



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE PERFILES DE DISOLUCIÓN DE TRES LOTES DE TABLETAS DE
AZATIOPRINA, CUANTIFICADOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PRESENTA

DULCE ANAI FIGUEROA LÓPEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX.

AÑO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: INES FUENTES NORIEGA
VOCAL: JUAN MANUEL RODRIGUEZ
SECRETARIO: MA. DE LOS DOLORES CAMPOS ECHEVERRIA
1er. SUPLENTE: LUIS JESUS GARCIA AGUIRRE
2° SUPLENTE: KENNETH RUBIO CARRASCO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA
CONJUNTO E
EDIFICIO DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA, LABORATORIO 113**

ASESOR DEL TEMA: _____

INES FUENTES NORIEGA

SUPERVISOR TÉCNICO: _____

KENNETH RUBIO CARRASCO

SUSTENTANTE: _____

DULCE ANAI FIGUEROA LÓPEZ

INDICE GENERAL.

1.0	INTRODUCCIÓN.....	1
2.0	OBJETIVOS.	3
3.0	MARCO TEÓRICO.....	4
3.1	DISOLUCIÓN.....	4
3.2	PROCESO DE DISOLUCIÓN.	4
3.3	FACTORES QUE AFECTAN LA VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN.	5
3.4	IMPORTANCIA DE LA DISOLUCION PARA EL EFECTO TERAPEUTICO.....	7
3.5	PERFILES DE DISOLUCION.....	7
3.6	APARATOS PARA EVALUAR LOS PERFILES DE DISOLUCION.....	8
3.6.1	Aparato 1 (canastilla).	8
3.6.2	Aparato 2 (paletas).....	9
3.7	CONDICIONES DE LOS PERFILES DE DISOLUCION.	10
3.8	COMPARACION DE LOS PERFILES DE DISOLUCION	10
3.9	SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA.	11
3.9.1	Solubilidad.	12
3.9.2	Permeabilidad.	12
3.9.3	Disolución.	12
3.10	BIOEXENCIÓN.....	13
3.11	IMPORTANCIA DE LA BIOEXENCIÓN.	13
3.12	CRITERIOS DE BIOEXENCIÓN DE ACUERDO A LA FDA.	13
3.13	PRUEBAS DE INTERCAMBIABILIDAD DE ACUERDO A COFEPRIS.....	14
3.14	AZATIOPRINA.....	16
3.14.1	Propiedades fisicoquímicas	16
3.14.2	Mecanismo de acción.	16
3.14.3	Indicaciones terapéuticas y dosis.	17
3.14.4	Reacciones adversas.	17

3.14.5	Propiedades farmacocinéticas.....	18
3.15	VALIDACIÓN.....	20
3.16	PARAMETROS A EVALUAR EN LA VALIDACION, DE ACUERDO A LA NOM-177-SSA1-2013.....	21
3.17	ESTUDIOS DE ESTABILIDAD.....	22
3.18	TIPOS DE ESTUDIOS DE ESTABILIDAD.....	22
3.19	CRITERIOS PARA CONSIDERAR UN MEDICAMENTO ESTABLE, MEDIANTE PERFILES DE DISOLUCIÓN.....	23
4.0	METODOLOGÍA.....	24
4.1	Reactivos.....	24
4.2	Materiales.....	25
4.3	Equipos.....	25
4.4	DESARROLLO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AZATIOPRINA.....	26
4.5	VALIDACIÓN DEL SISTEMA.....	28
4.5.1	Linealidad del sistema.....	28
4.5.2	Precisión del sistema.....	29
4.5.3	Influencia del filtro.....	30
4.5.4	Estabilidad de la muestra.....	30
4.6	VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	31
4.6.1	Linealidad del método.....	31
4.6.2	Precisión del método.....	32
4.6.3	Exactitud del método.....	33
4.7	CONTROL FARMACEUTICO.....	33
4.7.1	Valoración.....	33
4.7.2	Variación de masa.....	35
4.7.3	Prueba control de disolución.....	36
4.8	EVALUACIÓN DE PERFILES DE DISOLUCIÓN.....	37

