{\lambda_e \cdot ABC_{0-\infty}}$$

La ecuación anterior relaciona la cantidad acumulada de fármaco absorbido después de un cierto tiempo con la cantidad de fármaco absorbido total. Por tanto, este método se basa en el concepto del índice de absorción $(Q_a t / Q_a \infty)$, cuyo valor multiplicado por 100 expresa el porcentaje de la dosis absorbida hasta aquel momento.

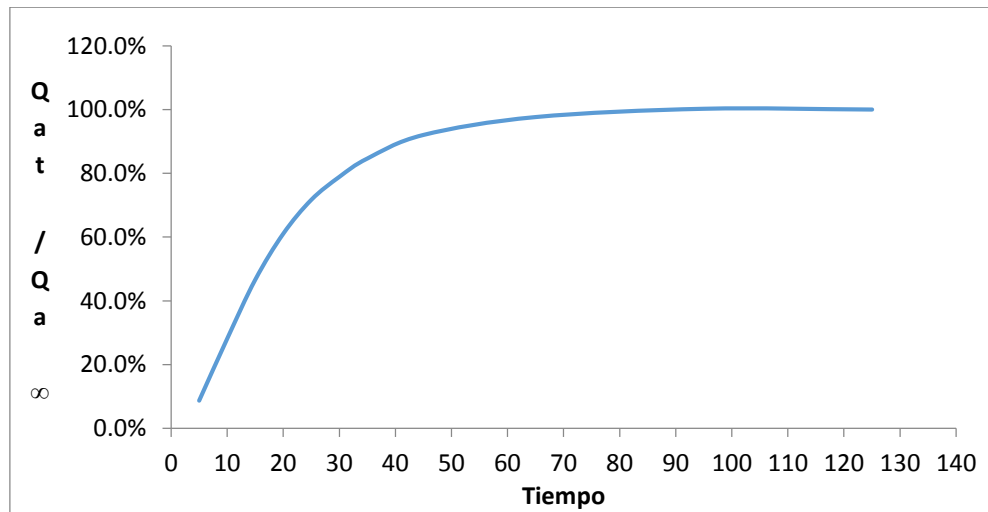


Figura 3 Porcentaje acumulado: absorción-tiempo de la ecuación $(Q_a t / Q_a \infty) \cdot 100$.

Se trata de una curva hiperbólica cuyo valor asintótico es 100 y por consiguiente puede conocerse el grado de absorción del fármaco para cada unidad de tiempo considerado.

Sistema de Clasificación Biofarmacéutica

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB), es un marco científico que clasifica los fármacos considerando como parámetros la solubilidad, la permeabilidad y la combinación de estos con la disolución del fármaco en una forma farmacéutica. Dichos factores están relacionados con el proceso de absorción y plantea como objetivo la posibilidad de establecer correlaciones *in vivo-in vitro* que permitan sustituir los ensayos realizados en humanos por ensayos de disolución.

Una vez que es clasificado el fármaco es posible establecer si los ensayos de disolución *in vitro* pueden ser sustitutos de las pruebas *in vivo* y pueden conseguirse correlaciones entre parámetros relacionados con la respuesta farmacológica y aquellos inherentes al desempeño de la forma farmacéutica (Baena et al., 2008).

Tabla 3 Sistema de Clasificación Biofarmacéutica

Clase I	Alta solubilidad, alta permeabilidad
Clase II	Baja solubilidad, alta permeabilidad
Clase III	Alta solubilidad, baja permeabilidad
Clase IV	Baja solubilidad, baja permeabilidad

Para establecer normas de disolución del medicamento, el SCB, considera al tránsito gastrointestinal para deducir lo que ocurre *in vivo*. Es decir, una vez ingerida la forma farmacéutica el fármaco sufre diferentes procesos:

1. El medicamento, se desintegra en gránulos o agregados.
2. Los gránulos se rompen y originan partículas individuales, en las cuales el fármaco entra en solución.
3. El fármaco en solución, está en posibilidad de ser absorbido. Esto implica un proceso de permeación y conducción hacia la sangre.

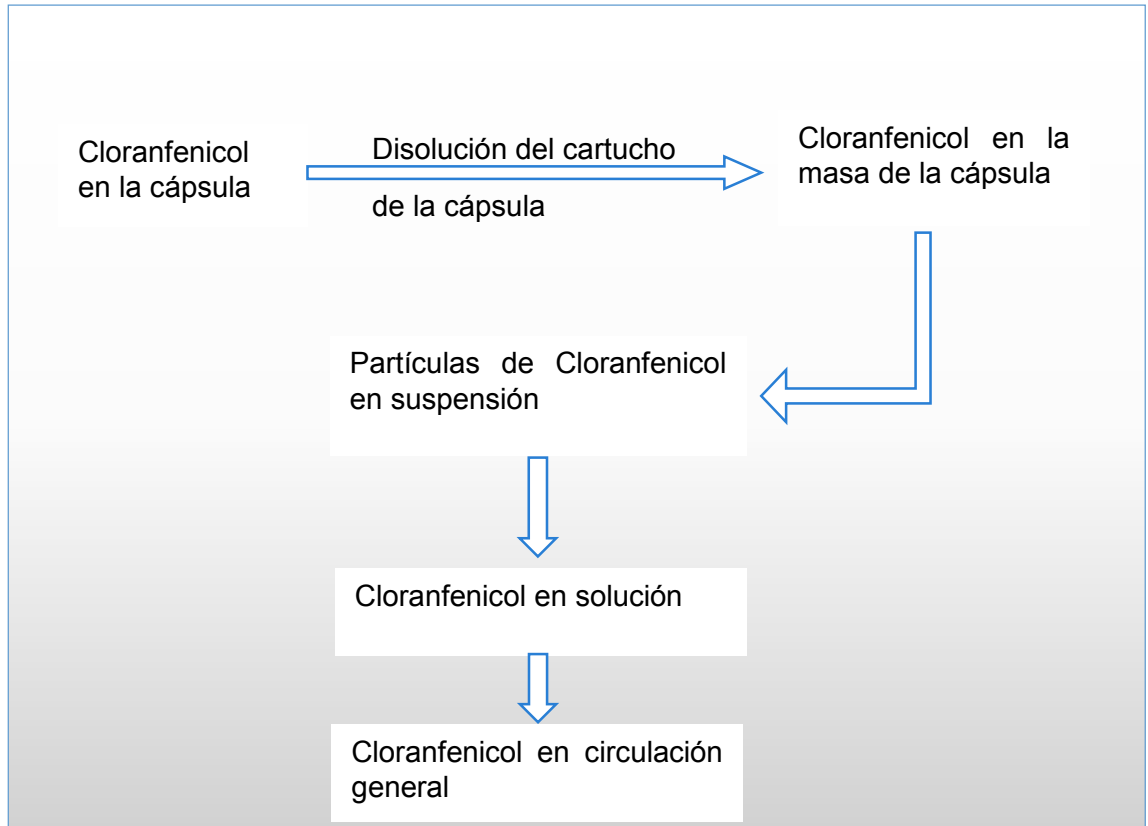


Figura 4 Diagrama de la disolución de la cápsula de Cloranfenicol (Banakar, 1991).

Cada uno de estos procesos involucra diferentes propiedades fisicoquímicas del fármaco que determinan la velocidad a la que estos eventos ocurren y por ende definen la velocidad de absorción. En el caso de la disolución, la solubilidad es la propiedad fundamental que la define, sin dejar de lado otros factores como la superficie y el coeficiente de difusión. La permeación está determinada por el coeficiente de permeabilidad, el cual a su vez depende del coeficiente de reparto del principio activo.

Un fármaco se considera altamente soluble cuando la dosis terapéutica más elevada empleada se disuelve en no más de 250 ml de agua en un intervalo de pH de 1.0 a 7.5. Por otro lado, un fármaco es altamente permeable cuando el grado de absorción en humanos es mayor o igual al 90% de una dosis administrada basada en un balance de masa o en comparación a una dosis intravenosa de referencia.

Para seguir el movimiento de una forma de dosificación a través del tracto GI, todo el proceso tiene que ser desglosado en sus componentes con el fin de verlo de manera mecánica. La aplicación de la primera Ley de Fick a una membrana de la absorción a través de la superficie de la mucosa se puede escribir como en la siguiente ecuación:

$$J_w = P_w * C_w = \frac{dM}{dT} * \frac{1}{A}$$

donde:

J_w es el transporte de masa a través de la pared intestinal,

P_w puede ser asumido como la permeabilidad efectiva,

C_w es la concentración del fármaco en la membrana, y

A es el área de superficie.

En esta ecuación se muestra que la permeabilidad y la solubilidad son las variables fundamentales para describir el transporte de masa a través de una membrana (dM/dT)

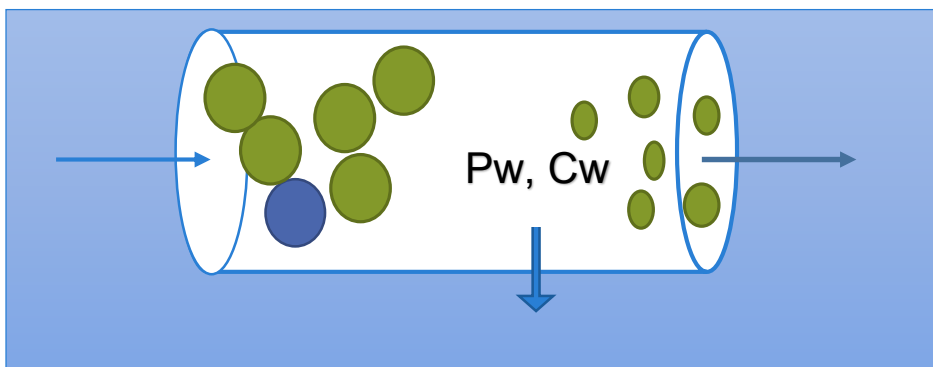


Figura 5 Transporte de masa a través de un tubo. Permeabilidad y concentración.

El SCB define tres números adimensionales, número de dosis (Do) (Aïache et al., 1983), número de disolución (Dn) y número de absorción (An), para caracterizar las sustancias medicamentosas. Estos números son combinaciones de parámetros físicoquímicos y fisiológicos, y representan el GI desde el punto de vista más fundamental de la absorción del fármaco (Löbenberg et al., 2000).

Las ecuaciones que representan dichos números:

- a. Número de dosis

$$Do = \frac{M_o * V_o}{C_s}$$

- b. Número de absorción

$$An = \frac{P_{eff} * TMR}{R} = \frac{T_{res}}{T_{abs}} = \frac{TMR}{TMA}$$

- c. Número de disolución

$$Dn = \frac{3 * D_i * C_s}{r_o^2 * \rho} * T_{res} = \frac{T_{res}}{t_{diss}} = \frac{TMR}{TMD}$$

En las cuales:

R = radio del tubo; D_i = coeficiente de difusión del fármaco; C_s = solubilidad del fármaco; r_o = radio inicial de la partícula del fármaco; T_{res} = tiempo de residencia en el tubo; ρ = Densidad del fármaco; P_{eff} = permeabilidad efectiva; M_o = Dosis; V_o = volumen en el cual se ingiere el medicamento = 250 ml; t_{diss} = tiempo requerido para que una partícula de fármaco se disuelva.

Modelos farmacocinéticos

Un modelo farmacocinético es un modelo de representación esquemática, bajo una forma matemática o simbólica de la evolución in vivo experimentalmente observada como secuencia de la administración de un medicamento. El modelo describe y explica los datos experimentales y reduce un gran número de estos datos a un número de parámetros estandarizados.

El modelo permite:

- ✓ Predecir los resultados de experimentos todavía no realizados.
- ✓ Sugerir protocolos experimentales aun no tenidos en cuenta.
- ✓ Simular la evolución cronológica de cantidades de principio activo y/o metabolitos, en regiones del organismo no accesibles a la experimentación.
- ✓ Proponer esquemas terapéuticos o posologías adaptadas a cada enfermo.
- ✓ Evaluar diferencias en la biodisponibilidad y bioequivalencia de las formulaciones.
- ✓ Simular la influencia de diversas formas galénicas sobre la evolución cuantitativa del destino in vivo del principio activo, etc. (Aïache et al., 1983).

Otro aspecto importante a tener en cuenta en la elaboración de un modelo farmacocinético es si se trata de un modelo lineal o no lineal. Puede definirse la linealidad en un modelo farmacocinético como la proporcionalidad directa entre velocidades de transferencia y la concentración o cantidad, por lo tanto, los procesos cinéticos corresponden a una cinética de primer orden (Doménech Berrozpe et al., 2001).

Modelo compartimental seriado

El modelo compartimental seriado se expresa esquemáticamente:



Figura 6 Esquema del modelo compartimental seriado.

Donde:

A1: Cantidad de fármaco en el sitio de liberación.

Aa: Cantidad de fármaco en el sitio de entrada.

Ac: Cantidad de fármaco en el compartimento o dispositivo central.

Kl: Constante de liberación o disolución global aparente.

Ke: Constante de entrada.

Ks: Constante de salida.

El esquema indica que el simulador mediante el cual se llevará a cabo dicho modelo debe contar con tres sitios o tres dispositivos para: la liberación, la entrada y la salida.

La expresión matemática es la siguiente:

$$Ac = \frac{ke * kl * FD}{(-kl + ks)(-kl + ke)} e^{-kl*t} + \frac{ke * kl * FD}{(-ke + ks)(-ke + kl)} e^{-ke*t} + \frac{ke * kl * FD}{(-ks + ka)(-ks + kl)} e^{-ks*t}$$

F: Biodisponibilidad, su valor es la unidad

D: Dosis, expresada en μg

La ecuación anterior representa el modelo compartimental seriado, el cuál fue resuelto mediante la transformación y anti transformación por el método de las transformadas de Laplace. Este método consiste en reemplazar el dominio del tiempo en una expresión de velocidad por el dominio complejo del operador de Laplace. Esto se logra eliminando la variable independiente (tiempo) y sustituyéndola por el operador de Laplace (Martínez García, 2006) Permitiendo manipular una expresión de velocidad compleja mediante técnicas algebraicas convencionales una vez que la variable tiempo ha sido reemplazada por el operador de Laplace y, una vez resuelta, volver a la expresión en la cual incluye la variable mediante el tratamiento anti transformación (Guerrero González, 2010).

Además por medio de esta ecuación es posible conocer la concentración teórica de fármaco en cualquier punto del perfil de disolución, también es posible conocer la constante de liberación utilizando Solver, complemento de programa Excel, el cual devuelve el valor de KI a partir de la simulación teórica, así que este valor es el más cercano posible al valor real (Nazario López, 2010). Para ello es importante controlar en el proceso de disolución un flujo constante y conocer exactamente el volumen en cada uno de los dispositivos de entrada y salida.

Descripción del Simulador de Procesos Cinéticos seriados o Simulador de Procesos Farmacocinéticos.

El simulador está conformado por dos recipientes que reciben un flujo constante de medio a una velocidad controlada, es decir se controla la velocidad de entrada y salida.

Los recipientes son dos dispositivos que representan dos compartimentos: 1) entrada, 2) central. Los cuales se representan en la siguiente figura:

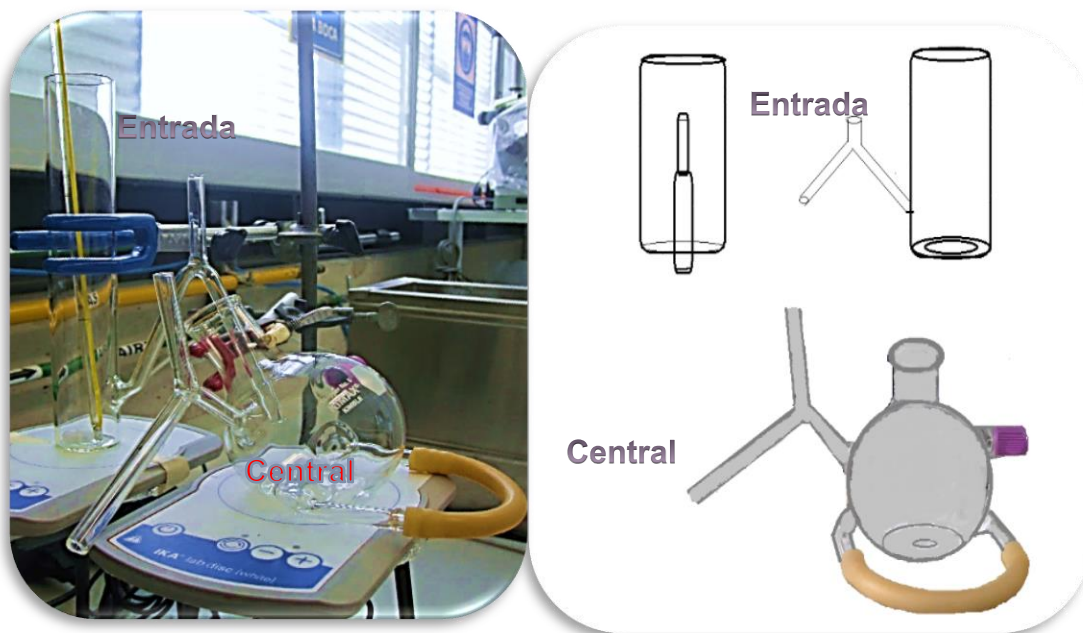


Figura 7 Representación del simulador de procesos cinéticos seriados.

El dispositivo de entrada tiene forma cilíndrica de volumen aproximado a 80ml y tiene una conexión independiente al dispositivo central, este último tiene forma esférica de volumen aproximado a 250ml con una boca que da lugar al tubo de conexión con el dispositivo de entrada.

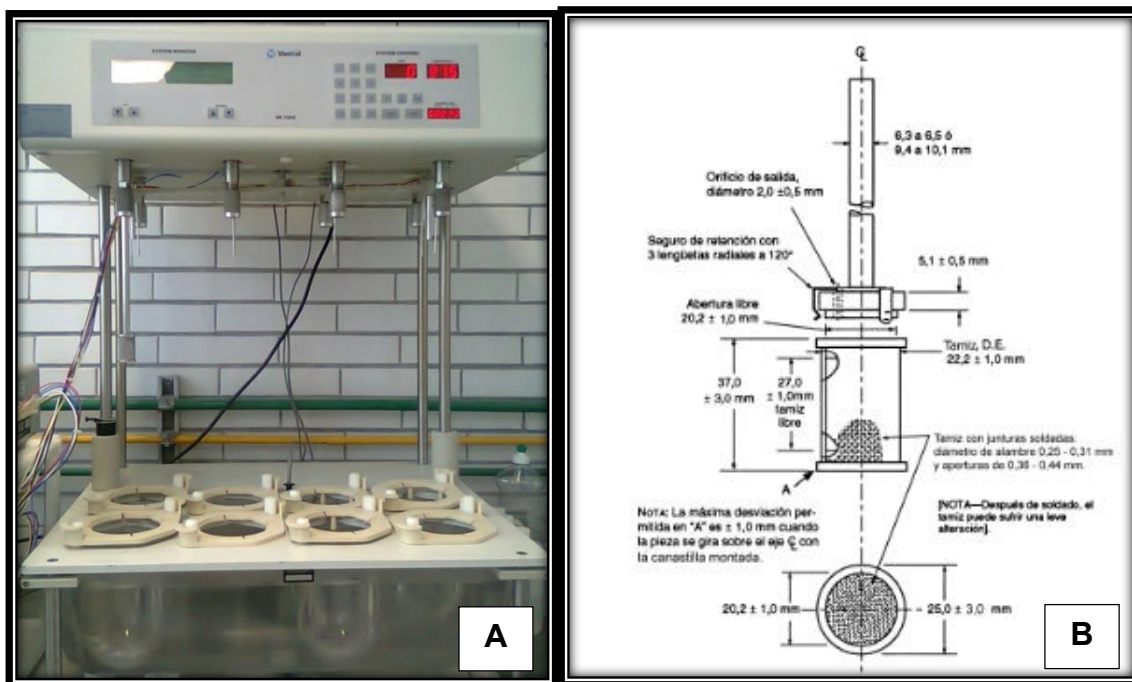
Para obtener las muestras con el fármaco disuelto que provienen del dispositivo de entrada, el dispositivo central cuenta con un tapón color magenta (tipo Vacutiner®) del lado lateral derecho y por el izquierdo es la salida del fármaco disuelto.

-Aparato I

El aparato está conformado por:

- Un vaso, con o sin tapa, de vidrio u otro material inerte y transparente.
- Un motor.
- Un eje propulsor metálico y una canastilla cilíndrica.

El vaso debe estar parcialmente sumergido en un baño de agua adecuado de cualquier dimensión o recibe calor de un dispositivo adecuado, en una camisa de calentamiento. Durante el transcurso de la prueba, el baño de agua o el dispositivo de calentamiento mantienen la temperatura en el interior del vaso a $37 \pm 0,5$ y garantiza que el fluido del baño se mantenga en movimiento suave y constante. Ninguna parte del equipo, ni el entorno en el cual está colocado, aumentan significativamente el movimiento, agitación o vibración, por encima de los producidos por el elemento de agitación que gira con suavidad. Las paredes del vaso cilíndrico tienen un reborde en el extremo superior. Se puede utilizar una tapa si fuera necesario para minimizar la evaporación (USP30, 2007); (FDA, 1997).



Adaptación del simulador de procesos cinéticos seriados en el aparato I.

La adaptación del simulador de procesos cinéticos seriados en el aparato I tiene las siguientes ventajas: por un lado, el eje propulsor y la canastilla cilíndrica del aparato se introducen de forma que la canastilla tenga una distancia máxima de 1.5cm respecto a la profundidad del dispositivo de entrada del simulador y rote suavemente sin fluctuaciones que pudieran afectar los resultados. Esto se realiza con el fin de controlar la agitación, de manera que la velocidad es constante (50 rpm o 100rpm) en el compartimento de entrada. Dado a que la agitación es un factor importante en la disolución.

Segundo, el control de la temperatura a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ del medio de disolución en el compartimento de entrada donde se llevará a cabo el proceso de liberación. Aunque cabe mencionar que se demostró estadísticamente que no hay diferencia significativa que la temperatura (25°C y 37°C) del medio influya en el funcionamiento del simulador (López Cervantes, 2014).

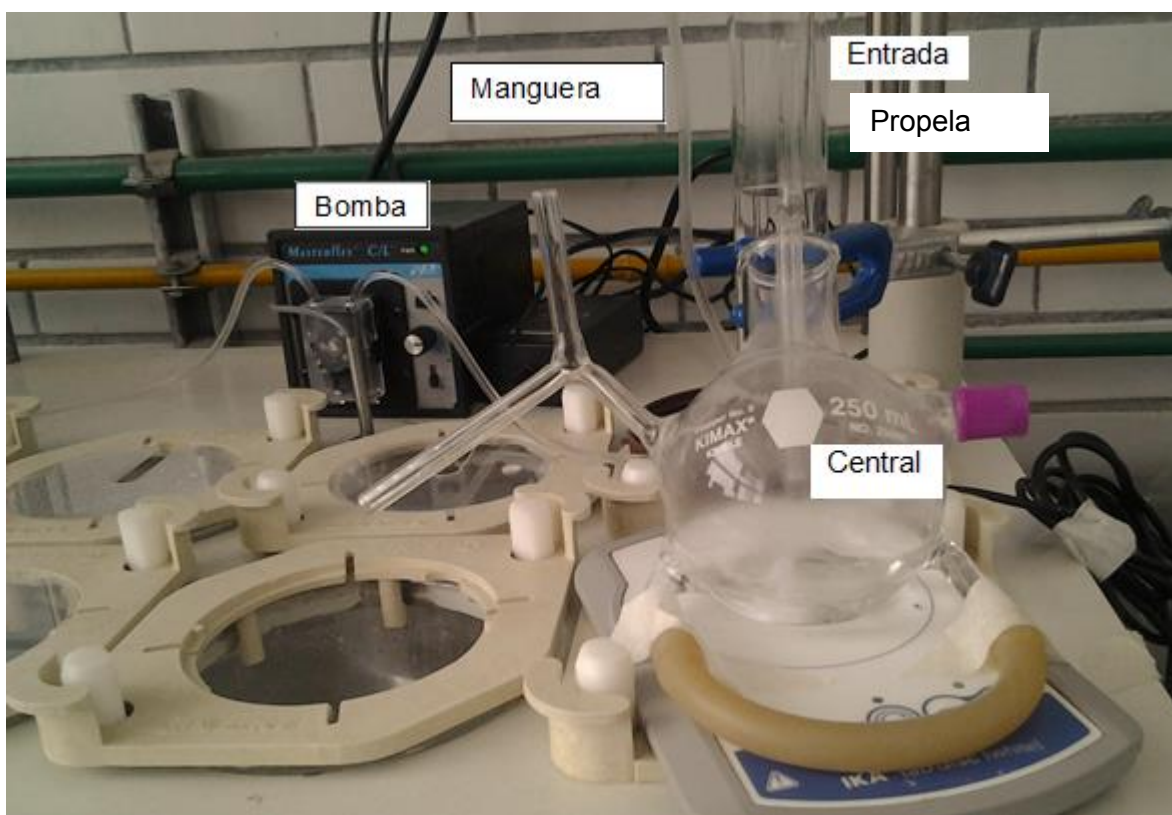


Figura 9 Imagen frontal del simulador de procesos cinéticos.