4.9	PERFILES DE DISOLUCION PARA LOTES SOMETIDOS A ESTABILIDAD ACELERADA.....	39
5.0	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
5.1	DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AZAIOPRINA.....	40
5.2	VALIDACIÓN DEL SISTEMA.....	41
5.2.1	Linealidad y precisión.....	41
5.2.2	Estabilidad de la muestra.....	43
5.2.3	Influencia del filtro.....	44
5.3	VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	45
5.3.1	Linealidad y Precisión (Repetibilidad) producto de referencia.....	45
5.3.2	Linealidad y Precisión (Repetibilidad) del medicamento de prueba (Lote A).....	46
5.3.3	Linealidad y Precisión (Repetibilidad) del medicamento de prueba (Lote B).....	47
5.3.4	Linealidad y Precisión (Repetibilidad) del medicamento de prueba (Lote C).....	48
5.3.5	Exactitud y precisión (Reproducibilidad).....	49
5.3.6	Exactitud y precisión (Reproducibilidad) del producto re referencia (IMURAN®).....	49
5.3.7	Exactitud y precisión (Reproducibilidad) del producto de prueba (Lote A).....	50
5.3.8	Exactitud y precisión (Reproducibilidad) del producto de prueba (Lote B).....	50
5.3.9	Exactitud y precisión (Reproducibilidad) del producto de prueba (Lote C).....	50
5.4	CONTROL FARMACEUTICO.....	51
5.4.1	Valoración.....	51
5.4.2	Uniformidad de masa.....	52
5.4.3	Prueba de disolución.....	53
5.5	EVALUACIÓN DE LOS PERFILES DE DISOLUCIÓN.....	54
5.5.1	Resumen del perfil de disolución del producto de referencia (IMURAN®).....	54
5.5.2	Resumen del perfil de disolución del producto de prueba (Lote A).....	56
5.5.3	Resumen del perfil de disolución del producto de prueba (Lote B).....	57
5.5.4	Resumen del perfil de disolución del producto de prueba (Lote C).....	59

5.5.5	Resultados obtenidos a partir del cálculo de F2.....	60
5.6	PERFILES DE DISOLUCION PARA LOTES SOMETIDOS A ESTABILIDAD ACELERADA.....	62
5.6.1	Perfiles de disolución del Lote B, después de ser sometido a estabilidad acelerada 1 mes y 3 meses.....	62
5.6.2	Resumen del perfil de disolución (LOTE B) 1 mes.....	63
5.6.3	Resumen del perfil de disolución (LOTE B) 3 meses.....	63
5.6.4	Perfiles de disolución del Lote C sometidos a estabilidad acelerada 1mes y 3 meses	65
5.6.5	Resumen del perfil de disolución (LOTE C) 1 mes.....	65
5.6.6	Resumen del perfil de disolución (LOTE C) 3 meses.....	66
6.0	CONCLUSIONES.....	68
7.0	ANEXOS.....	69
8.0	BIBLIOGRAFÍA.....	72

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1.	Factores que afectan la velocidad de disolución.....	6
Tabla 2.	Sistema de Clasificación Biofarmacéutico.....	11
Tabla 3.	Criterios que establece COFEPRIS para las pruebas de intercambiabilidad de medicamentos.....	15
Tabla 4.	Parámetros y valores para la validación.....	21
Tabla 5.	Estudios de estabilidad. ¹⁹	22
Tabla 6.-	Recomendaciones para la validación del método analítico.....	26
Tabla 7.-	Resumen de la metodología a seguir para elaborar la curva de calibración. (NOTA: el stock es de 110µg/mL)	27
Tabla 8.	Relación de alícuotas y volúmenes para la preparación de las curvas de calibración.....	28
Tabla 9.	Relación de alícuotas y volúmenes para la preparación de las curvas de calibración.....	32