Para la recirculación del medio al simulador se realiza por medio de una bomba la cual la manguera tiene unida una cánula delgada al dispositivo de entrada en la parte posterior (figura 10). Es mediante esto que se puede controlar el flujo, del cual se controla el orden de la cinética, primer orden, y por consiguiente las constantes.

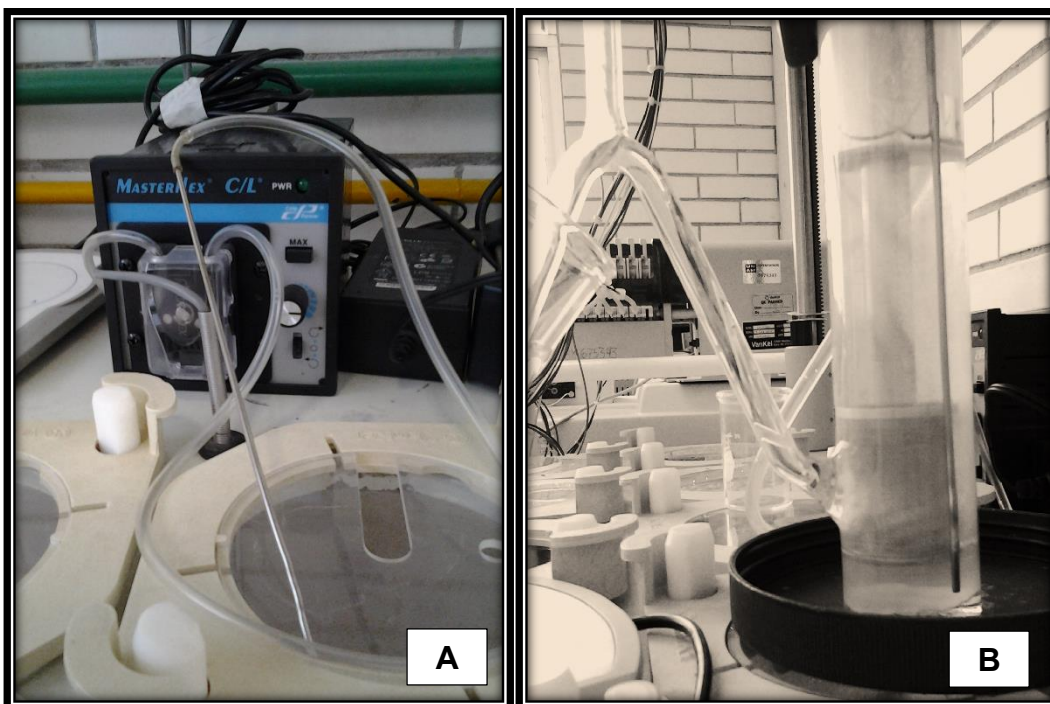


Figura 10 Esquemas: (A) de la bomba y cánula, (B) la cánula en el dispositivo de entrada.

Validación de Métodos Analíticos

La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; es decir cumple con su propósito.

Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente en específico de la muestra. Un analito se define como un componente específico en una muestra a medir en un análisis; por lo que un método analítico mide un componente específico (analito) en una muestra y como todo proceso de medición, este debe ser confiable para ser utilizado con un propósito definido (Alcántara et al., 2002).

La metodología para la validación del método analítico requiere la preparación de un placebo cargado en caso de que se conozca la matriz o los componentes que acompañan al analito. Cuando el placebo no está disponible o la matriz es desconocida para la validación del método, existen varias opciones, una de ellas es el método del estándar adicionado, o también se conoce como método de adiciones incrementadas, método de auto estandarización y método de adición patrón (Hernández Patlán et al., 2011).

*Método del estándar adicionado*²

Cuando una muestra obedece la ley de Beer, es decir, que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración se puede usar el método del estándar adicionado, el cual tiene como objetivo detectar y eliminar algunas fuentes de error que producen sesgos en la determinación en un método analítico (Cardone, 1983).

Con este método se asume que tanto el estándar como la muestra son afectados de la misma forma, ya que se adicionan cantidades conocidas de la especie a ser determinada a un volumen definido de la solución de concentración desconocida.

El método de estándar adicionado puede detectar sesgos en el método analítico como el error constante y el error proporcional. El primero consiste en un sesgo en la respuesta ya sea positivo o negativo no atribuible al analito, que se puede medir directamente, por ejemplo, la interferencia en la matriz y las fracciones del analito.

El error proporcional es el resultado de un cambio en la respuesta del analito por unidad de concentración, este puede ser atribuible a parámetros del sistema de medición y al método. La magnitud, es constante en todos los niveles de concentración evaluados.

Para el uso de esta técnica existen dos metodologías:

Convencional: La cual implica la preparación de una serie de soluciones en recipientes separados que contienen cada uno, la misma cantidad de muestra desconocida, pero diferentes cantidades de solución patrón (incluyendo que no contenga la solución patrón) (Brown, 2011).



Figura 11 Representación esquemática del método del estándar adicionado (Brown, 2011).

² También conocido como adiciones patrón o método de adiciones incrementadas, método de auto estandarización.

La figura 11 es la representación de cuatro soluciones preparadas. Las muestras A-D se analizan por separado. Por lo general, la solución patrón sería sustancialmente más concentrado que el desconocido (la muestra).

Esta técnica no es apropiada cuando la muestra es insuficiente para ser dividida en alícuotas o cuando la manipulación y preparación de varias soluciones diferentes darían lugar a incertidumbres analíticas más grandes. También es menos adecuada cuando las mediciones se realizan cerca del límite de detección y por lo tanto, una dilución de la solución desconocida daría lugar a la concentración de analito siendo este indetectable.

- i. Secuencial. Se añade al recipiente y se realiza la medición analítica. A continuación se añade una porción de masa conocida de una solución estándar al recipiente y nuevamente se realiza la medición analítica. Este último paso se repite hasta que se hayan generado puntos suficientes para desarrollar una curva de calibración.

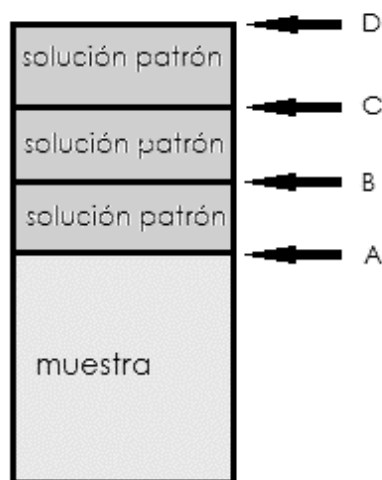


Figura 12 Representación esquemática de la técnica de adiciones estándar secuencial (Brown, 2007).

La figura 12 es el esquema de cuatro soluciones preparadas secuencialmente en el mismo recipiente. En cada etapa, A-D, se toma una medición analítica. Tomando en cuenta que no se emplea líquido equilibrio.

Esta se utiliza para métodos analíticos automáticos y cuando sólo se busca determinar un componente en la muestra.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- ✚ Comparar los perfiles de disolución de Cloranfenicol en dos presentaciones: cápsulas de 500 mg y dos cápsulas de 250 mg, obtenidos con un simulador de procesos cinéticos para evaluar su similitud.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ✚ Desarrollar un método analítico espectrofotométrico UV para la cuantificación de Cloranfenicol en perfiles de disolución utilizando mínimos cuadrados parciales en el análisis de la respuesta analítica.
- ✚ Validar el método analítico para demostrar que cumple con los requisitos para la elaboración de perfiles de disolución al cuantificar Cloranfenicol en Cápsulas de 500 mg, por medio de placebos cargados.
- ✚ Demostrar la confiabilidad del método analítico para cuantificar Cloranfenicol en el estudio de disolución de las cápsulas de 250 mg mediante el método de adiciones patrón.
- ✚ Determinar las condiciones experimentales del simulador de procesos cinéticos para la realización de las pruebas de disolución.
- ✚ Realizar y comparar los perfiles de disolución de las cápsulas de referencia y de prueba en dos medios: solución amortiguadora de acetatos pH 4.5 y solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 en el simulador de procesos cinéticos para obtener los parámetros de la transferencia cinética.

IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Durante el desarrollo experimental se utilizaron los siguientes materiales, reactivos, equipos y softwares. Estos se encuentran en el Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (LEDEFAR), campo 4 y el Laboratorio Experimental Multidisciplinario de Farmacia, campo 1 (LEM FARMACIA) de la FESC.

A) Materiales, reactivos y equipos utilizados

Tabla 4 Material utilizado

Materiales	Especificaciones
Matraz volumétrico Clase A	25ml, 50ml, 100ml, 1L, 2L
Varillas de vidrio	
Vasos precipitados	25ml, 50ml, 150ml, 250ml, 500ml, 1L
Celdas de cuarzo	1cm
Pipetas volumétricas Clase A	1ml, 2ml, 3ml, 4ml, 5ml, 6ml, 8ml, 10ml
Pisetas	
Cuentagotas	
Barras magnéticas	
Pesa-muestras	
Simulador de procesos farmacocinéticos	(Dispositivo de entrada y central)
Manguera de plástico	Seriar el simulador
Termómetro	100°C
Jeringas de plástico	10ml
Tubos de ensaye	
Gradillas	
Filtros: membrana millipore 45µ	
Soporte universal	Estándar
Pinza con nuez	
Perilla de succión	
Cánula metálica	
Papel Whatman	No 42

Tabla 5 Reactivos utilizados con sus especificaciones y Marca

Reactivos	Especificaciones	Marca
Fosfato monobásico de Sodio	Monohidratado	
Acetato de Sodio	Trihidratado	J.T. Baker
Hidróxido de Sodio	Hojuelas	Fermont ®
Ácido Clorhídrico	Concentrado	
Agua desionizada		Milli Q
Ácido acético Glacial		
Cloruro de Potasio		
Cloranfenicol	Estándar Secundario	No control: MP2G990 Dispensario 2 Pureza: 100.29% BH Clave: ES-C12-VIII-13

Tabla 6 Equipos manejados

Equipo	N. Serie	Modelo	Marca	Actividades
Espectrofotómetro	-----	Cary100	Varian®	Obtención de absorbancias.
Balanza Analítica	1114050584	A20640	OHAUS	Pesado de materias primas, activo, reactivos.
Balanza Electrónica	1119430155	2186421	Mettler Toledo	Pesado de materias primas, activo, reactivos.
Potenciómetro	-----	SEVEN MULTI	Mettler Toledo	Ajustar pH del medio de disolución Solución amortiguadora de Fosfatos, Solución amortiguadora de acetatos y HCl.
Agitador magnético				
Cronómetro				
Bomba peristáltica			Masterflex ®	
Aparato l disolutor			VANKEL	Se utilizó una canastilla y propela para contener y agitar la (s) capsula(s).
Ultrapurificador de agua	FOMA61689A	MQ reference	MilliQ MILLIPORE	Agua desionizada.
Prensa hidráulica	469320544	41000-310	CARVER PRESS	Compresión de excipientes.

Tabla 7 Softwares utilizados

Nombre Software	Actividades
Cary Scan	Obtención de los espectros de absorción del Cloranfenicol en diferentes medios.
Cary Simple reads en formato txt	Obtención de las absorbancias en diferentes longitudes de onda.
ISHEJA UNIC versión 1.0.0 que maneja algoritmo de Haaland	Análisis multivariante: Obtención de la respuesta analítica.
Microsoft Excel 2010	Análisis estadístico y gráficos para la validación del método analítico. Obtención de los parámetros cinéticos, gráficos y análisis estadístico.

B) Diagrama general de las actividades desarrolladas

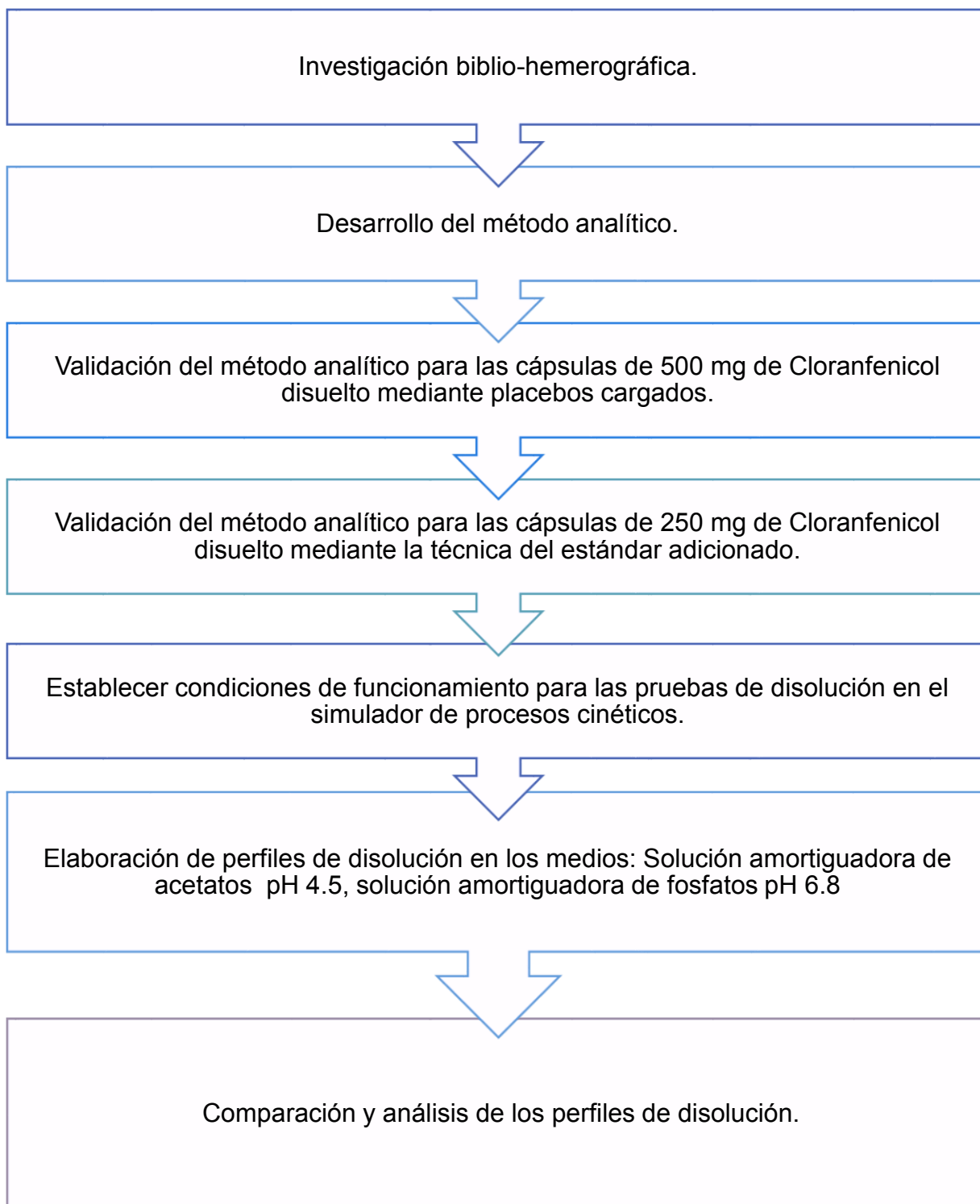


Figura 13 Diagrama de las actividades desarrolladas.

C) Validación del método analítico para la cuantificar las muestras del medicamento de referencia.

Método de adiciones patrón o estándar adicionado

Preparación de las muestras

Se pesaron 10 cápsulas del producto de referencia y se determinó el peso promedio que fue de 0.36815g, posteriormente se vertió el contenido de dichas cápsulas en un frasco limpio y seco. Se pesó aproximadamente las siguientes cantidades:

- 0.022g de polvo de la capsula, el cual equivale a 15mg de Cloranfenicol.
- 0.066g de polvo de la capsula, el cual equivale a 45mg de Cloranfenicol.
- 0.085g de polvo de la capsula, el cual equivale a 60mg de Cloranfenicol.

Estas mediciones, se realizan con la finalidad de obtener muestras semejantes a las muestras de los ensayos de disolución. Por tanto, se disolvieron en 500ml de medio (solución amortiguadora: HCl pH 1.2, Acetatos pH 4.5 y fosfatos pH 6.8) a 37°C y se sometieron a 15 min en agitación con un ultrasonido, esto significa que se retó el método al promover la disolución de excipientes contenidos en dicha muestra. Después se filtró la muestra con papel Whatman No 42 en un vaso de precipitados de 250ml. Las soluciones filtradas fueron etiquetadas como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 8 Preparación de las muestras disueltas del medicamento de referencia.

Etiqueta	Equivalente de Cloranfenicol	Concentración teórica ($\mu\text{g/ml}$)
M1	15	30
M2	45	90
M3	60	110

Precisión y exactitud

A partir de una solución stock de concentración aproximada de 1750 $\mu\text{g/ml}$ se prepararon tres niveles de concentración: C1= 11 $\mu\text{g/ml}$, C2=33 $\mu\text{g/ml}$, C3= 55 $\mu\text{g/ml}$. Posteriormente, cada una de las concentraciones se vertió con pipeta volumétrica de 2ml en un matraz volumétrico de 25ml. Estas se llevaron al aforo con las muestras filtradas (M1, M2, M3 como se observa en la tabla 8) y se llevó a detección a las siguientes longitudes de onda: 310, 307, 304, 301, 298, 295, 292, 289,287, 284, 281, 278, 275, 272, 269, 267, 266, 263, 260, 257, 254, 251, 248, 241nm para realizar su análisis en el programa *ISHEJA* (mínimos cuadrados parciales, mcp, con el algoritmo de Haaland) ver anexo F. Este procedimiento se realizó por sextuplicado y aleatorizado. Las muestras que abarcan concentraciones entre los puntos de la curva de calibración se llevan a detección y las que se encuentran por encima se realiza un

proceso de dilución 1 en 5 (5ml en 25ml) o 3ml en 25ml en el caso de la solución de acetatos ver anexo G.

La corrección en blanco se realizó al adicionando 2ml de solución amortiguadora respectivamente (HCl pH 1.2, acetatos pH 4.5 y fosfatos pH 6.8) en el matraz de 25ml y se lleva al aforo con las muestras filtradas M1, M2 y M3. Estas se etiquetan como M1', M2' y M3'. Este procedimiento se realizó por sextuplicado y aleatorizado.

En la siguiente tabla se expresa las concentraciones teóricas esperadas y las ensayadas:

Tabla 9 Concentraciones teóricas y concentraciones a estimar de la precisión y exactitud. Método de adiciones patrón.

	Concentración teórica	Concentración a adicionar				Concentración teórica	Concentración a estimar		
		C1	C2	C3			A1	A2	A3
M1	30	11	34	57	M1'	30	41	64	87
M2	90	11	34	57	M2'	90	101	124	147
M3	110	11	34	57	M3'	110	121	144	167

Para obtener la concentración recuperada es necesario extrapolar las concentraciones estimadas provenientes del análisis del programa, mcp, *ISHEJA*. Tanto de las muestras como de las adicionadas, es decir, se realiza un gráfico donde la variable independiente son M1', M2', M3' y la variable dependiente son "las adicionadas" A1, A2, A3.

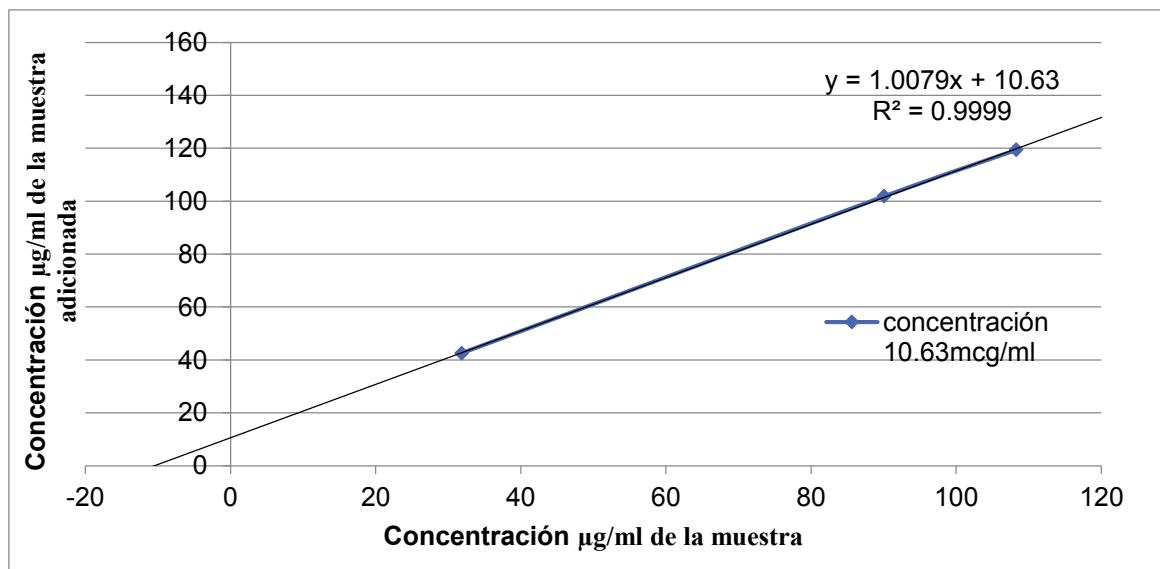


Figura 14. Gráfico de la concentración de la muestra versus concentración adicionada. Método estándar adicionado.

La figura anterior es un ejemplo de la obtención de la concentración de Cloranfenicol de A1 en las muestras M1', M2', M3'.

Linealidad del método

De una solución stock de concentración aproximada de 1750µg/ml se prepararon cinco niveles de concentración: C1= 11µg/ml, C2=22 µg/ml, C3=33 µg/ml, C4= 44 µg/ml, C5= 55 µg/ml

De la misma forma que en la evaluación de exactitud y precisión, cada una de las concentraciones se vertió con pipeta volumétrica de 2ml en un matraz volumétrico de 25ml. Estas se llevaron al aforo con las muestras filtradas (M1, M2, M3). La detección se realizó en las siguientes longitudes de onda: 310, 307, 304, 301, 298, 295, 292, 289,287, 284, 281, 278, 275, 272, 269, 267, 266, 263, 260, 257, 254, 251, 248, 241nm, posteriormente, por el análisis en el programa *ISHEJA* (mínimos cuadrados parciales con el algoritmo de Haaland) se obtuvieron las concentraciones. Este procedimiento se realizó por triplicado y aleatorizado.

La corrección en blanco se realizó adicionando 2ml de solución amortiguadora respectivamente (HCl pH 1.2, acetatos pH 4.5 y fosfatos pH 6.8) en el matraz de 25ml y se llevó al aforo con las muestras filtradas M1, M2 y M3. Estas se etiquetan como M1', M2' y M3'. Este procedimiento se realizó por triplicado y aleatorizado.