Tabla 10. Condiciones experimentales empleadas para llevar a cabo el estudio de disolución.....	37
Tabla 11.- Resumen de cálculos para la predicción de las concentraciones para la curva de calibración.	40
Tabla 12. Resultados de linealidad y precisión del sistema.	42
Tabla 13. Resultados de la prueba de estabilidad a una temperatura de 4 °C.....	43
Tabla 14. Resultados de la prueba de estabilidad a una temperatura de 25 °C.....	43
Tabla 15. Resultados de la prueba de estabilidad a una temperatura de 37 °C.....	44
Tabla 16. Resultados de la influencia del filtro.	44
Tabla 17. Resultados de la linealidad y precisión (repetibilidad) del método para el producto de referencia (IMURAN®).....	45
Tabla 18. Resultados de la linealidad y precisión (repetibilidad) del método para el producto de prueba (Lote A).....	46
Tabla 19. Resultados de la linealidad y precisión (repetibilidad) del método para el producto de prueba (Lote B).....	47
Tabla 20. Resultados de la linealidad y precisión (repetibilidad) del método para el producto de prueba (Lote C).....	48
Tabla 21. Resultados de la exactitud y precisión (reproducibilidad) del método para el producto de referencia.....	49
Tabla 22. Resultados de la exactitud y precisión (reproducibilidad) del método para el producto de prueba (Lote A).....	50
Tabla 23. Resultados de la exactitud y precisión (reproducibilidad) del método para el producto de prueba (Lote B).....	50
Tabla 24. Resultados de la exactitud y precisión (reproducibilidad) del método para el producto de prueba (Lote C).....	50
Tabla 25. Resultados de la valoración de las tabletas de Azatioprina 50 mg.	51
Tabla 26. Resultados uniformidad de masa de acuerdo a la FEUM.....	52
Tabla 27. Resultados de la prueba de disolución en cada uno de los vasos	53
Tabla 28. Resumen del perfil de disolución del producto de referencia obtenido a partir de 12 tabletas.	54

Tabla 29. Resumen del perfil de disolución del producto de prueba (LOTE A) obtenido a partir de 12 tabletas.....	56
Tabla 30. Resultados del perfil de disolución del producto de prueba (Lote B).....	57
Tabla 31. Resultados del perfil de disolución del producto de prueba (Lote C).....	59
Tabla 32. Valores de F2 de los lotes A, B y C comparados con el producto de referencia IMURAN®.....	60
Tabla 33. Resumen del perfil de disolución del producto de prueba (Lote B) sometidos a estabilidad acelerada 1 mes obtenido a partir de 6 tabletas.....	63
Tabla 34. Resumen del perfil de disolución del producto de prueba (Lote C) sometidos a estabilidad acelerada 1 mes obtenido a partir de 6 tabletas.....	63
Tabla 35.- Cálculo de F2 , de los perfiles de disolución sometidos a estabilidad del lote B.....	64
Tabla 36. Resultados del perfil de disolución del producto de prueba (Lote B) sometidos a estabilidad acelerada 3 meses.	65
Tabla 37. Resultados del perfil de disolución del producto de prueba (Lote C) sometidos a estabilidad acelerada 3 meses.	66
Tabla 38.- Cálculo de F2 , de los perfiles de disolución sometidos a estabilidad del lote B.....	66

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Esquema del proceso de disolución de las formas farmacéuticas sólidas.	5
Figura 2. Aparatos de disolución	9
Figura 3. Estructura química de la Azatioprina.....	16
Figura 4. Metabolismo de la Azatioprina.	19
Figura 5.- Resumen de la metodología.	24
Figura 6. Barrido de la sustancia de referencia a concentración de 11 µg / mL.	41

INDICE DE GRAFICOS.

Gráfico 1. Regresión lineal, para determinar la linealidad del sistema.	42
Gráfico 2. Regresión lineal, para determinar la linealidad del método del producto de referencia.....	46
Gráfico 3. Regresión lineal, para determinar la linealidad del método del producto de prueba (Lote A).....	47
Gráfico 4. Regresión lineal, para determinar la linealidad del método del producto de prueba (Lote B).....	48
Gráfico 5. Regresión lineal, para determinar la linealidad del método del producto de prueba (Lote C).	49
Gráfico 6. Perfil de disolución de los 12 vasos del producto de referencia.....	55
Gráfico 7. Perfil de disolución promedio de los 12 vasos del producto de referencia... ..	55
Gráfico 8. Perfil de disolución de los 12 vasos del producto de prueba (Lote A).....	56
Gráfico 9. Perfil de disolución promedio de los 12 vasos del producto de prueba (Lote A).....	57
Gráfico 10. Perfil de disolución de los 12 vasos del producto de prueba (Lote B).....	58
Gráfico 11. Perfil de disolución promedio de los 12 vasos del producto de prueba (Lote B).....	58
Gráfico 12. Perfil de disolución de los 12 vasos del producto de prueba (Lote C).....	59
Gráfico 13. Perfil de disolución promedio de los 12 vasos del producto de prueba (Lote C).....	60
Gráfico 14. Comparación de perfil del producto de referencia con el producto de prueba (Lote A).....	61
Gráfico 15. Comparación de perfil del producto de referencia con el producto de prueba (Lote B).....	61
Gráfico 16. Comparación de perfil del producto de referencia con el producto de prueba (Lote C).....	62
Gráfico 17.- Perfiles del lote B , sometidos a estabilidad acelerada 1mes y 3 meses. .	64
Gráfico 18.- Perfiles del lote B , sometidos a estabilidad acelerada 1mes y 3 meses. .	67

INDICE DE ANEXOS.

Anexo 1.- Tabla para cálculo del valor de aceptación.	69
Anexo 2. Cromatograma de la Sustancia de referencia de Azatioprina solución stock.	70
Anexo 3. Cromatograma del producto de referencia (IMURAN).....	70
Anexo 4. Cromatograma del producto de prueba 1 (Lote A).	71
Anexo 5. Cromatograma del producto de prueba 2 (Lote B).	71
Anexo 6. Cromatograma del producto de prueba 3 (Lote C).....	71

LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS.

%AZA	Porcentaje de Azatioprina
%CV	Porcentaje del coeficiente de variación
%DAC	Porcentaje de diferencia absoluta de la concentración
%DA	Porcentaje de diferencia absoluta
%Dis	Porcentaje de disolución
%Diferencia	Porcentaje de diferencia
%ERDR	Porcentaje del error relativo debido a la regresión
%HR	Porcentaje de humedad relativa
%Retenido	Porcentaje retenido
[AZA]	Concentración de Azatioprina
°C	Grados Celsius
6-MMP	6-metilmercaptopurina inactiva
6-MMPR	6-metilmercaptopurina activa
6-MP	6- mercaptomurina
6-TGNS	Nucleótidos de tioguanina
6-TIMP	6-tioiosina monofosfato
6-tioITP	6-tio-iosina trifosfato
6-TU	Ácido 6-tiourico
ADN	Acido desoxirribonucleico
AO/XO	Xantina oxidasa
AZA	Azatioprina
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección de Riesgos Sanitarios

EMA	Agencia Europea de Medicamentos
F2	Factor de similitud 2
FDA	Food and Drug Administration
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
GMPS	Guanina monofosfato sintetasa
HPLC	High performance liquid chromatography
HPRT	Hipoxantina guanina fosforibosil transferasa
ICH	International Conference on Harmonisation
IMPDH	Iosina monofosfato deshidrogenasa
INVIC	Correlacion in vivo- in vitro
ITPasa	Iosina trifosfato pirofosfatasa
K	Constante de aceptabilidad
L1	Máximo valor de aceptación permitido
LADME	Liberación, Administración, Distribución, Metabolismo y Excreción.
LT	Linfocitos T
LIC	Límite Inferior de Cuantificación
LSC	Límite Superior de Cuantificación
MCA	Muestra Control Alta
MCB	Muestra Control Baja
MCM	Muestra Control Media
MGA	Método General de Análisis
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
Q	Prueba de Q (% Dis)
SCB	Sistema de Clasificación Biofarmacéutico
TPMT	Tiopurina s- metiltransferasa

USP	United States Pharmacopeia
VA	Valor de aceptación
λ	Longitud de onda
μL	Microlitros
rpm	Revoluciones por minuto
Stock	Solución stock de la sustancia de referencia
Stock_m	Solución stock de la muestra
Pág.	Página



1.0 INTRODUCCIÓN.^{1,16,20}

La Biofarmacia y farmacocinética constituyen las ramas de la farmacología que estudian los procesos de liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción (LADME), es decir, todos los procesos que puede sufrir un fármaco cuando se administra un medicamento a un organismo.