Con fines didácticos, la siguiente tabla contiene las concentraciones teóricas esperadas y las ensayadas:

Tabla 10 Concentraciones teóricas y concentraciones a estimar de la linealidad al aplicar el método de adiciones patrón.

		CONCENTRACIÓN A ADICIONAR							CONCENTRACIÓN A ESTIMAR					
		C1	C2	C3	C4	C5			A1	A2	A3	A4	A5	
M1	30	11	22	33	44	55		M1'	30	41	52	63	74	85
M2	90	11	22	33	44	55		M2'	90	101	112	123	134	145
M3	110	11	22	33	44	55		M3'	110	121	132	143	154	165

Para obtener la concentración recuperada es necesario extrapolar las concentraciones estimadas provenientes del programa de *ISHEJA*. Tanto de las muestras como de las adicionadas, es decir, un gráfico donde la variable independiente son M1', M2', M3' y la variable dependiente son "las adicionadas" A1, A2, A3, A4 y A5.

D) Condiciones de los ensayos de disolución

- I. Volumen de disolución: Dado a que se realizó bajo un modelo cinético seriado no hay un volumen definido, sin embargo, el volumen aproximado es 4.5L por día de ensayo.
- II. Volumen de muestra: 11ml.
- III. Volumen de la muestra analítica 5ml (fosfatos) y 3ml, 5ml (acetatos).
- IV. Velocidad de agitación: 100rpm.
- V. Temperatura: $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.
- VI. Flujo: 14-15 ml/min.
- VII. Tiempos de muestreo: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 45, 65, 95 y 125 min.
- VIII. Forma de muestreo: 20 segundos antes del tiempo de muestreo se introdujo la jeringa y succionar la solución lentamente.
- IX. Forma de colocar la(s) unidad de dosis: Se colocaron una o dos cápsulas (dependiendo de la prueba) dentro de la canastilla, y se introdujo en el dispositivo de entrada.
- X. Unidad de dosis empleadas: 6 cápsulas de 500 mg, medicamento de prueba por cada medio y 12 cápsulas de 250 mg, Medicamento de referencia por cada medio.
- XI. Asignación del orden de cápsulas por día: Aleatoria por randomización.
- XII. Los perfiles de disolución se elaboraron en 6 días consecutivos en la solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 y 6 días consecutivos para la solución amortiguadora de acetatos pH 4.5.
- XIII. En cada día se realizaron dos perfiles: uno al medicamento de prueba y otro al medicamento de referencia, con la finalidad de comparar los dos medicamentos.

E) Ensayos para la obtención de los perfiles de disolución.

Procedimiento para la adaptación del montaje del simulador en el disolutor.

1. Introducir el dispositivo de entrada de manera que la salida de dicho dispositivo sea colocado en la boca de entrada del compartimiento de salida el cual estará sobre un agitador magnético.
2. En la propela colocar la tapa; y la canastilla en el aparato disolutor
3. Ajustar la distancia del dispositivo de entrada y la canastilla justo en el centro para evitar fluctuaciones.
4. La altura de la canastilla al dispositivo de entrada será menor a 2cm.
5. Encender el disolutor y rotar a 100rpm la propela para verificación del sistema.
6. Llenar el dispositivo de central con el medio para facilitar el llenado del simulador.
7. Agregar una barra magnética al compartimiento de salida y agitar.
8. Colocar un vaso de precipitados de 250 ml en la salida del simulador. Este estará dentro del vaso disolutor más próximo al dispositivo de salida.
9. Colocar la manguera de la bomba peristáltica donde la distancia del compartimiento de entrada sea de 70cm y de la bomba Masterflex ® a los medios otros 50 cm.
10. Introducir la cánula de la manguera al dispositivo de salida de forma que la cánula esté en la parte posterior del dispositivo.
11. Ya alcanzada la temperatura del medio (45°C), encender los agitadores magnéticos y encender la bomba hasta llenar el sistema, el cual se indica con las primeras gotas en el compartimiento de salida. Esto asegura que la temperatura aproximada en el dispositivo de entrada sea de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.
12. Encender el disolutor y rotar la canastilla a 100rpm.
13. Regular el flujo a 15 ml/min, manipulando la bomba peristáltica.

En las siguientes figuras se muestra el montaje del simulador en el aparato:



Figura 15 Imagen lateral izquierdo del simulador de procesos cinéticos.



Figura 16 Imagen lateral derecho del simulador de procesos cinéticos.

Procedimiento del ensayo de disolución

1. Una vez regulado el flujo, subir la propela e introducir la cápsula de 500 mg o dos capsulas de 250 mg de Cloranfenicol³ en la canastilla e inmediatamente tapar.
2. Bajar rápidamente la propela y rotar a 100rpm.
3. El conteo inicia después de las primeras gotas constantes observadas en la salida.

Tabla 11 Orden de los ensayos de cada medicamento

Orden		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
Primero (mañana)	Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8	A	B	A	A	B	B
Segundo (tarde)		B	A	B	B	A	A
Primero (mañana)	Solución amortiguadora de acetatos pH 4.5	B	B	A	B	A	A
Segundo (tarde)		A	A	B	A	B	B

A: Dos cápsulas 250 mg de Cloranfenicol.

B: Una cápsulas 500 mg de Cloranfenicol.

Muestreo:

1. Tomar 10 ml de muestra con una jeringa de 10ml por la parte de lateral del dispositivo de central (tipo Vacutainer® figura 17) y colocar en un tubo de ensayo previamente rotulados con los tiempos respectivos.

Tiempos de muestreo: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 45, 65, 95 y 125min.

Nota: veinte segundos antes del tiempo indicado extraer cuidadosamente la muestra, evitando que se mueva el dispositivo central.

2. Después de los 125min detener el disolutor y el agitador magnético.
3. Subir la propela hasta la máxima altura y retirar la canastilla del dispositivo de entrada.
4. Medir el volumen de cada uno de los dispositivos con las probetas correspondientes:
 - Dispositivo de entrada: Probeta de 100ml.
 - Dispositivo de salida: Probetas de 250ml y 25ml.

³ La asignación de las cápsulas y el orden es aleatorio.

5. Filtrar las muestras obtenidas con ayuda de la jeringa y una membrana de 0.45 μ .
6. Obtener las absorbancias de las muestras en el espectrofotómetro con las celdas de cuarzo a las longitudes de onda: 310, 307, 304, 301, 298, 295, 292, 289, 287, 284, 281, 278, 275, 272, 269, 267, 266, 263, 260, 257, 254, 251, 248, 241nm. Ajustando a cero con un blanco de HCl pH 1.2.
7. Analizar mediante el programa *ISHEJA* para la obtención de las concentraciones.

*Medio: Solución amortiguadora de acetatos pH 4.5, solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8

Descripción del proceso de ensayo para determinar la transferencia de Cloranfenicol en solución mediante el simulador de procesos cinéticos.

Suponiendo, que la transferencia es independiente de la sustancia que se utilice, de la magnitud de la concentración (sin que haya saturación) y del pH. El objetivo es reducir las variables a fin de utilizar el número suficiente de datos, y que estos datos proporcionen información confiable y que las inferencias sobre la población sean precisas al comparar las cápsulas mediante los momentos estadísticos.

El medio que se utilizó es agua desionizada para obtener el perfil de transferencia de Cloranfenicol, materia prima, en solución. Para esto se pesó aproximadamente exacto 400 mg de Cloranfenicol materia prima y se disolvió completamente en 200ml de agua desionizada; Una vez regulado el flujo, subió la propela y la canastilla, se vertió 25ml de la solución anterior. Se introdujo rápidamente la propela y se controló la velocidad de rotación a 100rpm. Se inició el conteo después de las primeras gotas constantes observadas en la salida. Los tiempos de muestreo fueron los siguientes: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 30, 40 y 60 min. El volumen de la muestra es 11ml, el mismo que en los ensayos de disolución.

V. RESULTADOS

Los resultados, criterios y conclusiones sobre las validaciones del método analítico mediante placebos cargados y el método del estándar adicionado se encuentran en el anexo F. Una vez validado el método analítico para la cuantificación de Cloranfenicol en ambas presentaciones y, determinadas las condiciones para los ensayos de disolución se realizaron los perfiles de disolución en los medios solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 y solución amortiguadora de acetatos pH 4.5.

Perfiles de disolución en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8.

En el estudio se comparan los perfiles de disolución de Cloranfenicol en cápsulas utilizando el simulador de procesos cinéticos (SIPROCIN) en los medios: solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 y solución amortiguadora de acetatos pH 4.5.

En la figura 17 y tabla 12 se expresan las concentraciones promedio de Cloranfenicol provenientes de cada uno de los medicamentos de prueba y referencia respectivamente en la solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8, como lo indica la normatividad como requisito en un informe de intercambiabilidad por estudios de disolución (Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013).

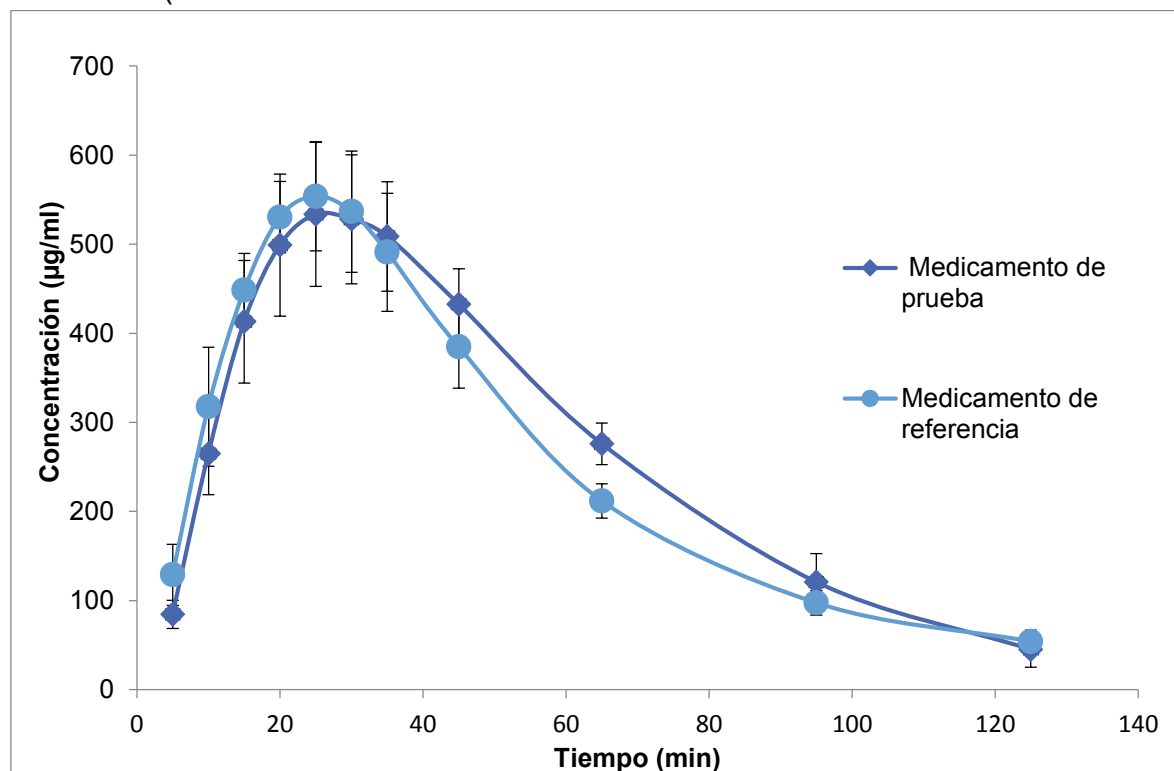


Figura 17 Perfiles de disolución promedio de Cloranfenicol de los medicamentos prueba y referencia en medio solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8

Tabla 12 Concentraciones promedio del medicamento de prueba y de referencia respectivamente en la solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8.

Tiempo (min)	Medicamento de prueba					Medicamento de referencia				
	Promedio (µg/m)	desvest	% CV	ICS	ICI	Promedio (µg/ml)	desvest	% CV	ICS	ICI
5	84.53	15.94	18.85	97.28	71.78	128.95	34.32	26.62	156.41	101.48
10	264.91	45.91	17.33	301.64	228.17	317.65	66.77	21.02	371.07	264.22
15	413.01	68.79	16.65	468.05	357.97	448.35	41.32	9.22	481.41	415.28
20	498.95	79.75	15.98	562.76	435.13	530.35	40.00	7.54	562.36	498.35
25	533.36	80.84	15.16	598.04	468.68	553.67	61.23	11.06	602.66	504.68
30	527.90	72.45	13.72	585.87	469.92	536.56	68.01	12.68	590.98	482.13
35	508.69	61.54	12.10	557.93	459.46	490.97	66.21	13.49	543.95	438.00
45	432.67	39.76	9.19	464.48	400.85	384.68	46.21	12.01	421.66	347.71
65	276.01	23.44	8.49	294.76	257.25	211.81	19.32	9.12	227.26	196.35
95	120.80	31.77	26.30	146.22	95.37	97.38	13.65	14.02	108.30	86.46
125	45.08	19.74	43.78	60.87	29.29	53.99	12.80	23.70	64.23	43.75

Nota: La fila resaltada corresponde al T_{máx} y C_{máx} promedio.

En la figura 17 y tabla 12 se observa que la $C_{m\acute{a}x}$ es mayor (alrededor de $20\mu\text{g/ml}$) en las cápsulas de referencia respecto a las de prueba, aunque el $T_{m\acute{a}x}$ (25 min) es el mismo en ambos perfiles; éstos resultados fueron similares a los obtenidos en el estudio *in vivo*. Lo anterior indica una diferencia en la velocidad con la cual se dispone el fármaco en el dispositivo de entrada al dispositivo central. Las constantes de entrada k_e y salida k_s fueron calculadas mediante el método de los residuales y la fase terminal de la gráfica semilogarítmica (cálculo de la constante de eliminación). Otro de los parámetros que se obtienen para evaluar la biodisponibilidad y bioequivalencia, para este estudio equivalencia *in vitro* es el $ABC_{0-\infty}$, más adelante se presentará el análisis de variancia para $C_{m\acute{a}x}$ y ABC .

Tabla 13 Datos cinéticos de ambos medicamentos, prueba y referencia, obtenidos de los perfiles de disolución en solución amortiguadora de fosfatos.

Datos cinéticos	Medicamento	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
K entrada (min^{-1})	MP	0.08779	0.06839	0.07136	0.08415	0.06564	0.06538
	MR	0.15241	0.1032	0.15496	0.12056	0.14139	0.29353
k salida (min^{-1})	MP	0.03679	0.03282	0.02355	0.03881	0.03159	0.02391
	MR	0.02181	0.02894	0.02418	0.0291	0.02515	0.01752
$C_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{g/ml}$)	MP	609.1	555.06	475.25	642.2	487.75	447.98
	MR	557.25	563.96	561.044	652.25	539.64	488.57
T $m\acute{a}x$ (min)	MP	25	30	25	25	30	35
	MR	25	30	25	25	20	20
T lag (min)	MP	6.03	5.72	2.56	7.12	6.22	5.08
	MR	5.42	6.46	5.96	5.34	3.79	4.17
t 1/2 entrada (min)	MP	7.9	10.13	9.71	8.24	10.56	10.6
	MR	4.55	6.72	4.47	5.75	4.9	2.36
t 1/2 salida (min)	MP	18.84	21.12	29.44	17.86	21.94	28.99
	MR	31.78	23.95	28.67	23.82	27.56	39.55
$ABC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{min}$)	MP	33768.9	35155.1	34411.8	35573.0	34109.9	35694.8
	MR	34439.4	33256.0	33896.8	33446.5	32159.0	33331.5
K liberación (min^{-1})	MP	0.0439	0.0346	0.0311	0.048	0.0307	0.0277
	MR	0.0375	0.0361	0.0391	0.046	0.0413	0.0421

MP: Medicamento de prueba

MR: Medicamento de referencia

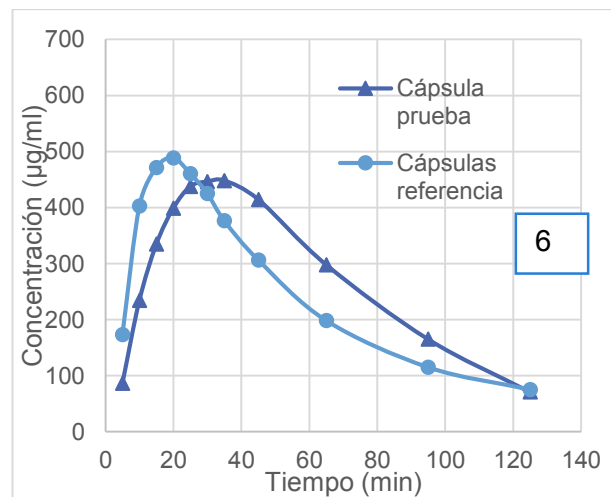
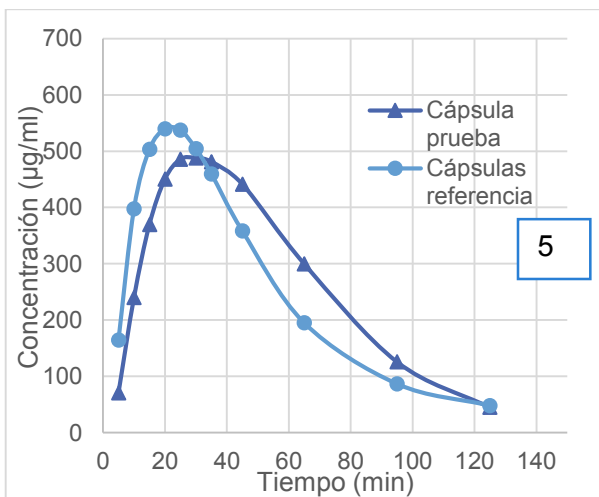
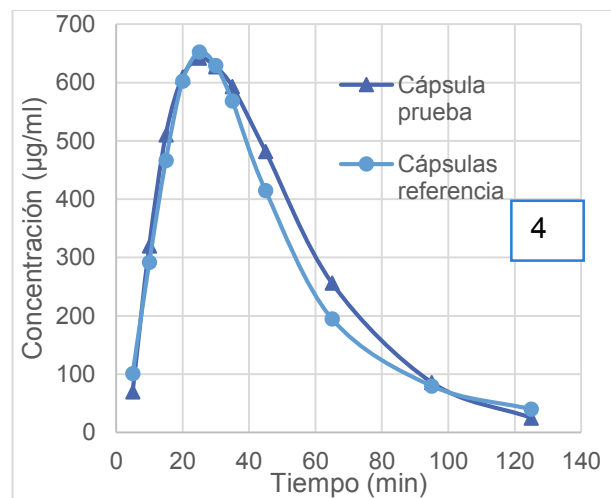
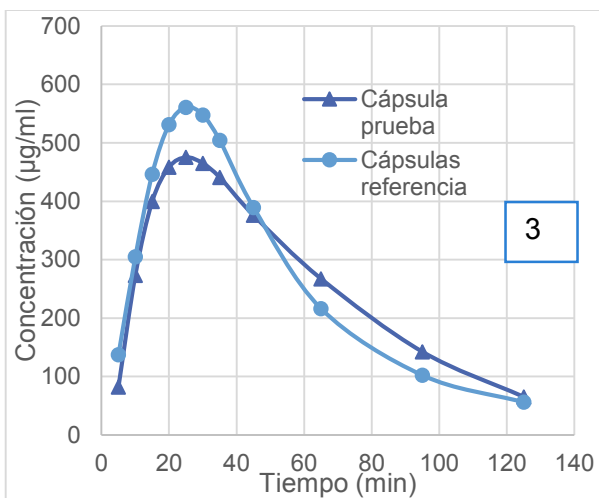
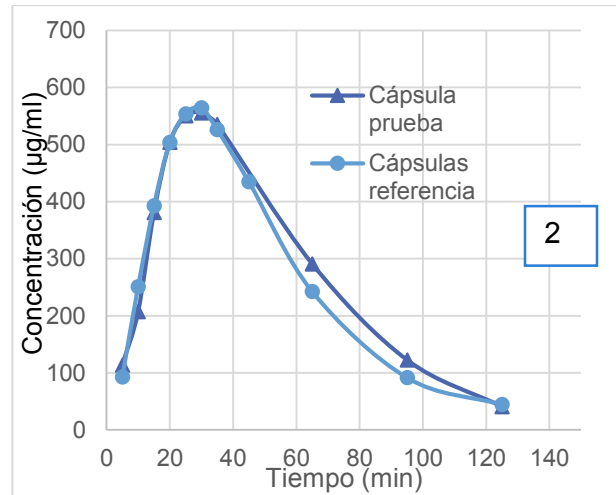
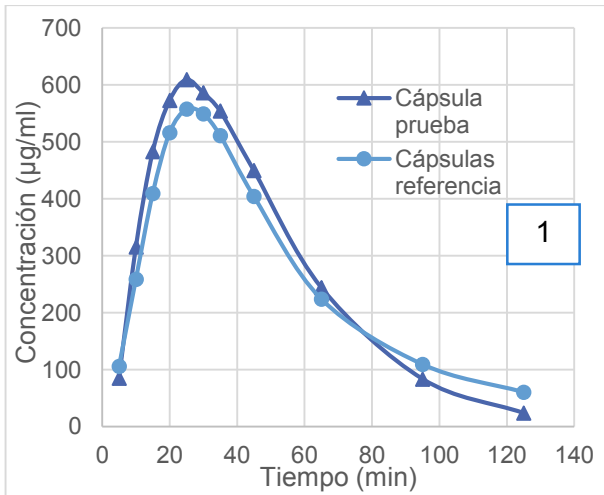


Figura 18 Perfiles de disolución de ambos medicamentos: referencia y prueba en la solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 en los diferentes días.

- Nota: El número corresponde al día de ensayo.

En la tabla 13 y figura 18 se muestran los resultados cinéticos y los perfiles de disolución de cada medicamento en la solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8. Estos resultados expresan los cambios individuales que producen cada cápsula (500 mg) o las dos cápsulas (2 de 250 mg), de lo cual, se observa que en un día 1; el $C_{m\acute{a}x}$ es mucho más grande en el perfil de disolución que corresponde al medicamento de prueba que en el perfil de disolución en el medicamento de referencia.

En los días 2 y 4 es similar el $C_{m\acute{a}x}$ de ambos medicamentos lo cual debe verse reflejado en el F (fracción de la disponibilidad relativa) cercano a la unidad como se puede observar en la siguiente tabla.

En los días 3, 5 y 6 se observa que la $C_{m\acute{a}x}$ es más alta en el medicamento de referencia que en el de prueba, en la cual la F es menor a la unidad.

En lo que respecta al ABC de los perfiles, la magnitud de estos es menor al 10% lo cual implica que la razón no cambia. Lo anterior se ve reflejado en la tabla 14 y figura 20.

Tabla 14 Disponibilidad relativa (F) por día en el medio solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8

parámetros	1	2	3	4	5	6	Promedio
F ABC 0-∞	0.98	1.06	1.02	1.06	1.06	1.07	1.04
F C máx	1.09	0.98	0.85	0.98	0.90	0.92	0.95

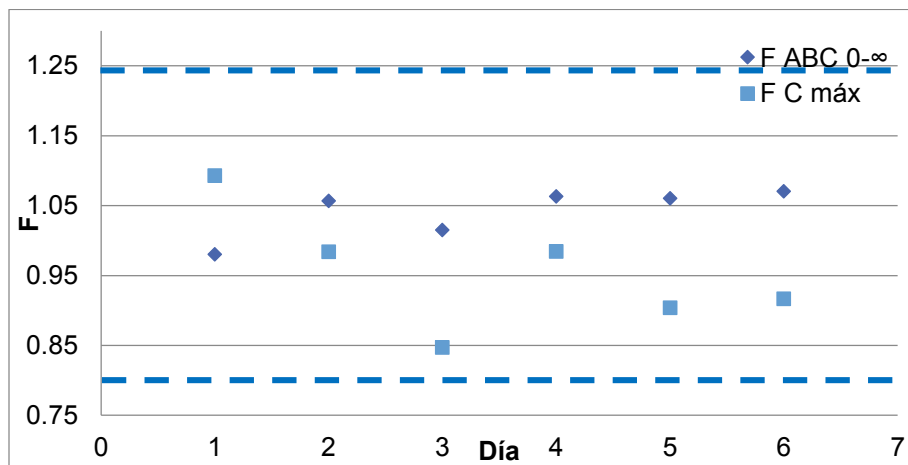


Figura 19 Disponibilidad relativa (relación de los $C_{m\acute{a}x}$ y ABC respectivo, del medicamento de prueba/medicamento de referencia) en el medio solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8.