La Biofarmacia se encarga de estudiar los factores que interfieren en la liberación del fármaco desde la forma de dosificación que lo contiene, incluyendo su disolución, como paso previo a ser absorbido. Dichos factores pueden ser el tamaño de partícula del fármaco, su solubilidad, la formulación del medicamento o su técnica de elaboración.

En la actualidad esta ciencia es de gran importancia en nuestro país; ya que existe gran interés en el desarrollo de nuevas formulaciones de medicamentos genéricos, los cuales deben demostrar ante las autoridades sanitarias que son capaces de aportar la misma cantidad de principio activo que el producto de referencia. Para ello se requieren realizar estudios tanto in vitro como in vivo para demostrar que el medicamento genérico cumple con los parámetros que impone el de referencia.

Las instituciones que se encargan de realizar dichos estudios (Terceros Autorizados), deben trabajar bajo la normatividad vigente aprobada por la Secretaría de Salud, la cual ejerce control sanitario a través de la COFEPRIS, está a su vez dispone los requisitos que requiere un medicamento genérico para obtener un registro sanitario y pueda salir a la venta.

Para la comparación de perfiles de disolución la NOM-177-SSA1-2013 establece calcular el factor de similitud (F2); y en el caso de un medicamento de rápida liberación (% Dis de 85% a los 30 min) si este valor es mayor a 50, se considera equivalente con el medicamento de referencia.



Las tabletas de Azatioprina 50 mg, son una presentación que actualmente se distribuye en México por 5 laboratorios, bajo el nombre comercial de Aseroprim, Azatrim, Imuran, Satedon y Tiosalprin. Siendo el Imuran el medicamento de referencia de acuerdo a la lista de medicamentos de la COFEPRIS.

La Azatioprina, es un fármaco con propiedades inmunosupresoras, de acuerdo al SCB se clasifica como un fármaco de clase IV de baja solubilidad y baja permeabilidad; esta característica no lo hace candidato a bioexención por perfiles de disolución (in vitro), éste requiere de una prueba tipo C (in vivo) para demostrar que es un producto bioequivalente. Sin embargo realizar el perfil de disolución sirve como control de calidad del medicamento. En este caso los perfiles serán realizados para verificar que las formulaciones estudiadas son equivalentes con el producto de referencia y además conservan sus propiedades de disolución después de ser sometidos a pruebas de estabilidad acelerada.

Con base en lo anterior se realizó el siguiente estudio cuyos objetivos son los siguientes:



2.0 OBJETIVOS.

- 1) Desarrollar y validar una metodología analítica que cumpla con los requisitos establecidos en la NOM-177-SSA1-2013 para evaluar los perfiles de disolución de tabletas de 50 mg de Azatioprina.
- 2) Evaluar mediante perfiles de disolución y cálculo de F2, que los lotes (A B y C) de tabletas de Aozatioprina 50 mg elaboradas por el LABORATORIO X, han sido formuladas de tal forma que son equivalentes con el producto de referencia.
- 3) Evaluar por medio de perfiles de disolución y cálculo de F2, que los lotes (A, B y C) conservan sus propiedades de disolución después de ser sometidos a pruebas de estabilidad acelerada.
- 4) Realizar el control farmacéutico de: variación de masa, valoración y prueba de disolución, del producto de referencia y los lotes a evaluar de acuerdo a la FEUM.



3.0 MARCO TEÓRICO.

3.1 DISOLUCIÓN.¹⁷

Cuando un comprimido u otra forma farmacéutica sólida se introduce en un vaso con medio de disolución o en el tracto gastrointestinal, el fármaco pasa de la forma farmacéutica al medio de disolución, formando así una solución.

Cuando el comprimido es polimérico, la matriz sólida se desintegra formando un granulado, estos gránulos se disgregan y a su vez forman partículas finas. La desintegración, disgregación y la disolución pueden ocurrir de manera simultánea.