En la Figura 19 se colocaron los límites 0.80 al 1.25 debido a que en la NOM-177-SSA1-2013, (USP30, 2007) y las guías de la FDA (2001), (2003) establecen como criterio para Bioequivalencia los intervalos de confianza 80-125% de la relación entre el ABC y la $C_{m\acute{a}x}$. Por tanto, en los valores individuales de cada día de ensayo, la mayoría se encuentren dentro de estos límites. Además se observa que no se presenta alguna

tendencia en los datos respecto a la forma en cómo se asignó el ensayo de disolución. Se le denomina disponibilidad relativa y equivalencia *in vitro* a la comparación de los parámetros cinéticos $C_{m\acute{a}x}$ y ABC 0-inf; la disponibilidad relativa a la razón de los parámetros cinéticos del medicamento de prueba y el medicamento de referencia.

Perfiles de disolución en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5

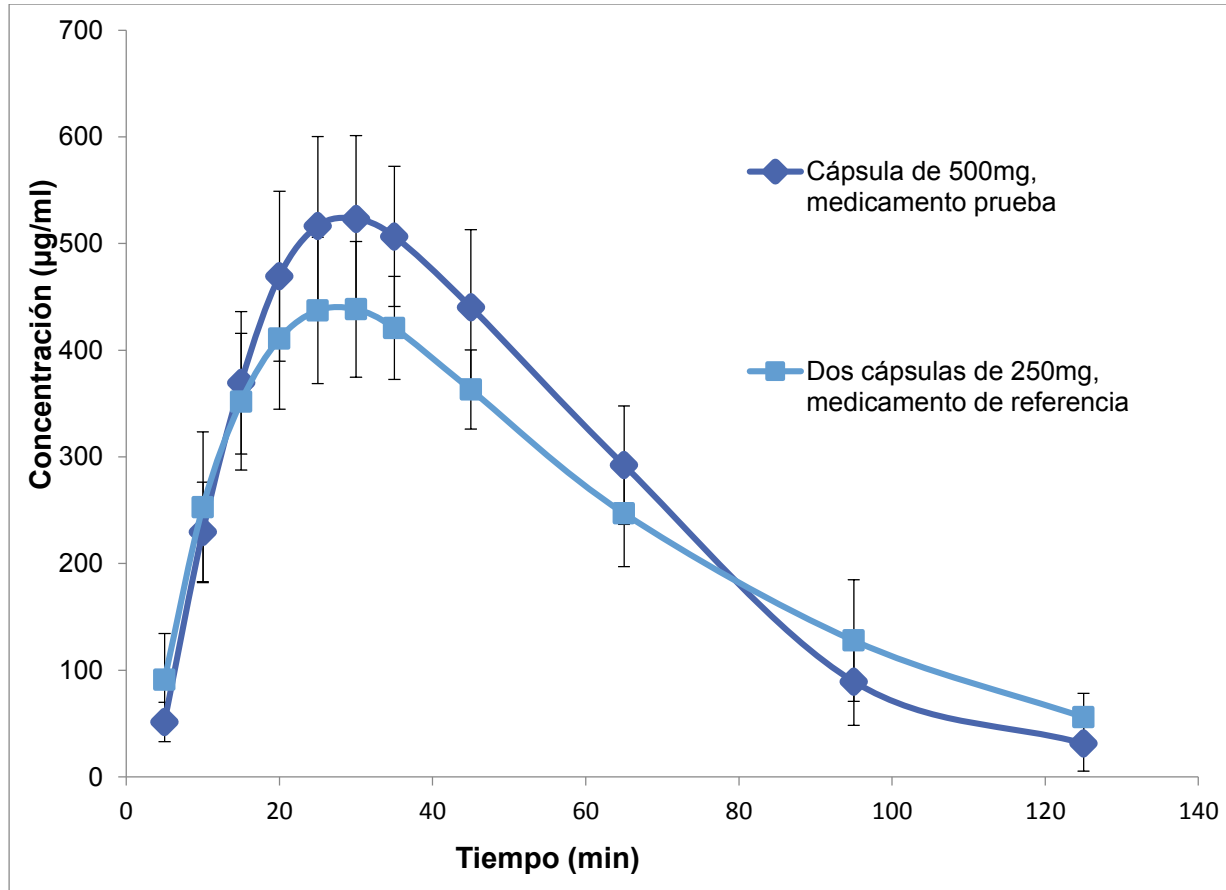


Figura 20 Perfiles de disolución promedio de Cloranfenicol de los medicamentos prueba y referencia en medio solución amortiguadora de acetatos pH 4.5.

En la figura 20 y, en la tabla 15 se muestran las concentraciones promedio de cada uno de los medicamentos como lo indica la normatividad para un informe de intercambiabilidad por estudios de disolución (NOM-177-SSA1-2013). Se observa en ambos perfiles de disolución una diferencia en la $C_{m\acute{a}x}$ de (85µg/ml) en un T máx de 30min en las cápsulas de prueba respecto a las de referencia de manera opuesta a los resultados promedio en el medio solución amortiguadora de fosfatos.

Tabla 15 Concentraciones promedio del medicamento de prueba y de referencia respectivamente en el medio solución amortiguadora de acetatos pH 4.5

Tiempo (min)	Medicamento de prueba			Medicamento de referencia		
	Promedio (µg/ml)	desvest	% CV	Promedio (µg/ml)	desvest	% CV
5	51.49	18.48	35.89	90.96	43.62	47.95
10	229.71	46.58	20.28	252.84	70.67	27.95
15	369.54	66.74	18.06	351.78	63.91	18.17
20	469.32	79.59	16.96	410.78	65.93	16.05
25	516.39	83.97	16.26	437.23	68.65	15.70
30	523.02	78.25	14.96	438.38	63.61	14.51
35	506.69	65.60	12.95	420.92	48.17	11.44
45	440.36	72.78	16.53	363.10	37.02	10.20
65	292.25	55.45	18.97	247.14	50.10	20.27
95	89.40	41.14	46.02	127.91	56.94	44.51
125	31.42	25.98	82.68	56.10	22.21	39.58

Nota: La fila resaltada corresponde al T_{máx} y C_{máx} promedio.

Tabla 16 Datos cinéticos de ambos medicamentos, prueba y referencia, obtenidos de los perfiles de disolución en solución amortiguadora de acetatos.

Datos cinéticos	Medicamento	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
K entrada (min⁻¹)	MP	0.07674	0.10069	0.06561	0.09071	0.05891	0.06538
	MR	0.10327	0.10359	0.07265	0.06917	0.06773	0.29353
k salida (min⁻¹)	MP	0.04676	0.04202	0.05275	0.02491	0.03963	0.02391
	MR	0.03339	0.01661	0.02421	0.02037	0.02244	0.01752
C_{máx} (µg/ml)	MP	576.086	644.215	507.007	543.095	460.791	447.982
	MR	441.40	403.92	431.73	376.464	429.75	488.56
T máx (min)	MP	30	25	25	35	30	35
	MR	30	25	30	35	30	20
T lag(min)	MP	7	7.62	5.57	6.23	7.36	5.08
	MR	4.87	3.9	4.26	4.08	4.95	4.17
t 1/2 entrada (min)	MP	9.03	6.88	10.56	7.64	11.77	10.6
	MR	6.71	6.69	9.54	10.02	10.23	2.36
t 1/2 salida (min)	MP	14.82	16.5	13.14	27.83	17.49	28.99
	MR	20.76	41.73	28.63	34.02	30.89	39.55
ABC_{0-∞} (µg/ml*min)	MP	32032.3	32409.7	28983.8	37172.6	31710.0	35694.8
	MR	24154.9	35120.9	32937.5	32343.1	35005.6	33331.5
K liberación (min⁻¹)	MP	0.0397	0.0358	0.0482	0.0343	0.0274	0.0277
	MR	0.0292	0.0273	0.0256	0.0226	0.025	0.0421

MP: Medicamento de prueba

MR: Medicamento de referencia

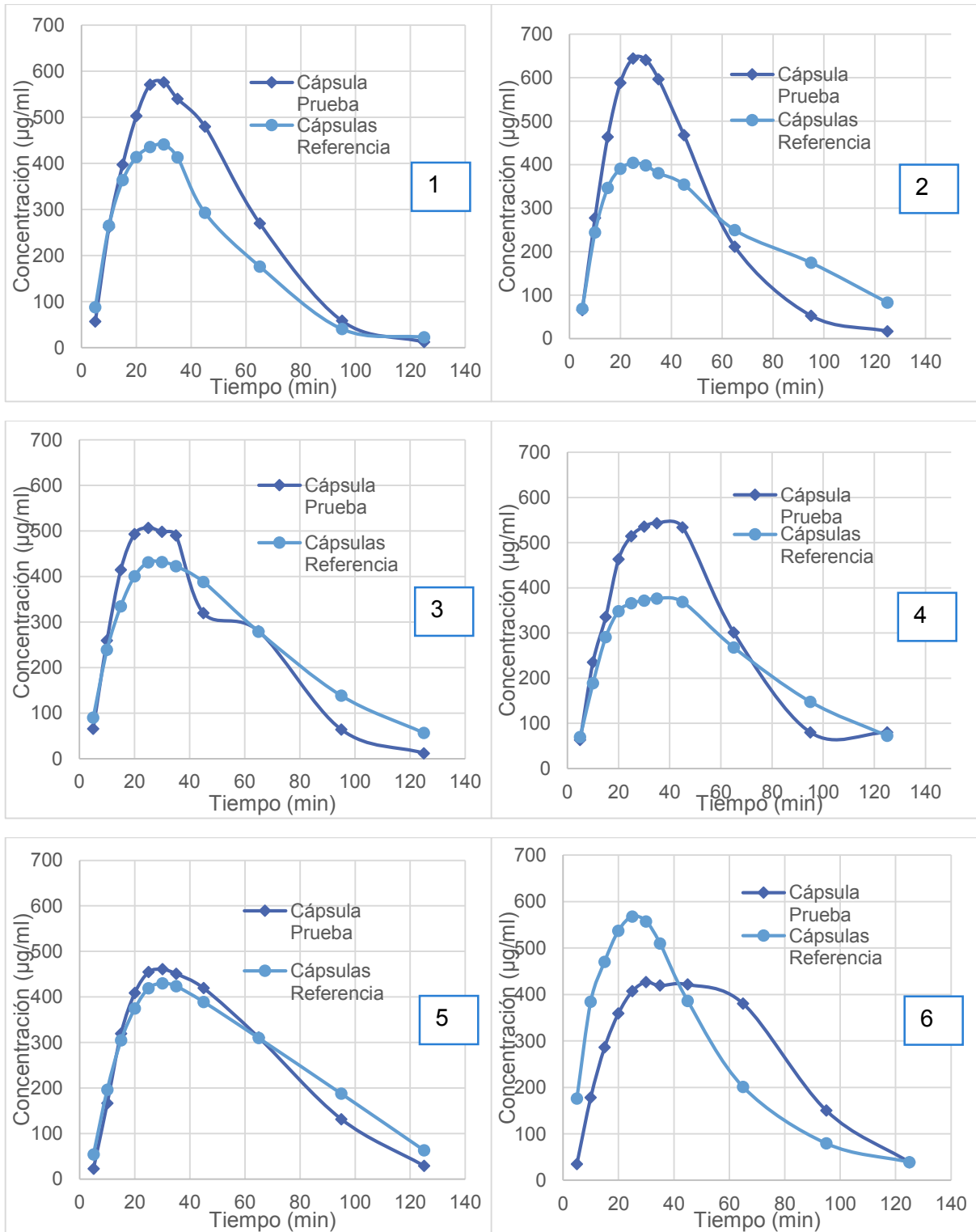


Figura 21 Perfiles de disolución de ambos medicamentos: referencia y prueba en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5 en los diferentes días.

Nota: el número corresponde al día de ensayo.

De la tabla 16 y figura 21 se encuentran los datos cinéticos y los perfiles de disolución de cada medicamento, por día, en el medio solución amortiguadora de acetatos pH 4.5. En el día 6 el valor de $C_{m\acute{a}x}$ es más grande en el medicamento de referencia que en el medicamento de prueba.

En la figura 21 donde se observa que en los días 1 al 5 se observa que la $C_{m\acute{a}x}$ es más alta en el medicamento de prueba que en el de referencia.

En lo que respecta al ABC entre ambos medicamentos, la magnitud de estos es mayor al 10% en algunos de los días de ensayo lo cual implica que en la razón del $ABC_{0-\text{inf}}$ del medicamento de prueba y referencia (F) haya variaciones, como se ve reflejado en la siguiente tabla y gráfico. Sin embargo, aun en las variaciones de acuerdo al ANADEVA no hay diferencias significativas.

Tabla 17 Disponibilidad relativa (F) por día en el medio solución amortiguadora de acetatos pH 4.5

parámetros	1	2	3	4	5	6	Promedio
F ABC	1.33	0.92	0.88	1.15	0.91	1.03	1.04
F $C_{m\acute{a}x}$	1.31	1.59	1.17	1.44	1.07	0.75	1.22

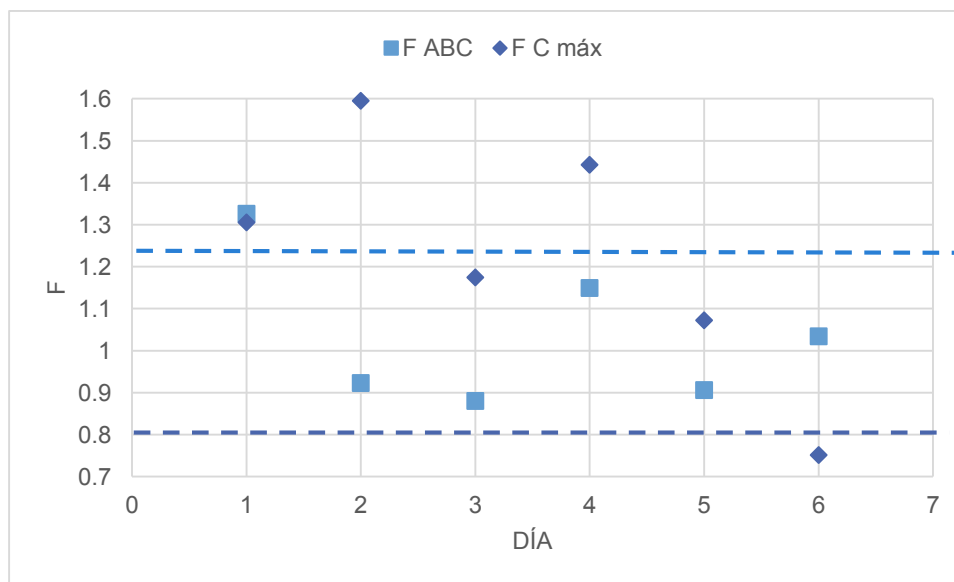


Figura 22 Disponibilidad relativa: F (relación de los $C_{m\acute{a}x}$ y ABC respectivo, del medicamento de prueba/medicamento de referencia) en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5.

En la figura 22 se observa que los valores de F para el $ABC_{0-\text{inf}}$ se encuentran dentro de estos límites 0.8-1.25 indicando que la dispersión de los datos es cercana a la unidad. Sin embargo, los valores del $C_{m\acute{a}x}$ están por arriba del límite superior.

No se presenta alguna tendencia en los datos respecto a la forma en cómo se asignó el ensayo de disolución que pueda influir o ser aditivo en el análisis (tabla 11).

Análisis estadístico del diseño de bloques

El análisis estadístico de datos farmacocinéticos derivados de estudios de bioequivalencia se recomiendan procedimientos que siguen el modelo paramétrico lineal general (teoría normal). Se debe realizar un análisis de variancia (ANADEVA) con los parámetros farmacocinéticos ABC y C máx, empleando modelos y programas estadísticos adecuados (Farmacopea de los Estados Unidos de América, 2007). Por lo anterior, se aplica el análisis de variancia mediante el diseño de bloques para cada medio de disolución en este tipo de perfiles.

El diseño de bloques es un medio para reducir y controlar la variancia del error experimental con el fin de lograr mayor precisión, en él las unidades experimentales quedan agrupadas en bloques de unidades homogéneas, cada tratamiento se asigna al azar a un número igual de unidades experimentales en cada bloque y es posible hacer comparaciones más precisas entre los tratamientos dentro del conjunto homogéneo de unidades experimentales en un bloque (Kuehl, Segunda edición, 2000).

Un efecto perturbador puede definirse como un factor del diseño que probablemente tenga un efecto sobre la respuesta, pero en el que no existe un interés específico (Montgomery, 2004). En este caso, el efecto perturbador que se presenta es la secuencia de los ensayos para cada medicamento por día, por lo tanto, se utilizó la formación de bloque por día eliminando la secuencia (que esto podría o no tener efecto o interacción, sin embargo no es de interés específico) y comparar los tratamientos (medicamento). Otro de los factores involucrados en la experimentación y que podrían tener aditividad en el análisis es la variación del flujo en cada uno de los experimentos, sin embargo el coeficiente de variación para el medio de fosfatos es de 2.89% y para el medio de acetatos 2.02% lo que significa que hay control del flujo (menor al 3% en un proceso).

El modelo estadístico del diseño es el siguiente (Montgomery, 2004):

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$

Criterio de aceptación

$F \leq$ Valor Crítico; Acepta H_0
 $F >$ Valor Crítico: Rechaza H_0

Análisis de Variancia para la $C_{máx}$

Hipótesis:

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_a$

H_a : al menos una $\mu_i \neq \mu_j$

Tabla 18 Análisis de variancia para la $C_{máx}$ de los perfiles de disolución en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8

Fuente de variación	gl	suma de cuadrados	Cuadros medios	F	Valor crítico
Medicamentos	1	1760.70328	1760.70328	0.22900	6.61
Secuencia(bloques)	5	6357.48439	1271.49688		
Error	5	38443.1398	7688.62795		
Total	11	46561.3274			

Tabla 19 Análisis de variancia para la $C_{máx}$ de los perfiles de disolución en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5

Fuente de variación	gl	suma de cuadrados	Cuadros medios	F	Valor crítico
Medicamentos	1	21415.2931	21415.2931	6.17822	6.61
Secuencia(bloques)	5	35715.3492	7143.06984		
Error	5	17331.2668	3466.25337		
Total	11	74461.9091			

En las tablas 18 y 19 se observa que la F crítica es menor al valor crítico 6.61 por lo tanto, no hay diferencias significativas. A pesar que se observan diferencias en ambos medios de disolución no son significativas.

Análisis de Variancia para la ABC $0-\infty$

Hipótesis:

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_a$

H_a : al menos una $\mu_i \neq \mu_j$

Tabla 20 Análisis de variancia para la ABC $0-\infty$ de los perfiles de disolución en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8

Fuente de variación	gl	suma de cuadrados	Cuadros medios	F	Valor crítico
Medicamentos	1	1850418.45	1850418.45	0.392336	6.61
Secuencia(bloques)	5	15264778	3052955.59		
Error	5	23582018.7	4716403.73		
Total	11	40697215.1			

Tabla 21 Análisis de variancia para la ABC 0-∞ de los perfiles de disolución en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5

Fuente de variación	gl	suma de cuadrados	Cuadros medios	F	Valor crítico
Medicamentos	1	1228614.29	1228614.29	0.1918412	6.61
Secuencia(bloques)	5	85421481.9	17084296.4		
Error	5	32021585.9	6404317.17		
Total	11	118671682			

Las tablas 20 y 21 se observa que el valor de F es menor o igual al valor crítico, por lo tanto, no hay diferencias significativas estadísticamente en la μ del ABC 0-∞ de cada medicamento.

Análisis de Variancia para los parámetros cinéticos transformados.

En el análisis de variancia debe llevarse a cabo con la transformación logarítmica de las variables farmacocinéticas ABC y $C_{m\acute{a}x}$. Es aceptable la utilización de logaritmos de base 10 (log) o logaritmos naturales (Ln) (USP30, 2007) (NOM-177-SSA1-2013, 2013), (2001).

El modelo matemático para los datos transformados es:

$$\ln E(y_{ij}) = \ln \mu + \ln t_i + \ln \beta_j$$

Análisis de Variancia para el $\ln C_{m\acute{a}x}$

Hipótesis:

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_a$

Ha: al menos una $\mu_i \neq \mu_j$

Tabla 22 Análisis de variancia para el $\ln C_{m\acute{a}x}$ de los perfiles de disolución en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8

Fuente de variación	gl	suma de cuadrados	Cuadros medios	F	Valor crítico
Medicamentos	1	1760.70328	1760.70328	0.286499606	6.61
Secuencia(bloques)	5	6357.48439	1271.49688		
Error	5	38443.1398	7688.62795		
Total	11	46561.3274			

Tabla 23 Análisis de variancia para el LnCmáx de los perfiles de disolución en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5

Fuente de variación	gl	suma de cuadrados	Cuadros medios	F	Valor crítico
Medicamentos	1	0.09091698	0.09091698	7.61290	6.61
Secuencia(bloques)	5	0.15025301	0.0300506		
Error	5	0.05971249	0.0119425		
Total	11	0.30088248			

En la tabla 22, F es menor al valor crítico, esto indica que no hay diferencias significativas entre la LnCmáx del medicamento de referencia y el medicamento de prueba. Sin embargo, en la tabla 23 para el solución amortiguadora de acetatos se no se acepta la hipótesis nula por que la F es mayor a 6.61, por lo tanto existen diferencias significativas.

Tabla 24 Análisis de variancia para el lnABC 0-∞ de los perfiles de disolución en solución amortiguadora de fosfatos

Fuente de variación	gl	suma de cuadrados	Cuadros medios	F	Valor crítico
Medicamentos	1	0.00207914	0.00207914	0.47907	6.61
Secuencia(bloques)	5	0.01381712	0.00276342		
Error	5	0.02169969	0.00433994		
Total	11	0.03759595			

Tabla 25 Análisis de variancia para el lnABC 0-∞ de los perfiles de disolución en solución amortiguadora de acetatos

Fuente de variación	gl	suma de cuadrados	Cuadros medios	F	Valor crítico
Medicamentos	1	0.00181328	0.00181328	0.27168	6.61
Secuencia(bloques)	5	0.09611145	0.01922229		
Error	5	0.0333724	0.00667448		
Total	11	0.13129713			

Las tablas 24 y 25 se observa que el valor de F es menor o igual al valor crítico, por lo tanto, no hay diferencias significativas estadísticamente en la μ del LnABC 0-∞ de cada medicamento.

De las tablas 22 a 25 se concluye que existe una diferencia significativa en los datos transformados para el parámetro del LN Cmáx. La transformación logarítmica representa una ventaja cuando no se define bien la estimación por cuadrados mínimos de la media del producto de referencia (USP30, 2007) como es el caso de Cmáx en el solución amortiguadora de acetatos que la razón del cuadros medios es

cercano al valor crítico. Por lo general la transformación logarítmica resuelve esta situación y logra que las variancias se hagan independientes de la media (USP30, 2007). En el ABC_{0-∞} no dan diferencias significativas en ambos medios.

Aplicando el método para bioequivalencia en la equivalencia *in vitro*, los parámetros farmacocinéticos, se comparan mediante intervalos de confianza con el 90%(nivel de confianza) en torno a la relación de las medias transformado logarítmicamente como en la siguiente tabla:

Tabla 26 Comparación de la disponibilidad relativa de los parámetros C_{máx} y ABC 0-inf en cada uno de los medios. Intervalos de confianza clásicos.

pH	Disponibilidad relativa (%)	Media	Desvest	%CV	ICI	ICS
Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8	ABC _{0-inf}	104.13	3.57	3.43	101.28	106.99
	ln ABC _{0-inf}	4.65	0.03	0.75	101.22	107.02
	C _{máx.}	95.50	8.54	8.95	88.66	102.33
	ln C _{máx.}	4.56	0.09	1.94	88.68	102.16
Solución amortiguadora de acetatos pH 4.5	ABC _{0-inf}	103.63	17.38	16.78	89.72	117.54
	ln ABC _{0-inf}	4.63	0.16	3.47	90.12	116.55
	C _{máx.}	122.35	29.69	24.26	98.60	146.10
	ln C _{máx.}	4.78	0.27	5.56	96.21	147.23

El criterio de aceptación son los intervalos de confianza al 90% nivel de confianza se encuentren dentro de los límites de 80-125% (USP30, 2007) (Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013). La tabla anterior indica que la razón del C_{máx} y el ln C_{máx} se encuentra por encima del límite superior en solución amortiguadora de acetatos.

Análisis de la constante de la velocidad de disolución aparente

La siguiente tabla resume los resultados de las constantes de liberación o constantes de la velocidad de disolución aparente, estas fueron obtenidas mediante el procedimiento de la siguiente referencia: (Nazario López, Nora N., 2010) en el complemento *Solver* de Excel 2010.

Tabla 27 Promedio e intervalos de confianza de las constantes de liberación.

pH	medicamento	promedio	desvest	CV	ICS	ICI
6.8	prueba	0.03600	0.00811	22.53	0.04249	0.02951
	referencia	0.04034	0.00359	8.89	0.04321	0.03747
4.5	prueba	0.03496	0.00889	24.57	0.04183	0.02809
	referencia	0.02909	0.00802	27.59	0.03551	0.02267

En la tabla 27 se observa que no hay diferencias en las medias respecto a los intervalos de confianza, sin embargo, se observa que aumenta la constante de liberación conforme aumenta el pH en las cápsulas de referencia.

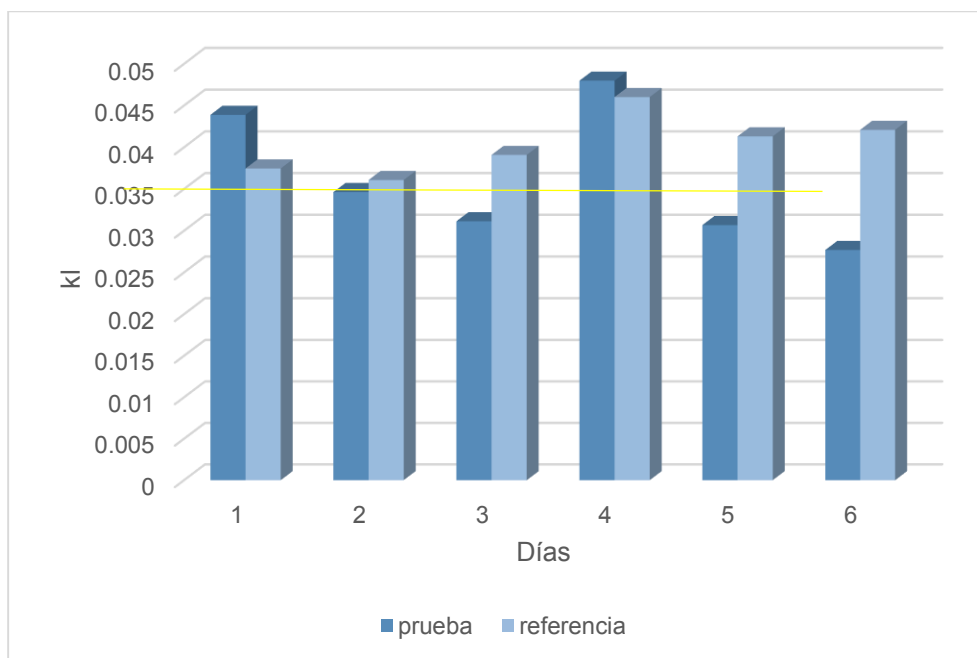


Figura 23 Gráfico de barras de los valores de las constantes de liberación por día en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8.

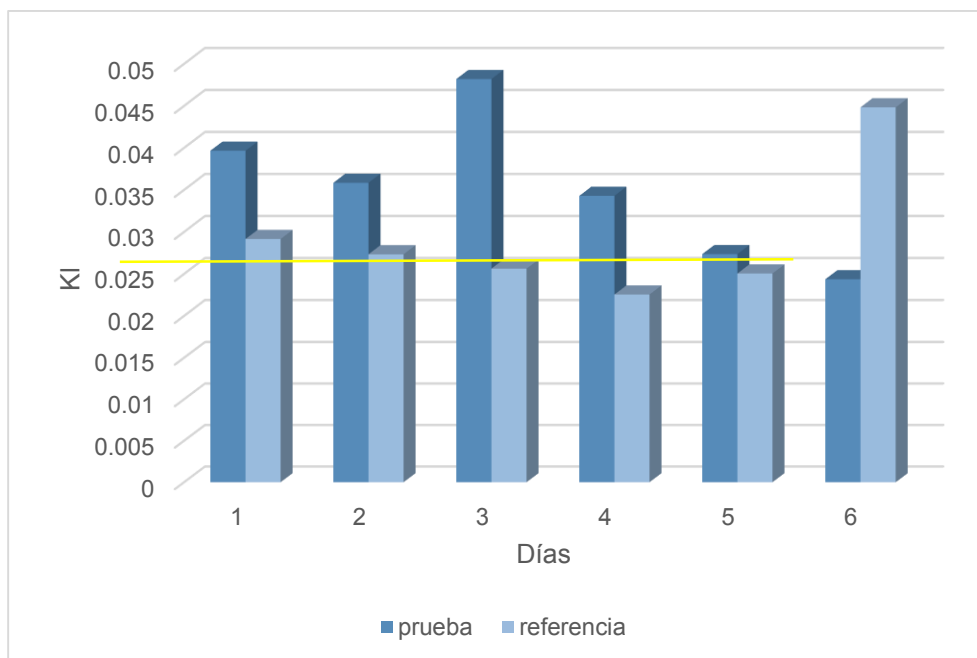


Figura 24 Gráfico de barras de los valores de las constantes de liberación por día en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5.

Perfiles de transferencia de Cloranfenicol en Solución en agua desionizada.

Tabla 28 Resultados de los perfiles obtenidos mediante la transferencia de Cloranfenicol en Solución mediante el Simulador de Procesos Cinéticos (SIPROCIN)

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Tiempo (min)	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Concentración $\mu\text{g/ml}$
2	85.1881	83.6899	73.122
4	99.521	98.023	90.955
6	105.95	102.043	100.1516
8	108.0872	102.8345	103.3585
10	103.948	100.5841	102.697
12	99.6162	95.7589	99.3005
16	87.3581	84.9009	89.1512
20	73.6392	72.7035	76.1696
30	45.5585	44.9706	47.0988
40	27.1621	26.9469	28.1969
60	9.0516	9.2015	9.4503

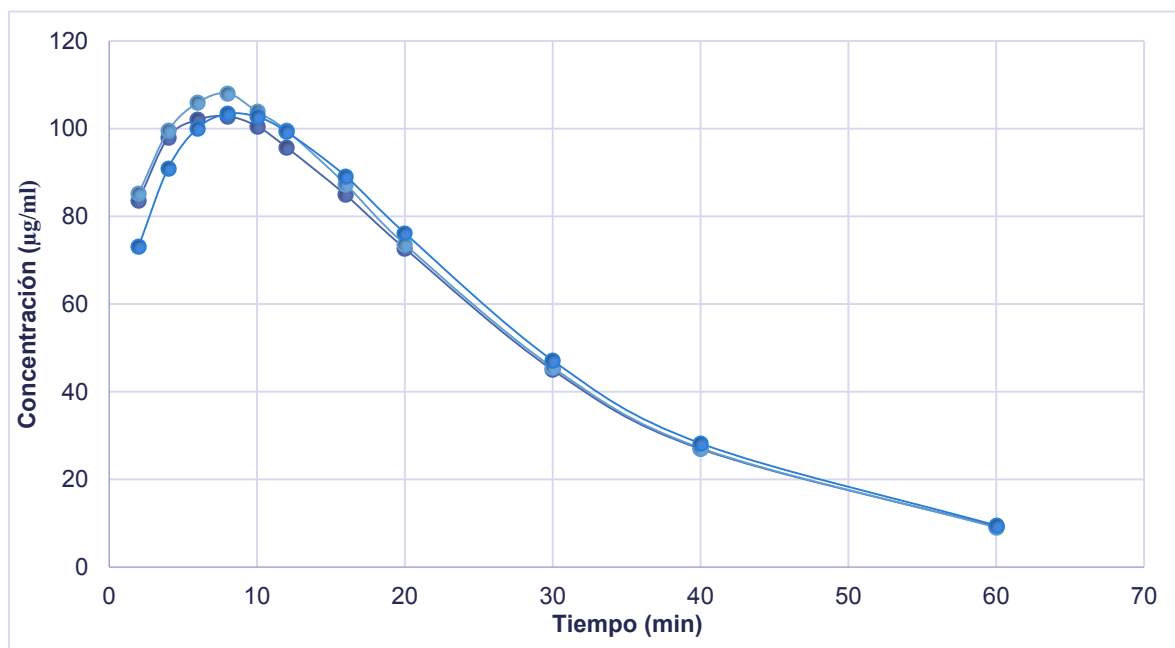


Figura 25 Perfil de la transferencia de Cloranfenicol materia prima en solución.

Tabla 29 Parámetros cinéticos de los perfiles de transferencia de Cloranfenicol en solución.

Parámetros	1	2	3	PROMEDIO	S	%CV
K entrada (min ⁻¹)	0.24810	0.22558	0.23945	0.23771	0.01136	4.77886
k salida (min ⁻¹)	0.05046	0.04946	0.04970	0.04989	0.00050	1.03417
Cmáx. (µg/ml)	108.087	102.834	103.359	104.760	2.893	2.7618
T máx (min)	8	8	8	8	0	0
T lag(min)	-0.95	-1.70	-0.37	-1.01	0.67	-66.21
t _{1/2} entrada (min)	2.79	3.07	2.89	2.92	0.14	4.84
t _{1/2} salida (min)	13.73	14.01	13.93	13.89	0.14	1.03
ABC _{0-inf} (µg/ml*min)	3302.02	3242.09	3306.64	3283.59	36.01	1.096
TMR (min)	22.8386	23.183	23.5301	23.1839	0.34574	1.491

Los resultados de la tabla 29 y la figura 25 expresan las concentraciones de Cloranfenicol disuelto en agua desionizada esto es con la finalidad de evaluar el desempeño de la transferencia y eliminar la variable de la disolución y la independencia al pH para la evaluación por momentos estadísticos.

Momentos estadísticos y números adimensionales

Medio: Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8

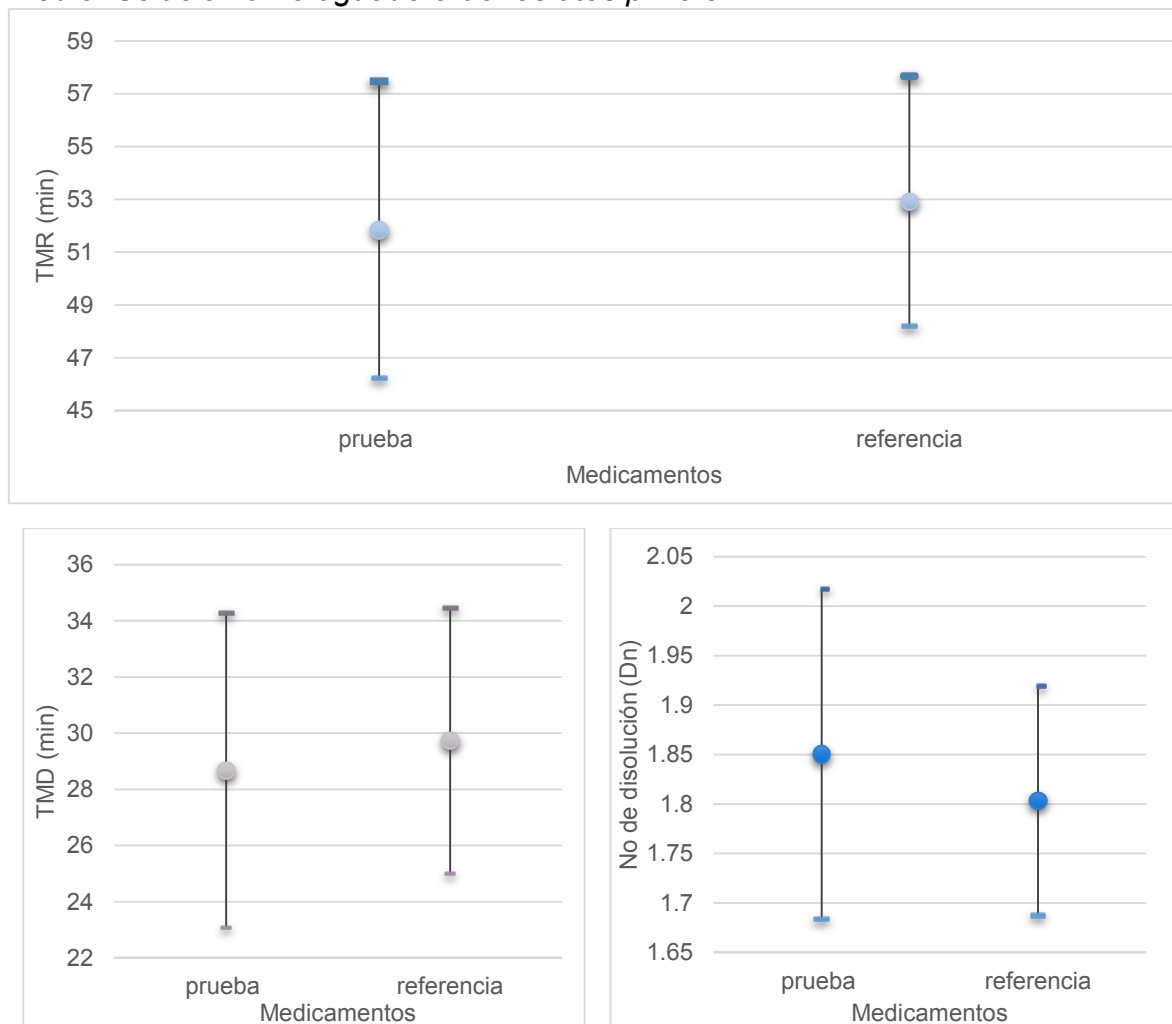


Figura 26 Intervalos de confianza de los momentos estadísticos: tiempo medio de residencia (TMR), tiempo medio de disolución (TMD) y tiempo medio de Absorción (TMA) y números adimensionales que describen el proceso de absorción “in vivo” y el proceso de entrada para el modelo compartimental seriado en el medio solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 parte I.

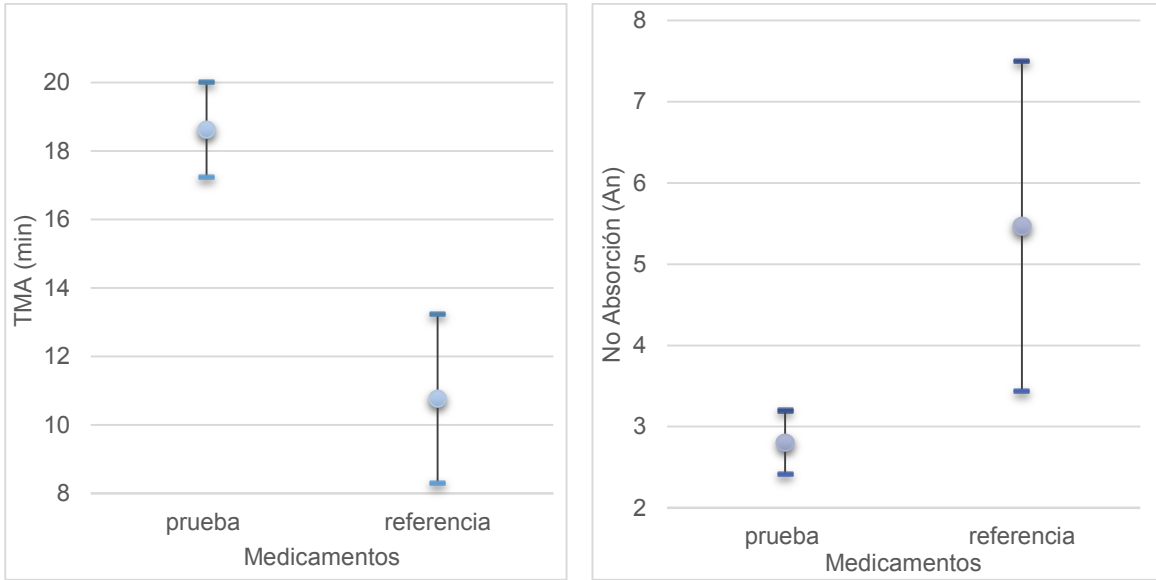


Figura 27 Intervalos de confianza de los momentos estadísticos: tiempo medio de residencia (TMR), tiempo medio de disolución (TMD) y tiempo medio de Absorción (TMA) y números adimensionales que describen el proceso de absorción “in vivo” y el proceso de entrada para el modelo compartimental seriado en el medio solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 parte II.

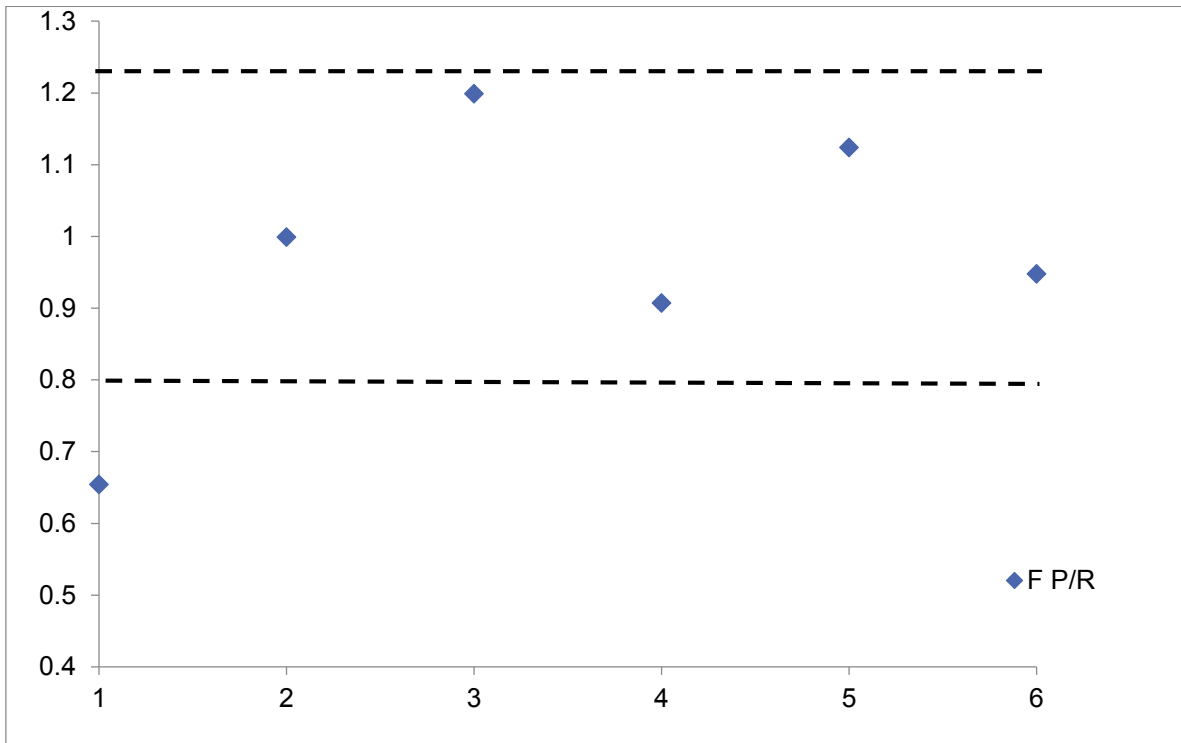


Figura 28 Gráfico de la relación de TMD- prueba/TMD -referencia medio fosfatos pH 6.8

Medio: Solución amortiguadora de acetatos pH 4.5

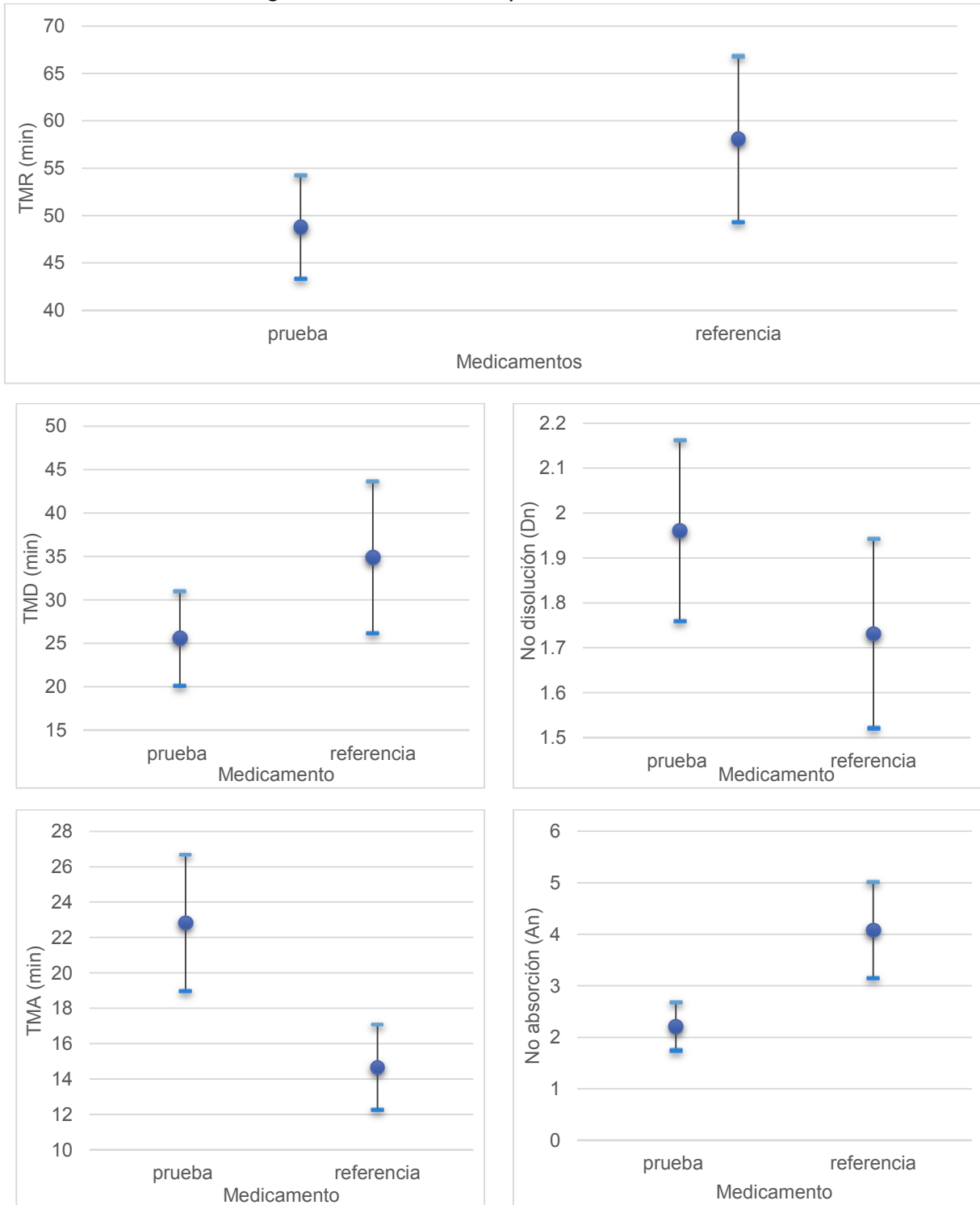


Figura 29 Intervalos de confianza de los momentos estadísticos: tiempo medio de residencia (TMR), tiempo medio de disolución (TMD) y tiempo medio de Absorción (TMA) y números adimensionales que describen el proceso de absorción “in vivo” y, el proceso de entrada para el modelo compartimental seriado en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5.

El análisis por intervalos de confianza tiene un nivel de confianza de 95%. No hay diferencia en los promedios en el Tiempo Medio de Residencia (TMR), Tiempo Medio de Disolución (TMD) y el Número de Disolución (Dn). Sin embargo, tanto en el Tiempo Medio de Absorción (el Tiempo Medio de Entrada) y el Número de Absorción (Número de entrada) hay diferencia en las medias; el tiempo promedio de entrada es menor en las cápsulas de referencia y, *a contrario sensu*, el (An) es mayor y menor en el medicamento de prueba.

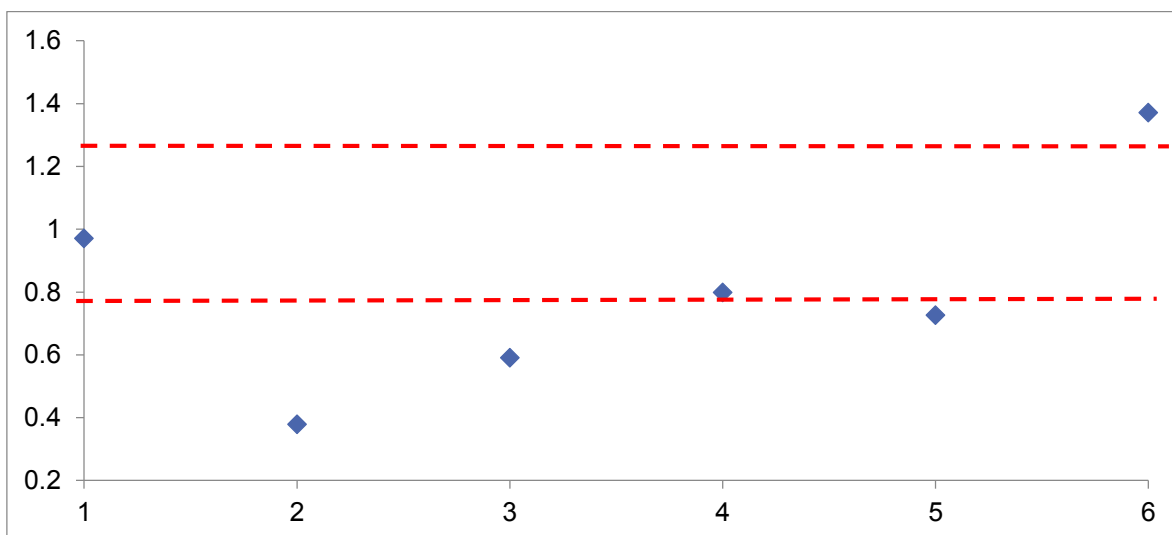


Figura 30 Gráfico de la relación de TMD- prueba/TMD -referencia medio acetatos pH 4.5.

En las figuras 26, 27 y 29 son los IC en la relación del Tiempo Medio de Disolución, la razón del TMD medicamento de prueba y TMD medicamento de referencia, se observa que en el medio pH 6.8 el factor se encuentra dentro del 20% respecto a la unidad. En el medio pH 4.5 se observa que la relación está por debajo del 20% respecto a la unidad, lo cual concuerda con lo observado en los intervalos de confianza para el TMD del medicamento de prueba es menor que el TMD del medicamento de referencia.

Porcentaje acumulado

La comparación de perfiles de disolución para un simulador de procesos cinéticos también puede llevarse a cabo por un perfil de porcentaje acumulado⁴ como si se obtuvieran los datos experimentales de un aparato I o II de la farmacopea. En el anexo I se encuentran los perfiles de Cloranfenicol acumulado o bien de la cantidad

⁴ La literatura refiere al porcentaje acumulado, pero en relación al modelo compartimental seriado se hace referencia a la cantidad total liberada.

total liberada, estos fueron transformados de concentración a porcentaje de la cantidad total liberada por el método de Nelson-Wagner. La NOM-177-SSA1-2013 y la FDA, 1997 indican que la comparación para este tipo de perfiles se realiza utilizando f_2 , el factor de similitud, sin embargo, dado la variabilidad de los datos principalmente del medicamento de prueba ($CV > 20\%$ para el primer tiempo y $CV > 10\%$ en los siguientes datos) en los siguientes gráficos se exponen los promedios de los porcentajes de la cantidad total liberada y el análisis por la función de Weibull:

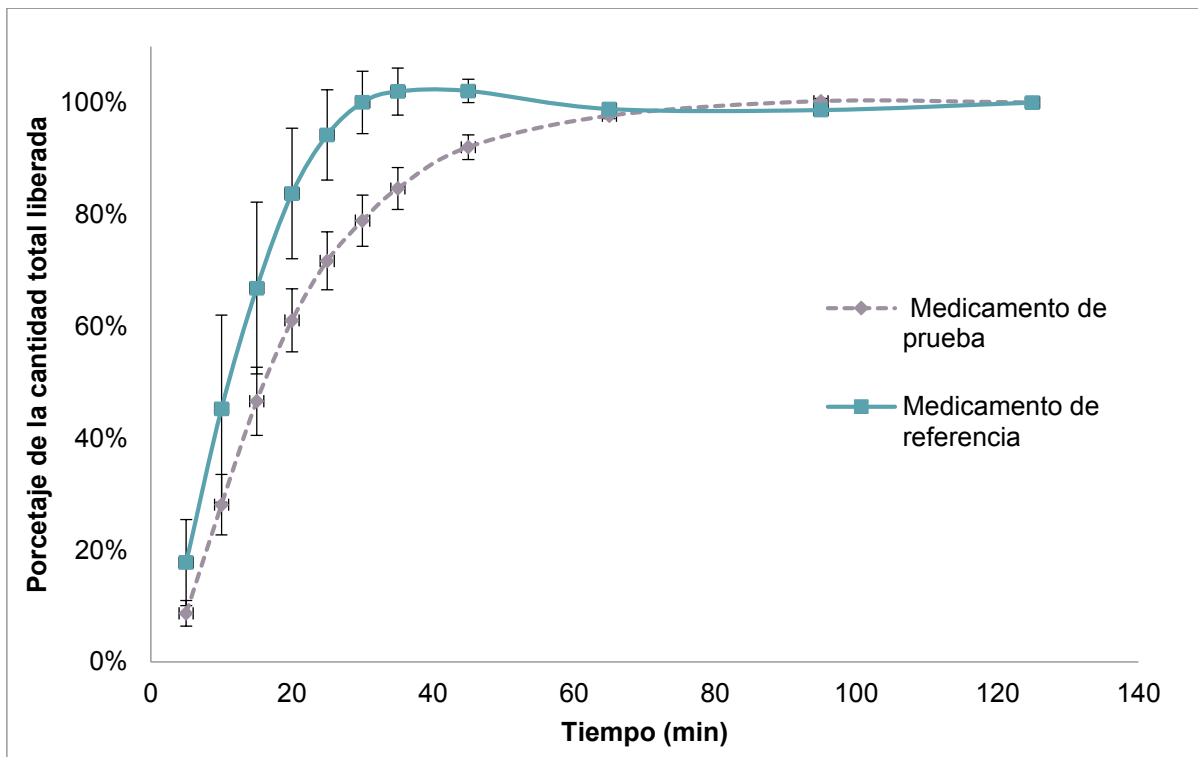


Figura 31 Perfil del porcentaje de la cantidad total liberada obtenido mediante el método de Wagner-Nelson en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8.

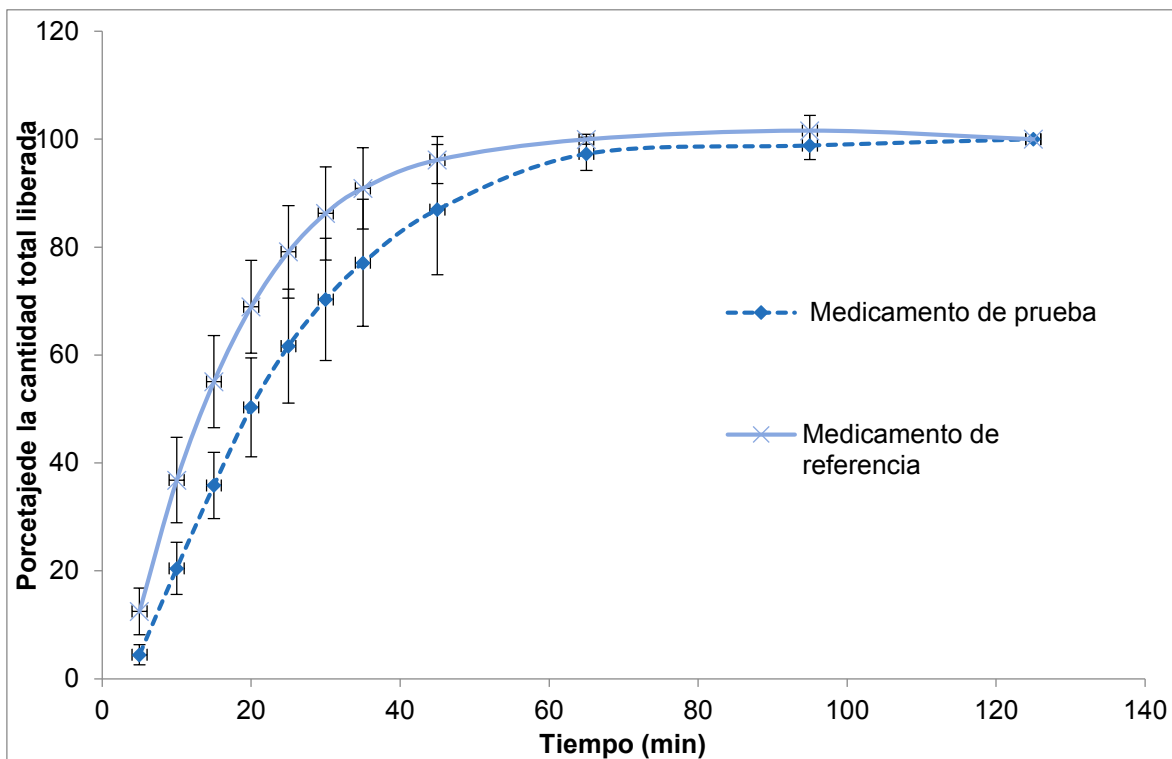


Figura 32 Perfil del porcentaje de la cantidad total liberada obtenido mediante el método de Wagner-Nelson en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5.

Enfoque dependiente de modelo.

La función de Weibull describe los tipos de perfiles de disolución, y el tiempo de disolución. La ecuación que rige la función es la siguiente:

$$\text{Log} \left[-\text{LN} \left(1 - \frac{Qt}{Q\infty} \right) \right] = \beta * \log t - \log \alpha$$

En esta ecuación, el parámetro de escala, α , define el tiempo del proceso. El parámetro de localización, t , representa el tiempo de retardo antes del inicio de la disolución o proceso y en la mayoría de los casos será cero. El parámetro de forma, β , caracteriza la curva, ya sea como exponencial ($\beta = 1$), sigmoidea, en forma de S, con una curvatura hacia arriba seguido de un punto de inflexión ($\beta > 1$), o parabólica, con una mayor pendiente inicial y después de que, de conformidad con la exponencial ($\beta < 1$) (Costa et al., 2001).

Tabla 30 Parámetros estadísticos de la pendiente obtenida de la función de Weibull. Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8.

Parámetros estadísticos	Medicamento de prueba	Medicamento de referencia
coeficiente de determinación r^2	0.98690	0.99831
Promedio PENDIENTE	1.49550	1.70933
Desvest	0.20042	0.19838
IC	0.16037	0.15873
ICI	1.33509	1.55060
ICS	1.65581	1.86806

Tabla 31 Parámetros estadísticos del intercepto obtenida de la función de Weibull. Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8.

Parámetros estadísticos	Medicamento de prueba	Medicamento de referencia
coeficiente de determinación r^2	0.98690	0.99831
Promedio INTERCEPTO	2.00919	1.92853
Desvest	0.24730	0.24053
IC	0.19788	0.19246
ICI	1.811310	1.73607
ICS	2.207078	2.12099

Tabla 32 Parámetros estadísticos de la pendiente obtenida de la función de Weibull. Solución amortiguadora de acetatos pH 4.5.

Parámetros estadísticos	Medicamento de prueba	Medicamento de referencia
coeficiente de determinación r^2	0.97466	0.98930
Promedio PENDIENTE	1.645359	1.49359
Desvest	0.107721	0.07946
IC	0.086193	0.06358
ICI	1.559166	1.43001
ICS	1.731553	1.55717

Tabla 33 Parámetros estadísticos de intercepto obtenida de la función de Weibull. Solución amortiguadora de acetatos pH 4.5.

Parámetros estadísticos	Medicamento de prueba	de Medicamento de referencia
coeficiente de determinación r^2	0.986903	0.998305
Promedio INTERCEPTO	0.974661	0.989305
Desvest	2.373864	1.886633
IC	0.220163	0.134269
ICI	0.176164	0.107435
ICS	2.197700	1.779198

De las tablas 30 a la 33 se comparan los valores obtenidos de la regresión de la distribución de Weibull, en el cual no hay diferencia en las medias tanto en la β (pendiente), el α (intercepto) en el medio de fosfatos, sin embargo hay diferencia en las medias, como se ha venido evidenciando, en el medio acetatos pH 4.5 para ambos parámetros: la pendiente (la caracterización de la curva) y el intercepto (Tiempo de Disolución).

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Comparación de los perfiles de disolución

En la comparación de los perfiles de disolución fue limitado, porque se utilizaron seis cápsulas de 500 mg de Cloranfenicol medicamento de prueba y doce cápsulas de Cloranfenicol de 250 mg del medicamento de referencia para cada uno de los medios, porque en este estudio se contempló la confiabilidad del método analítico y la realización de los ensayos de disolución. Considerando como supuesto: Si existen diferencias en los perfiles de disolución con el menor número de cápsulas ensayadas entonces habrá diferencias aun con un número mayor de cápsulas.

También, el simulador de procesos cinéticos permite obtener un perfil similar al perfil de concentraciones plasmáticas en los estudios *in vivo*. Por tanto, el análisis estadístico de los resultados se abordó tanto como perfiles de disolución y como aquellos en los cuales se comparan medicamentos con miras a bioequivalencia.

Los resultados se discuten en dos efectos. Primero, el efecto observado en los medios de disolución, y la diferencia estadística al comparar los medicamentos de prueba y referencia que estos que se ven reflejados en el análisis.

Los ensayos de disolución para las formas de dosificación sólidas deben proporcionar un poder discriminatorio apropiado, con la finalidad distinguir cambios en la composición o en proceso de fabricación que se podría esperar afecten la eficiencia *in vivo*. (Machado et al., 2014) (USP30, 2007). El poder discriminatorio de un método de disolución es la capacidad del método para detectar cambios en el medicamento. Además, un método de disolución discriminante debe ser considerado para reflejar el comportamiento de la absorción del fármaco *in vivo*, por lo que las condiciones de las pruebas de disolución *in vitro* imitan el entorno del tracto gastrointestinal (TGI) (Machado et al., 2014).

Las variables que influyen en la búsqueda del poder discriminante que se presenta en este estudio bajo un simulador de procesos cinéticos son: el pH (los medios de disolución) y la asignación de las cápsulas a participar en el ensayo de disolución. Por lo tanto, los resultados presentan un efecto nivelador en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8, y en el medio de solución amortiguadora de acetatos a un pH 4.5 un efecto diferenciador. El criterio es la similitud de los resultados *in vivo versus in vitro*.

Esto se ve reflejado en el *análisis de las constantes de la velocidad de disolución aparente* o liberación, ya que dicha constante está relacionada con la solubilidad en agua (que se espera sea mayor), el grado de ionización y al predominio de las

especies químicas en cada medio (Nazario López, 2010) y además, está relacionada con la constante de entrada y salida, entonces al ser menor el valor de la constante de liberación es más grande el de la constante de entrada.

Como se observa en los intervalos de confianza (tabla 27) y en las figuras 23 y 24, no hay diferencia en las medias en el pH 6.8 ya que el medio es capaz de nivelar las especies presentes ionizadas de ambos medicamentos, en el pH 4.5 donde en el medicamento de referencia difieren las medias, el método de disolución en el medio acetatos es capaz de diferenciar ya que están presente ambas especies químicas, e incluso el efecto de la formulación.

Con base al criterio, los estudios *in vivo* muestran que hay una diferencia estadística en la $C_{máx}$, y en la evaluación de los perfiles de disolución por el análisis de variancia en los datos transformados también existe diferencia estadística entre la $C_{máx}$ del medicamento de prueba y el de referencia, sólo que en este caso es mayor la $C_{máx}$ en el medicamento de prueba (tabla 23). En ambos medios el ABC 0-inf no hay diferencia, esto indica que la cantidad de transferida del Cloranfenicol liberado de las cápsulas no difiere significativamente entre ambas formulaciones. Pero existe diferencia en la velocidad con la cual se dispone el Cloranfenicol en el proceso de entrada.

Haciendo uso del enfoque dependiente del modelo: distribución de Weibull se analizan dos aspectos: la caracterización de la curva la cual explica la forma con la cuál es liberado el fármaco y la otra el tiempo del proceso de disolución. Por el efecto que tienen ambos medicamentos: la caracterización de la curva (β) los intervalos de confianza en las tablas 30 y 32 la curva es parabólica ($\beta > 1$) y además, es un indicativo de un mecanismo de liberación compleja. Es decir, la velocidad de liberación no cambia uniformemente. De hecho, la velocidad de liberación aumenta inicialmente de forma no lineal hasta el punto de inflexión y después disminuye asintóticamente. Entre más cercano β este de la unidad la liberación sigue una cinética de primer orden y obedece a la primera ley de difusión de Fick considerando que el gradiente de concentración en el medio de disolución impulsa la velocidad de liberación (Papadopoulou et al., 2006). En este último es donde se encuentran ambos medicamentos en ambos medios. El segundo aspecto, está relacionado con el intercepto (α) que es el tiempo del proceso de disolución

Con la finalidad de verificar si está presente o no una interacción o efecto entre el día de ensayo y el orden para realizar el ensayo, se verificó la tendencia de los datos (tablas 14 y 17, figuras 19 y 22) en la cual no se observa tendencia relacionada con la asignación del medicamento en cada día.

Por último, el análisis por momentos estadísticos, este permite, en el caso de la disolución, que una molécula de fármaco contenida en la o las cápsula(s) se transfiera con cierta probabilidad desde el estado sólido al estado disuelto. El

resultado que se observa experimentalmente, es el resultado promedio de numerosas moléculas que participan en el proceso de disolución.

Para la comparación de los perfiles de disolución mediante el modelo compartimental seriado se esquematiza en una línea del tiempo, la cual nos permite examinar el comportamiento de los resultados en los momentos estadísticos: TMR, TMD y TMA.

Modelo Compartimental Seriado



Relación de las fases de la farmacocinética y el simulador de procesos cinéticos.

Sólido	Disolución	Distribución - Biotransformación	Salida o eliminación
Liberación			salida
Dispositivo de entrada		Dispositivo central	

Línea del tiempo con los momentos estadísticos

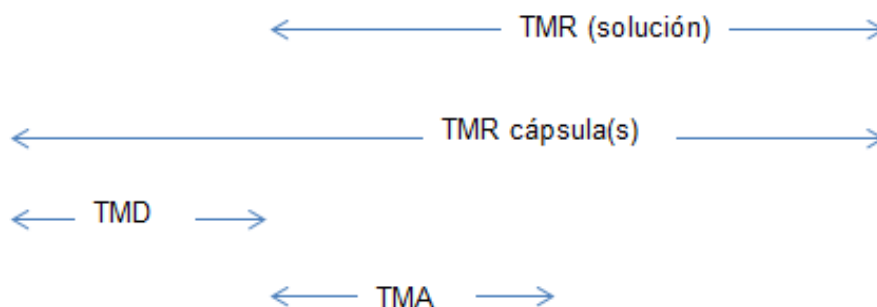


Figura 33 Línea de tiempo de los momentos estadísticos y su relación con el modelo compartimental seriado.

La figura anterior fue tomada y modificada de Banakar, 1991 que de acuerdo con las definiciones para cada uno de los tiempos promedio se vincula con el modelo compartimental seriado. El TMR es la media estadística de los tiempos en que las moléculas individuales, permanecen inalteradas en el organismo durante su tránsito por él. El TMA es el tiempo medio de residencia de una molécula de fármaco en la zona de absorción hasta alcanzar circulación sistémica, para este proceso se

considera que el fármaco debe estar disuelto en el sitio de absorción (Cárdenas Rodríguez et al., 1996). El TMD refleja el tiempo para que el fármaco se disuelva y es el primer momento estadístico para el proceso de disolución acumulativo y proporciona con exactitud la velocidad de liberación del fármaco (Paramita et al., 2013).

En las figuras 26, 27 y 29 son los intervalos de confianza del análisis por momentos estadísticos para ambos medios, donde, el TMR y TMD no hay diferencia significativa esto significa que el tiempo promedio varía entre 40 a 65 min en el que las moléculas permanecen en los dispositivos de entrada y central donde se lleva a cabo desde la disolución aparente hasta la salida del Cloranfenicol del dispositivo central. Sin embargo, al determinar la relación del TMD en cada día (figura 30) los valores se encuentran por debajo de la unidad, los tiempos promedio son más altos en el medicamento de referencia que en el de prueba. En el medio de solución amortiguadora de fosfatos (figura 28), los valores de dicha relación del TMD del medicamento de prueba entre el medicamento de referencia son cercanos a la unidad.

Relacionar los momentos estadísticos y el SCB, permite correlacionar lo que sucede entre la disolución *in vitro* y la biodisponibilidad *in vivo* mediante los números adimensionales: A_n , D_n , y D_o . Estos sirven para clasificar el medicamento de acuerdo con el SCB (Amidon et al., 1995).

El número de disolución (D_n) se obtuvo de la razón del TMR y el TMD, por lo tanto, no presenta diferencias en la media, este número es indicativo de la solubilidad, si D_n es menor a la unidad significa que el compuesto es poco soluble. Este número también está relacionado con el tamaño de la partícula, si es grande el valor de D_n la absorción es completa y se espera que el tamaño de la partícula sea lo suficientemente pequeño (Löbenberg et al., 2000), (Baena et al., 2008).

El TMA el solución amortiguadora de fosfatos y acetatos para ambos medicamentos es diferente, es mayor el tiempo (17-26min) en el medicamento de prueba que en el medicamento de referencia (8-17min), es decir es el tiempo en el que una vez liberado el fármaco comienza la transferencia al dispositivo central, en términos del modelo, la cantidad liberada (A_l) de fármaco comienza a ser transferida con una constante (K_l) al compartimento de entrada.

El valor del TMA es un reflejo del proceso global de la absorción (de la entrada) del fármaco mientras que la $C_{máx}$ y $T_{máx}$ son parámetros puntuales, indicativos únicamente de la cantidad de fármaco en el organismo en el preciso instante en el que la velocidad de entrada y la disposición son iguales (Doménech Berrozpe et al., 2001).

Este tiempo entre mayor sea el número de absorción (o de entrada) se hace más pequeño, y viceversa, entre más pequeño más grande será el An . El An es un indicativo tanto de la solubilidad del fármaco como de la permeabilidad. Esto explica la diferencia entre el medicamento de referencia y el medicamento de prueba, el tiempo promedio de entrada es más grande en el medicamento de prueba, a pH 6.8 y en pH 4.5, y el número de entrada es mucho mayor en el medicamento de referencia a menor tiempo de entrada.

VII. CONCLUSIONES

- ✚ El método analítico desarrollado para el estudio de disolución se validó mediante placebos cargados para el medicamento de prueba y por adiciones patrón para el medicamento de referencia determinando que el método es confiable normativamente y estadísticamente para la cuantificación de Cloranfenicol en los medios de disolución.
- ✚ Se determinaron las condiciones experimentales del simulador de procesos cinéticos para la comparación de los perfiles de disolución.
- ✚ Se compararon los perfiles de disolución mediante la obtención de las constantes de liberación. por las características de los perfiles de disolución en el simulador, el análisis estadístico para biodisponibilidad (disponibilidad relativa) y bioequivalencia (equivalencia *in vitro*). Además, por el modelo independiente con los momentos estadísticos. Y por la obtención del porcentaje de la cantidad liberada el enfoque dependiente del modelo, se encontró:
 - El proceso de disolución mediante el uso del simulador de procesos cinéticos seriados en la solución amortiguadora de acetatos es discriminativo.
 - No existen diferencia significativa en las constantes de liberación de las cápsulas de prueba y referencia en ambos medios.
 - Las cápsulas de referencia y prueba presentan diferencias estadísticamente en el C máx bajo el análisis estadístico de disponibilidad y equivalencia *in vitro* pero no existen diferencias significativas en el $ABC_{0-\infty}$.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Aiache J. M., Devissaguet J. Ph. y Guyot A. M. Biofarmacia [Libro]. - México : El Manual Moderno, S.A de C.V., 1983. - 2852060280.

Alcántara Alejandro, García María Araceli y Soberón Evelyn Guía de validación de métodos analíticos. [Libro]. - D.F., México : Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A.C., 2002.

Amidon Gordon L., Lennernäs Hans y Shah Vinod P. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutical Drug Classification: The correlation of in vitro drg product dissolution and in vivo bioavailability. [Publicación periódica]. - Michigan, USA : Pharmaceutical Research, 1995. - 3 : Vol. 12.

Baena Y. y Ponce D'León L. F. Importancia y fundamentación del sistema de clasificación biofarmacéutico, como base de la exención de estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia in vivo [Publicación periódica]. - Bogotá, Colombia : Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm., 2008. - 18-32 : Vol. Vol. 37 (1).

Banakar Umesh V. Pharmaceutical dissolution testing [Libro]. - New York, United States of America : Marcel Dekker, 1991.

Barrera Galicia Mauricio Aplicación de métodos de calibración multivariante en la cunatificación simultánea poir espectrofotometría UV, de Acetaminofen (APAP) y Naproxeno (NAP) presentes en un medio de disolución. [Libro]. - Cuautitlán Izcalli, Estado de México : Tesis, UNAM, 2004.

Brown Richard J. Comparison of the extrapolation precision of sequential and conventional standard addition calibrations [Conferencia]. - [s.l.] : Measurement, 2011.

Cárdenas Rodríguez Hilda Lilia y Cortés Arroyo Alma Rosa Aspectos biofarmacéuticos de la evaluación de medicamentos [Libro]. - México, D.F : Universidad Autónoma Metropolitana, 1996.

Cardone Mario J. Detection and determination of error in analytical methodology. Part I. In method verification program. [Publicación periódica]. - [s.l.] : Journal Association off Analytical Chemistry, 1983. - 5 : Vol. 66.

Costa Paulo y Sousa Lobo José M. Modeling and comparison of dissolution profiles [Publicación periódica]. - [s.l.] : European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001. - 2 : Vol. 13.

Dokoumetzidis Aristides y Macheras Panos A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System [Publicación periódica] // International Journal of Pharmaceutics. - 2006. - págs. 1-11.

Doménech Berrozpe José y Martínez Lanao José Biofarmacia y farmacocinética. vol I [Libro]. - Madrid, España : Síntesis S.A., 2001.

Doménech Berrozpe José, Martínez Lanao José y Plá Delfina José María Biofarmacia y Farmacocinética Vol- I [Libro]. - Madrid, España : SÍTESIS S.A, 2001.

FDA FDA.GOV [En línea] // Guidance for Industry Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. - Food and Drug Administration, Agosto de 1997. - Septiembre de 2013. - <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070237.pdf>.

FDA. GOV [En línea] // Guidance for Industry. Statistical approaches to establishing bioequivalence. - U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, Enero de 2001. - 18 de Diciembre de 2015. - <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070244.pdf>.

FDA.GOV [En línea] // Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products. - Marzo de 2003. - Noviembre de 2014. - <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070124.pdf>.

Guerrero González Alejandra Joselyn Influencia de la formulación sobre la liberación de fármacos en forma farmacéutica sólida, evaluado mediante un modelo compartimental seriado. [Libro]. - Cuautitlán Izcalli, Estado de México : UNAM, Tesis, 2010.

Hernández Patlán Daniel y Solís Cruz Bruno Desarrollo y validación de un método analítico por adiciones patrón para evaluar y comparar perfiles de disolución de cinco marcas diferentes de tabletas de Metoprolol en equipos II y IV USP. [Libro]. - Cuautitlán Izcalli, Estado de México : UNAM, Tesis, 2011.

Juan Mercedes Secretaría de Salud [En línea]. - COFEPRIS, 11 de Febrero de 2005. - www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/a110205..

Kuehl Robert O. Diseño de experimentos. Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. [Informe]. - México : Thomson, Segunda edición, 2000.

Löbenberg Raimar y Amidon Gordon L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. [Publicación periódica]. - [s.l.] : European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2000. - Vol. 50.

López Cervantes Israel Determinación de las condiciones de funcionamiento del simulador monocompartimental para evaluar la liberación de fármacos en medicamentos administrados vía intramuscular. [Libro]. - Cuautitlán Izcalli, Estado de México : Tesis, UNAM, 2014.

Machado J. C., Lange A. D. y Todeschin V. Development and Validation of a Discriminative Dissolution Method for Atorvastatin Calcium Tablets using in vivo Data by LC and UV Methods [Publicación periódica] // PharmSciTech. - 2014. - págs. 189-97.

Martínez García Mario Aplicación de los procesos cinéticos seriados, como fundamentos en el estudio de liberación de fármacos, en un aparato de simulación cinética. Formas farmacéuticas sólidas. [Libro]. - Cuautitlán Izcalli, Estado de México : Tesis, UNAM, 2006.

Medicamentos de Referencia [En línea] // Secretaria de Salud. COFEPRIS. - Comisión de autorización sanitaria, 15 de Agosto de 2013. - Septiembre de 2013. - <http://www.cofepris.gob.mx/AS/Paginas/Registros%20Sanitarios/RegistroSanitarioMedicamentos.aspx>.

Montgomery Douglas C. Diseño y análisis de experimentos [Libro]. - México, D.F : LIMUSA, 2004.

Nazario López Nora Nelly Evaluación de la liberación de fármacos mediante un modelo compartimental seriado [Libro]. - Cuautitlán Izcalli, México : TESIS, UNAM, 2010.

NOM-177-SSA1-2013 Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. 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 de intercambiabilidad... [Libro]. - 2013.

Papadopoulou Vasiliki, Kosmidis Kosmas y Vlachou Marilena On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms [Publicación periódica] // International Journal of Pharmaceutics. - 2006. - págs. 44–50.

Paramita Dey, Sabyasach Maiti y Biswanath Sa Gastrointestinal Delivery of Glipizide from Carboxymethyl Locust Bean Gum–Al³⁺ 1–Alginate Hydrogel Network: In Vitro and In Vivo Performance [Publicación periódica] // Journal of Applied Polimer science. - 2013. - págs. 2063–2072.

Rajesh Krishna y Lawrence Yu Biopharmaceutics applications in drug development [Libro]. - New York, USA : Springer Science, 2008.

Shargel León y Wu-Pong Susana Applied biopharmaceutics and phamacokinetics. [Libro]. - North Carolina, EUA : Mc Graw Hill, 2004.

USP30 Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP). - Estados Unidos de América : [s.n.], 2007. - Vol. 30.

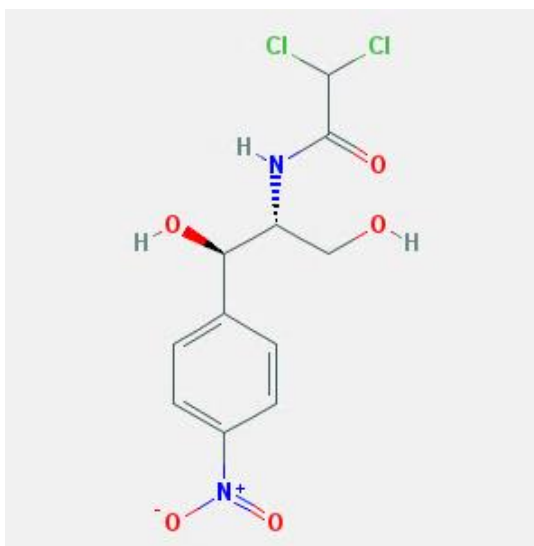
IX. ANEXOS

ANEXO A. Preparación de Soluciones

Las soluciones amortiguadoras, así como las soluciones de Ácido Clorhídrico (HCl) e Hidróxido de Sodio (NaOH) fueron preparadas conforme al procedimiento descrito en la FEUM 8^{va} edición y la USP 30.

ANEXO B. Monografía de Cloranfenicol

Cloranfenicol



Fórmula empírica: C₁₁H₁₂Cl₂N₂O₅

Peso molecular: 323.13g/mol

Sinónimos: CAF, CAP, Chloramfenikol, Chloramphenicole, Chloroamphenicol, Cloroamfenicolo, D-Chloramphenico, Cloranfenicol.

Nombre IUPAC 2,2-Dicloro-N-[(1R,2R)-2-hidroxi-1-(hidroximetil)-2-(4nitrofenil)etil]acetamida.

Número de CAS 56-75-7

PROPIEDADES FÍSICAS

Descripción Cristales finos, entre blanco y gris-blanco o blanco amarillento (Clarck).

Cloranfenicol: Cristales con forma de aguja o placas alargadas finas de color blanco a blanco grisáceo o blanco amarillento. Sus soluciones son prácticamente neutras al tornasol (USP).

Punto de fusión 148°-150°

PROPIEDADES QUÍMICAS

Grupos funcionales Haluro, amida secundaria, alcohol, nitro.

Naturaleza química Ácida

pKa 5.5

LogP (octanol/agua) 1.1

Solubilidad: 2.5mg/ml

Estabilidad: Es razonablemente estable en soluciones neutras o moderadamente acidas. Su solución en alcohol es dextrógira y su solución en acetato de etilo es levógira. Presenta degradación por hidrólisis alcalina

Poco soluble en agua; fácilmente soluble en alcohol, en propilenglicol, en acetona y en acetato de etilo.(USP)

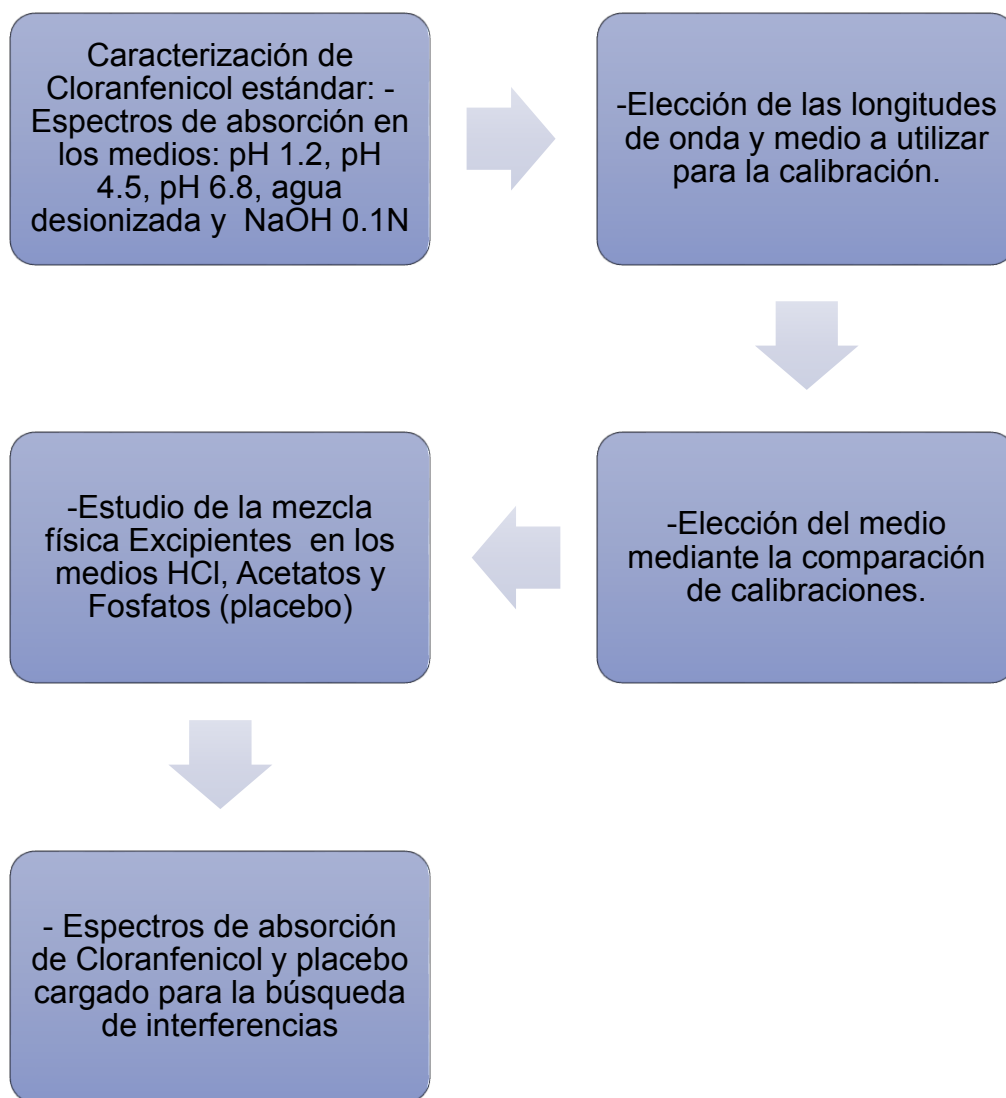
Espectro UV Medio acuoso: 278 ($A_{1\%}^{1\text{cm}}=298a$)

ANEXO C. Generalidades de los medicamentos de prueba y referencia.

Descripción DCI	Cloramfenicol. Un antibiótico aislado por primera vez a partir de cultivos de <i>Streptomyces venezuelae</i> . Tiene una estructura relativamente simple y fue el primer antibiótico de amplio espectro que se ha descubierto. Actúa interfiriendo con la síntesis de proteínas bacterianas y es principalmente bacteriostática.
Forma farmacéutica	Cápsulas
Dosis	500 mg, medicamento de prueba 250 mg, medicamento de referencia
No de lote	Medicamento de prueba: 208288 Medicamento de referencia: 1168001
Fecha de caducidad	Medicamento de prueba, 13 agosto 14 Medicamento de referencia: Diciembre, 2013
Recepción criterios, manejo y almacenamiento.	Medicamento de prueba: Puede ocasionar alteraciones hemáticas y aún anemia aplásica. Debe evitarse el empleo de este medicamento en padecimientos leves como resfriados, amigdalitis, rinitis, diarreas, etc. Y en padecimientos que pueden ser tratados con otros medicamentos menos peligrosos. Este producto está contraindicado en embarazadas y en niños recién nacidos es sumamente peligroso, por lo que se utilizará por prescripción y bajo vigilancia médica. Medicamento de referencia: Protéjase de la luz. Consérvese bien tapado a una temperatura no mayor a 30°C y en un lugar seco. No se administre durante el embarazo o la lactancia.

ANEXO D. Desarrollo analítico

1. Diagrama de actividades experimentales en el desarrollo analítico.



a. Espectros de absorción en los siguientes medios: HCl pH 1.2, solución amortiguadora de Acetatos pH 4.5, solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8, agua desionizada y solución de NaOH 0.1N, agua desionizada.

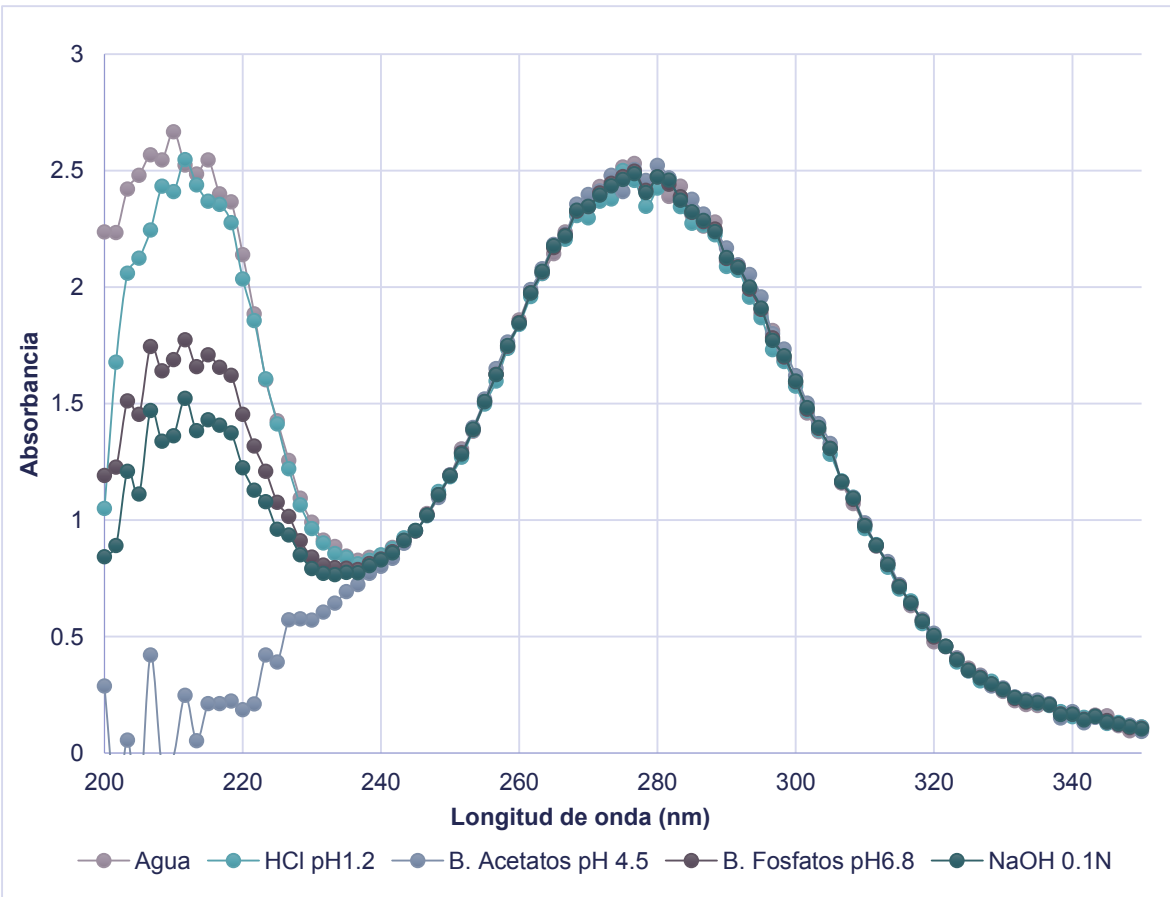


Gráfico 1 Comparación entre los espectros de absorción de Cloranfenicol en los diferentes medios a diferentes valores de pH.

En este espectro se observa que el Cloranfenicol tiene un comportamiento similar desde la longitud de onda de 240 a 320 nm en todos los medios con un máximo de absorción aproximadamente de 2.5 entre las longitudes de onda de 278 y 280nm, los mínimos entre 240 – 241 y 310-311 nm con una absorbancia de 0.85 aproximadamente. Por lo tanto, se utilizaron 24 longitudes de onda: 310, 307, 304, 301, 298, 295, 292, 289, 287, 284, 281, 278, 275, 272, 269, 267, 266, 263, 260, 257, 254, 251, 248, 241 [nm] para la detección de Cloranfenicol.

Las absorbancias en cada uno de los medios son similares en las longitudes asignadas anteriormente y para elegir el medio se realiza en base a la solubilidad, tiempo en que tarda en disolverse, la estabilidad, la seguridad del analista en el manejo del medio y la facilidad de preparación del medio.

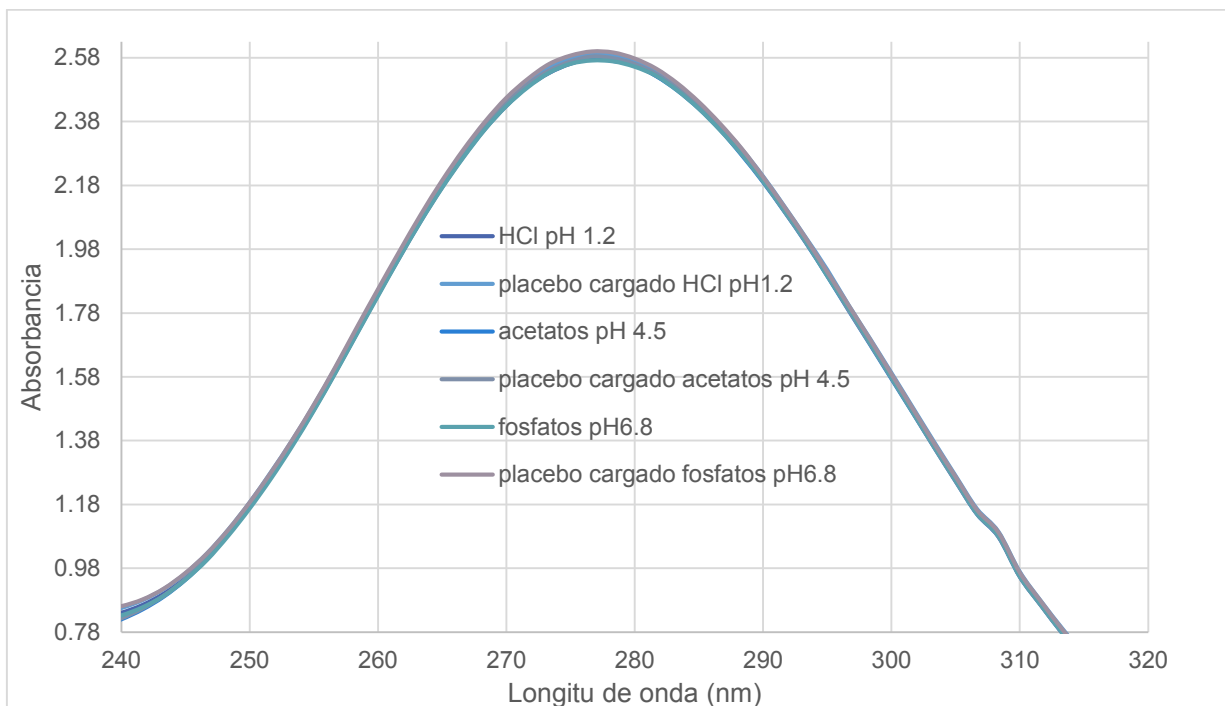


Gráfico 2 . Espectro de absorción de Cloranfenicol y Placebo cargado en los tres medios: HCl pH 1.2, Solución amortiguadora de acetatos pH 4.5 y Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8, los datos son los promedios de tres muestras cada uno.

En el gráfico anterior se expresan las absorbancias de los excipientes de las cápsulas de 500 mg la cual indica las posibles interferencias durante la validación del método analítico.

ANEXO F. Validaciones del método analítico

Linealidad y precisión del sistema.

Los métodos analíticos consisten generalmente en la preparación, separación y detección del analito. Dado que se utilizó el análisis multivariante (con el algoritmo de Haaland) el método es simplificado a la preparación y detección a diferentes longitudes y en el análisis numérico, la separación se lleva a cabo intrínsecamente.

En algoritmo de MCP establecido por Haaland, se realiza el análisis de la calibración y la predicción para un solo componente a la vez. Solo se emplea la concentración de un solo componente de interés en los datos de la calibración. (Barrera Galicia, 2004)

Para la evaluación de la linealidad y precisión del sistema se preparó una curva de calibración con 6 concentraciones (9, 18, 36, 54, 72 y 90 µg/ml) y cada concentración por triplicado a partir de una solución stock de concentración aproximadamente de 225µg/ml.

La detección se realizó en el espectrofotómetro Cary Varian UV, del cual se lleva a la detección a 24 longitudes de onda desde 310- 241nm para la obtención de la respuesta analítica, se obtienen primero las absorbancias mediante el software Simple Reads las cuales se almacenan con el formato*.rt para ser utilizado en Excel y después mediante un análisis multivariante con el software *ISHEJA* (algoritmo de Haaland) las concentraciones.

En el análisis multivariante se obtiene las muestras desechables, a lo que el *ISHEJA* llama OUTLIERS, donde el valor crítico es +/-2%. Se evalúa, linealidad con un coeficiente de correlación cercano a la unidad (0.99), coeficiente de variación menor al 1%, intercepto y pendiente, posteriormente con la predicción de las concentraciones de la calibración se determina el porcentaje de desviación.

Ensayo para las muestras directas:

Una vez obtenidas las muestras provenientes, de la disolución en medios: Solución amortiguadora HCl pH 1.2, Solución amortiguadora de Acetatos pH 4.5 y solución amortiguadora de Fosfatos pH 6.8, del simulador leer inmediatamente en el espectrofotómetro Cary Varian UV a las 24 longitudes de onda ajustando al cero con HCl pH1, 2. Obtener la predicción con el programa *ISHEJA* con el mismo factor óptimo de análisis en la calibración.

Tabla. Concentración estimada por el programa ISHEJA y concentración real.

Concentración estimada (µg/ml)	Concentración real (µg/ml)	Error relativo
9.0008	9.0873	-0.95%
8.9713	9.0873	-1.28%
9.0645	9.0873	-0.25%
18.2268	18.1746	0.29%
18.2160	18.1746	0.23%
18.3432	18.1746	0.93%
36.3530	36.3492	0.01%
36.4026	36.3492	0.15%
36.3930	36.3492	0.12%
54.1815	54.5238	-0.63%
54.6109	54.5238	0.16%
54.5710	54.5238	0.09%
72.6110	72.6984	-0.12%
72.7789	72.6984	0.11%
72.7969	72.6984	0.14%
90.7672	90.8730	-0.12%
90.8447	90.8730	-0.03%
90.9860	90.8730	0.12%

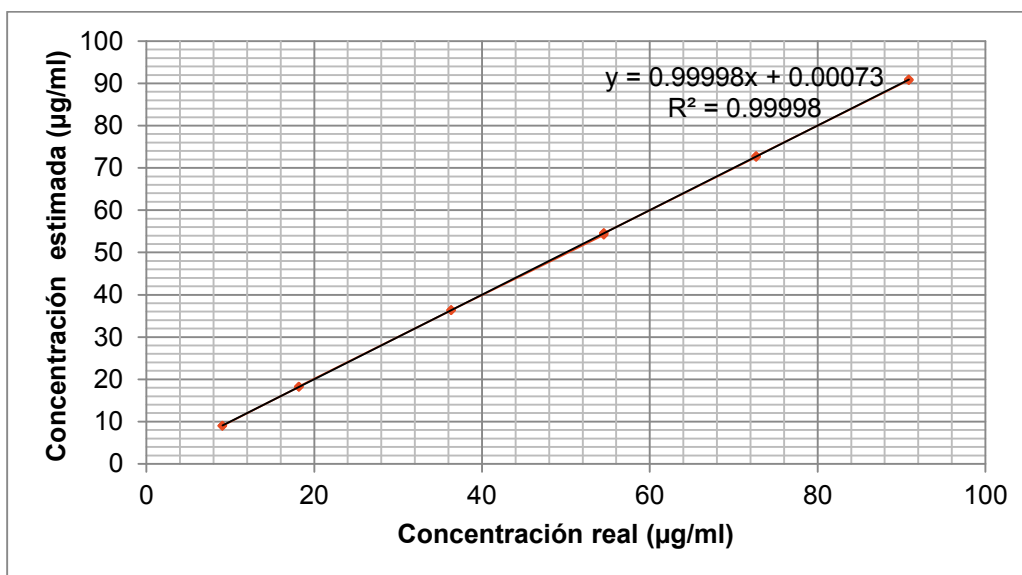


Gráfico 3 Respuesta analítica versus concentración real y ecuación. Evaluación de la linealidad del sistema.

Tabla. Resultados de la evaluación de la linealidad y precisión del sistema.

Evaluación	Parámetro estadístico	valor de aceptación	valor real	Aceptación
linealidad	Coeficiente de correlación múltiple	≥ 0.99	0.9999922	Aceptado
	Coeficiente de determinación R ²	≥ 0.98	0.9999844	Aceptado
	Error relativo	$\leq 2\%$	---	Aceptado
	IC pendiente	no debe incluir cero	0.9978, 1.0020	Aceptado
precisión	%CV	$\leq 1.5\%$	0.48971	Aceptado

La tabla y gráfico anterior indica que en el sistema son aceptables los valores de los parámetros estadísticos. Por lo tanto, el sistema es lineal y preciso normativamente.

Validación del método analítico para las cápsulas de 500 mg de Cloranfenicol por placebos cargados.

Tabla. Resumen de la validación del método analítico por placebos cargados para las cápsulas de prueba.

Evaluación	pH	parámetro estadístico	valor de aceptación	valor obtenido	aceptación
Precisión	1.2	CV	$\leq 2\%$	1.47210527	acceptable
	4.5			1.73392752	acceptable
	6.8			2.09648487	acceptable
Exactitud	1.2	Promedio porcentaje de recobro	Incluya el intervalo de 97-103%	101.727521	acceptable
	4.5			102.602323	acceptable
	6.8			101.818122	acceptable
Linealidad	1.2	Coeficiente de determinación (R ²)	R ² ≥ 0.98	0.99997021	acceptable
	4.5			0.99999494	acceptable
	6.8			0.99995191	acceptable

	1.2	IC de la pendiente	Debe incluir la unidad	0.9965, 1.0030	acceptable
	4.5			1.0027, 1.0054	no acceptable
	6.8			0.9799, 0.9881	no acceptable
	1.2	Error relativo debido a la regresión	Error relativo \leq 2%	2.2387	acceptable
	4.5			1.8300	acceptable
	6.8			2.0500	acceptable
	1.2	CV	\leq 3%	1.47210527	acceptable
	4.5			1.73392752	acceptable
	6.8			2.09648487	acceptable
Repetibilidad	1.2	CV	\leq 3%	1.07520641	acceptable
	4.5			1.35875097	acceptable
	6.8			2.21663657	acceptable
Estabilidad	1.2	Di	\leq 3%	0.69406924	acceptable
	4.5			0.21684588	acceptable
	6.8			1.38467125	acceptable
Robustez	1.2	Di	\leq 3%	0.49679453	acceptable
	4.5			0.32931861	acceptable
	6.8			2.96281230	acceptable
Tolerancia	1.2	CV	\leq 3%	0.52052245	acceptable
	4.5			0.49204852	acceptable
	6.8			0.17332159	acceptable

La tabla anterior indica que el método analítico es confiable dado que es aceptable en la mayoría de las características o capacidades del método. En la evaluación de la linealidad del método los parámetros cumplen las especificaciones normativas principalmente de la NOM-177-SSA1-2013 la cual indica que el coeficiente de

determinación debe ser mayor a 0.98 y el error relativo menor o igual al dos por ciento, sin embargo, los intervalos de la pendiente no pasan por la unidad, por lo tanto se aplica un análisis de variancia de un factor.

Análisis de varianza para la linealidad del método

Hipótesis para cada uno de los medios (pH):

Ho: No existe una relación lineal entre la concentración real y la concentración estimada.

Ha: Existe una relación lineal entre la concentración real y la concentración estimada.

Criterios de aceptación:

$F \leq F$ crítica se acepta Ho

$F \geq F$ crítica se acepta Ha

Tabla ANÁLISIS DE VARIANCIA MEDIO HCl pH 1.2					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	8715.9675	8715.9676	436412.26	8.2765E-31
Residuos	13	0.2596342	0.0199719		
Total	14	8716.2272			

La F es mayor que la F crítica por lo tanto se rechaza Ho y se acepta Ha. Por lo tanto, existe una relación lineal entre la concentración real y la concentración estimada.

Tabla ANÁLISIS DE VARIANCIA MEDIO Solución amortiguadora de Acetatos pH 4.5					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	8102.7344	8102.7344	2569088.61	8.1975E-36
Residuos	13	0.04100113	0.00315393		
Total	14	8102.77541			

La F es mayor que la F crítica por lo tanto se rechaza Ho y se acepta Ha. Por lo tanto, existe una relación lineal entre la concentración real y la concentración estimada.

Tabla ANÁLISIS DE VARIANCIA Solución amortiguadora de Fosfatos pH 6.8					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	8539.06432	8539.064321	270326.117	1.8615E-29
Residuos	13	0.41064414	0.031588011		
Total	14	8539.47497			

La F es mayor que la F crítica por lo tanto se rechaza H_0 . Por lo tanto, existe una relación lineal entre la concentración real y la concentración estimada. Por lo tanto, el método analítico es lineal estadísticamente.

Validación del método analítico mediante la técnica de adiciones patrón para las cápsulas de referencia.

Tabla Resumen de la confiabilidad del método analítico mediante la técnica de adiciones patrón para las cápsulas de referencia.

Evaluación	pH	parámetro estadístico	valor de aceptación	valor obtenido	aceptación
Precisión	1.2	CV	$\leq 2\%$	1.38	aceptable
	4.5			1.39	aceptable
	6.8			1.22	aceptable
Exactitud	1.2	Promedio porcentaje de recobro	Incluya el intervalo de 98-102%	99.26	aceptable
	4.5			100.8	aceptable
	6.8			98.79	aceptable
Linealidad del método	1.2	Coeficiente de determinación (R^2)	$R^2 \geq 0.98$	0.99953	aceptable
	4.5			0.99885	aceptable
	6.8			0.99964	aceptable
	1.2	IC de la pendiente	Debe incluir la unidad	1.001, 0.978	aceptable
	4.5			1.0374, 1.0042	no aceptable
	6.8			1.006, 0.9831	aceptable
	1.2	Error relativo debido a la regresión	Error relativo $\leq 2\%$	1.90459	aceptable
	4.5			1.5507	aceptable
	6.8			1.5529	aceptable
	1.2	CV	$\leq 2\%$	1.3842	aceptable
4.5	1.5805			aceptable	
6.8	1.0414			aceptable	

En esta tabla se observa que el método analítico es capaz de dar resultados precisos y exactos, conforme a los criterios de aceptación de la NOM-177-SSA1-2013, para la cuantificación de Cloranfenicol en las cápsulas como medicamento de referencia en los medios de pH 1.2, 4.5 y 6.8, y el valor del coeficiente de variación (CV) es menor al 2% y los intervalos de confianza se encuentran dentro de los límites: 98 al 102%.

Además, el método es lineal ya que el valor del coeficiente de determinación (R^2) está cercano a la unidad, y el CV es menor al 2% (Alcántara et al., 2002). Sin embargo, los intervalos de confianza de la pendiente en la solución amortiguadora de acetatos pH 4.5 no incluyen la unidad. Por lo tanto, se presenta el análisis de variancia (ANADEVA) para demostrar que en la respuesta no se presentan interferencias para dicho medio y así ser utilizado en los ensayos de disolución.

Otra forma de demostrar exactitud es con la prueba t-student la cual se muestra en las siguientes tablas, bajo las siguientes hipótesis:

Hipótesis estadística:

Ho: No hay diferencia significativa en las medias comparadas

Ha: Existe diferencia significativa en las medias comparadas

Criterio de aceptación

$P \leq 0.05$ Hay diferencia entre las medias y se acepta Ha

$P > 0.05$ No hay diferencia entre las medias y se acepta Ho

Tabla Prueba t para dos muestras suponiendo variancias iguales para evaluar exactitud del método analítico por adiciones patrón en el medio HCl pH 1.2

	Concentración Recuperada ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración real ($\mu\text{g/ml}$)
Media	33.45	33.70
Variancia	399.32	407.20
Observaciones	18	18
Variancia agrupada	403.26	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	34	
Estadístico t	-0.03547	
p(T<=t) dos colas	0.97176	
Valor crítico de t (dos colas)	2.03224	

Tabla Prueba t para dos muestras suponiendo variancias iguales para evaluar exactitud del método analítico por adiciones patrón en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5

	<i>Concentración Recuperada (µg/ml)</i>	<i>Concentración real (µg/ml)</i>
Media	34.86388889	34.4166667
Varianza	393.5298134	373.249224
Observaciones	18	18
Varianza agrupada	383.3895185	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	34	
Estadístico t	0.068521129	
p(T<=t) dos colas	0.945772201	
Valor crítico de t (dos colas)	2.032244509	

Tabla Prueba t para dos muestras suponiendo variancias iguales para evaluar exactitud del método analítico por adiciones patrón en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8

Prueba t para dos muestras suponiendo variancias iguales		
	<i>Concentración recuperada</i>	<i>Concentración real</i>
Media	33.89	34.18
Varianza	356.98	358.01
Observaciones	18	18
Varianza agrupada	357.497059	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	34	
Estadístico t	-0.04541	
p(T<=t) dos colas	0.96404	
Valor crítico de t (dos colas)	2.03224	

En estas tablas se observa que el valor de t es menor al valor crítico y el valor p es mayor al nivel de significancia (0.05). Por lo que no hay diferencia significativa, por tanto, el sesgo obtenido es aceptable y el método es exacto estadísticamente para las muestras analíticas que provienen de los medios: HCl pH 1.2, solución amortiguadora de acetatos pH 4.5 y solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8.

ANADEVA

Hipótesis:

Ho: No existe una relación lineal entre la concentración real y la concentración recuperada del analito.

Ha: Existe una relación lineal entre la concentración real y la concentración recuperada del analito.

Tabla. Análisis de variancia realizado para determinar la relación lineal entre la concentración recuperada y la concentración real, aplicando la técnica de adiciones patrón en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5

ANÁLISIS DE VARIANCIA					
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	4086.66	4086.66	17668.48	9.3009E-22
Residuos	13	3.01	0.23297		
Total	14	4089.67			

De acuerdo con el análisis de variancia, el valor de F calculada es mayor que la F crítica, se determina que existe una relación lineal entre la concentración real y la concentración recuperada.

ANEXO G. Confiabilidad de las diluciones: 5 en 25 en los tres medio, 3 en 25 y diluciones: 5 en 25 y 10 en 25 en solución amortiguadora de acetatos y solución amortiguadora de fosfatos.

a) Diluciones 5/25

Precisión, exactitud y repetibilidad

	% Recobro					
	Precisión y exactitud			Repetibilidad		
[]	HCl pH 1,2	Solución amortiguadora de acetatos pH 4,5	Solución amortiguadora de fosfatos pH 6,8	HCl pH 1.2	Solución amortiguadora de acetatos pH 4.5	Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8
80	101.51	101.48	102.50	102.81	101.44	100.31
	101.78	102.37	103.08	102.86	101.75	101.03
	101.91	102.62	103.37	102.99	102.70	101.19
	102.20	102.64	103.59	104.83	103.82	101.36
	102.20	103.04	104.24	107.45	104.01	101.42
	102.45	104.13	104.57	108.61	106.01	101.73
260	100.19	100.27	101.22	99.71	101.19	98.06
	100.25	100.41	101.59	99.84	101.57	98.50
	100.26	100.53	101.94	100.04	101.92	98.52
	100.42	100.72	102.09	100.16	102.01	98.55
	100.65	100.84	102.23	100.18	102.09	98.70
	100.89	101.19	102.38	100.40	102.40	98.80
440	100.72	100.74	100.94	99.86	100.55	98.08
	100.81	100.80	101.23	100.01	100.55	98.12
	100.83	100.83	101.47	100.06	100.70	98.30
	100.86	100.83	101.71	100.33	100.99	98.37
	100.95	101.02	102.11	100.38	100.99	98.80
	101.09	101.20	102.24	101.63	101.06	98.99
PROMEDIO	101.11	101.43	102.36	101.79	101.99	99.38
DESVEST	0.72	1.07	1.04	2.70	1.42	1.35
CV	0.72	1.06	1.01	2.65	1.39	1.36
ICI	100.77	100.93	101.88	100.54	101.33	98.75
ICS	101.44	101.92	102.84	103.03	102.64	100.00

Los intervalos de confianza resultantes incluye el valor de 100 sólo en el Solución amortiguadora de fosfatos, sin embargo la norma NOM-177-SSA1-2013 acepta que la media aritmética se encuentre entre el 98%-103% para métodos espectrofotométricos, por lo tanto, el método es exacto y repetible.

Para el parámetro de precisión, los valores del coeficiente de variación son menores al 3% por lo tanto, el método es preciso.

Linealidad del método

a) análisis del porcentaje de recobro

Concentración	% Recobro		
	Linealidad		
	HCl pH 1.2	Solución amortiguadora de acetatos pH 4.5	Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8
80	101.39571	102.48559	99.7010
	102.28217	103.23534	101.3015
	103.12902	103.45546	101.8241
170	101.47035	101.90064	99.8580
	101.51427	102.24368	100.0037
	101.67187	103.19428	100.2325
260	100.09665	101.62819	99.6157
	100.77297	101.65575	99.6368
	101.27725	101.83733	99.8781
350	99.517442	101.70273	98.7109
	99.573851	101.70748	98.7341
	99.720972	101.90078	98.8159
440	99.734866	101.27726	97.3988
	99.779189	101.39191	98.1183
	100.6583	101.44375	99.8653
PROMEDIO	100.83966	102.07068	99.5796
DESVEST	1.098854	0.7055583	1.1282
CV	1.0897042	0.6912448	1.1330
ICI	100.28357	101.71362	99.0087
ICS	101.39575	102.42773	100.1506

Se analizaron los datos con el porcentaje de recuperación y con la cantidad adicionada-recuperada. En la cual, el método analítico desarrollado cumple con la capacidad de ser lineal ya que el intervalo de confianza para la media poblacional incluye el 100%, tal como se observa en el Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8, y el promedio aritmético del porcentaje de recobro para los medios HCl pH 1.2 y Solución amortiguadora de Acetatos pH 4.5 que se encuentran dentro de los intervalos del 98-103%, además que el cv es menor al 2% de acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013.

b) Dilución 3 en 25

1. Solución amortiguadora de acetatos pH 4.5

- Evaluación de Precisión y exactitud del método

Concentración estimada	Concentración real	% Recobro
451.5808	456.000	99.0309
451.7325	456.000	99.0641
452.3750	456.000	99.2050
452.5592	456.000	99.2454
452.8458	456.000	99.3083
454.0908	456.000	99.5813
569.3667	578	98.5063
570.2708	578	98.6628
570.4817	578	98.6992
570.7975	578	98.7539
570.9700	578	98.7837
571.0275	578	98.7937
690.9942	698	98.9963
691.4167	698	99.0569
692.2383	698	99.1746
692.9475	698	99.2761
693.7117	698	99.3856
693.9500	698	99.4198
	Promedio	99.0524
	Desv. Est.	0.2994
	% CV	0.3022

Tabla Evaluación de la linealidad del Método en la solución amortiguadora de acetatos pH 4.5

Concentración estimada	Concentración real	% Recobro
452.559	457.400	98.9417
452.846	457.400	99.0043
454.091	457.400	99.2765
525.403	530.6	99.0204
525.549	530.6	99.0481
526.533	530.6	99.2334
570.798	578.2	98.7197
570.970	578.2	98.7496
571.028	578.2	98.7595
634.860	643.2	98.7034
636.460	643.2	98.9521
636.747	643.2	98.9967
692.948	698	99.2761
693.712	698	99.3856
693.950	698	99.4198
	Promedio	99.0325
	Desv. Est.	0.24081
	% CV	0.24316

2. Solución amortiguadora de fosfatos: dilución doble 5 en 25 y 10 en 25

- Evaluación de precisión y exactitud

Concentración estimada	Concentración real	% Recobro
474.6325	473.400	100.2604
474.9025	473.400	100.3174
475.7087	473.400	100.4877
476.6000	473.400	100.6760
476.7025	473.400	100.6976
476.7300	473.400	100.7034
570.8025	568	100.4934
571.0875	568	100.5436
571.8713	568	100.6816
574.8750	568	101.2104
575.7887	568	101.3713

577.5950	568	101.6893
695.8088	705.8	98.5844
695.8963	705.8	98.5968
700.3938	705.8	99.2340
701.2350	705.8	99.3532
703.9075	705.8	99.7319
704.2213	705.8	99.7763
	Promedio	100.2449
	Desv. Est.	0.8767
	% CV	0.8746

Linealidad

Solución amortiguadora de fosfatos: dilución doble 5 en 25 y 10 en 25

Concentración estimada	Concentración real	% Recobro
474.6325	473.400	100.2604
474.9025	473.400	100.3174
475.7087	473.400	100.4877
517.5337	517.8	99.9486
518.4987	517.8	100.1350
518.2563	517.8	100.0881
570.8025	568	100.4934
571.0875	568	100.5436
571.8713	568	100.6816
633.9463	633.6	100.0546
638.9763	633.6	100.8485
641.1925	633.6	101.1983
701.2350	705.8	99.3532
703.9075	705.8	99.7319
704.2213	705.8	99.7763
	Promedio	100.2612
	Desvest.	0.4716
	% CV	0.4704

ANEXO H. C máx. y ABC_{0-∞}

Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8

Secuencia	ABC _{0-∞} (µg/ml*min)		C máx. (µg/ml)	
	Prueba	Referencia	Prueba	Referencia
1	32032.262	32937.5562	475.25375	557.25125
1	32409.7057	35005.5903	487.755	563.965
1	37172.576	32415.4142	447.9825	652.24875
2	28983.7513	24154.9195	609.1	561.04375
2	31709.9526	35120.9295	555.065	539.64
2	33508.9705	32343.0985	642.2	488.56375

Solución amortiguadora de acetatos pH 4.5

Secuencia	ABC _{0-∞} (µg/ml*min)		C máx. (µg/ml)	
	Prueba	Referencia	Prueba	Referencia
1	32032.262	32937.5562	441.395	507.0075
1	32409.7057	35005.5903	403.9225	460.791667
1	37172.576	32415.4142	376.4635	426.636
2	28983.7513	24154.9195	431.728333	576.08625
2	31709.9526	35120.9295	429.75	644.215
2	33508.9705	32343.0985	567.6375	543.095833

ANEXO I. Porcentaje de la cantidad total liberada por el método de Nelson-Wagner.

Tabla. Porcentaje de la cantidad total liberada obtenido por el método Nelson-Wagner en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8

Tiempo (min)	Medicamento de prueba			Medicamento de referencia		
	Promedio	desvest	% CV	Promedio	desvest	% CV
5	8.69	0.02	26.29	17.76	0.08	43.28
10	28.11	0.05	19.20	45.27	0.17	37.00
15	46.61	0.06	13.09	66.84	0.15	22.98
20	61.06	0.06	9.24	83.75	0.12	13.95
25	71.69	0.05	7.23	94.25	0.08	8.56
30	78.89	0.05	5.77	100	0.06	5.57
35	84.65	0.04	4.40	100	0.04	4.14
45	92.04	0.02	2.38	100	0.02	2.06
65	97.65	0.01	0.52	100	0.01	0.64
95	100	0.00	0.49	100	0.00	0.29
125	100	0	0	100	0	0

Tabla Porcentaje de la cantidad total liberada obtenido por el método Nelson-Wagner en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5

Tiempo (min)	Medicamento de prueba			Medicamento de referencia		
	Promedio	desvest	% CV	Promedio	desvest	% CV
5	4.45	1.88	42.21	12.48	4.34	34.76
10	20.47	4.84	23.65	36.83	7.90	21.46
15	35.84	6.13	17.11	55.07	8.52	15.47
20	50.31	9.16	18.22	68.95	8.58	12.44
25	61.65	10.53	17.08	79.12	8.56	10.82
30	70.30	11.33	16.12	86.24	8.64	10.02
35	77.10	11.79	15.30	90.90	7.55	8.31
45	86.95	12.07	13.88	96.16	4.36	4.54
65	97.28	3.07	3.16	99.98	0.92	0.92
95	98.84	2.63	2.66	100	2.82	2.78
125	100	0.00	0.0	100	0	0