3.2 PROCESO DE DISOLUCIÓN.²¹

Las características físicas de una forma farmacéutica, influyen en la liberación del fármaco, Wagner y Carsten proponen un esquema del proceso de disolución, que consta de las siguientes etapas:

- 1) Humectación de la forma de dosificación.
- 2) Penetración del medio de disolución en forma de dosificación
- 3) Desintegración.
- 4) Disgregación.
- 5) Disolución del fármaco.

La humectación es la etapa donde la forma farmacéutica sólida, controla el acceso de los líquidos. La presencia de aire en el medio de disolución, genera burbujas de aire que al quedar atrapadas en los poros de la tableta impiden y disminuyen la disolución del fármaco.

Posterior a esto el comprimido se desintegra en gránulos o agregados, aquí las características de su formulación juegan un papel importante en la de penetración del medio para el proceso de disgregación. Los lubricantes hidrófobos, tales como el estearato de magnesio, retardan la tasa de penetración y por lo tanto, el proceso de disgregación.



Después de producirse la disgregación de las partículas, estas se exponen a los procesos de disolución (Figura 1).



Figura 1. Esquema del proceso de disolución de las formas farmacéuticas sólidas.²¹

3.3 FACTORES QUE AFECTAN LA VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN.²³

La velocidad de disolución se define como la cantidad de sustancia que se disuelve por unidad de tiempo, bajo condiciones controladas de interfase sólido/líquido, temperatura y composición de disolvente y bajo determinadas condiciones hidrodinámicas de agitación.

Los factores que afectan la velocidad de disolución, se pueden dividir en dos rubros, para facilitar su entendimiento se muestra en la tabla 1, los factores de acuerdo a las características inherentes al fármaco y los inherentes a la forma farmacéutica.



Factores que afectan la velocidad de disolución	
Inherentes al fármaco.	Inherentes a la forma farmacéutica.
<p>Polimorfismo.</p> <p>Las estructuras amorfas son mas solubles, al ser menos estables.</p>	<p>Humedad del proceso.</p> <p>Cuanta mayor cantidad de disolvente se involucre en el proceso, mayor será la velocidad de disolución.</p>
<p>Grado de hidratación de la molécula.</p> <p>Las formas anhidras son más solubles que las hidratadas.</p>	<p>Agentes desintegrantes y granulares.</p> <p>La disolución se favorece cuando una formulación contiene mayor concentración de desintegrantes y menor de granulares.</p>
<p>Área superficial o tamaño de partícula.</p> <p>A menor tamaño de partícula, hay mayor área superficial, por lo tanto hay mayor solubilidad.</p>	<p>Métodos de fabricación.</p> <p>Influyen en cómo afecta la formación de porosidad, y dureza de la forma farmacéutica. (Compresión directa, vía húmeda ó seca)</p>
<p>Estado químico del fármaco.</p> <p>Los fármacos como sales suelen ser más solubles. Y de acuerdo a su pH los ácidos son solubles en un medio básico y viceversa.</p>	<p>Fuerza de compresión del proceso de fabricación.</p> <p>A mayor fuerza de compresión, menor porosidad y mayor tiempo de humectabilidad, esto tiene como consecuencia que se retrase la velocidad de disolución.</p>

Tabla 1. Factores que afectan la velocidad de disolución.²³



3.4 IMPORTANCIA DE LA DISOLUCION PARA EL EFECTO TERAPEUTICO.^{17,21}

La velocidad con la que se disuelve el fármaco juega un papel importante en la eficacia de un comprimido, ya que una vez que el fármaco que contiene se encuentra disuelto, este se absorbe a través de la membrana gastrointestinal para llegar a circulación sistémica y así distribuirse en el organismo para llegar al sitio de acción y lograr su efecto terapéutico. El proceso de absorción no solo está limitado por la velocidad de disolución del fármaco, también está limitado por el transporte que requiere la molécula para atravesar la membrana gastrointestinal. De acuerdo a la solubilidad del fármaco se observan dos situaciones.

- 1) Cuando se tienen fármacos muy solubles en agua, estos tienden a disolverse rápidamente, haciendo que la difusión pasiva o el transporte activo sea la etapa limitante de la absorción del fármaco a través de la membrana gastrointestinal.
- 2) Cuando se tienen fármacos poco solubles en agua, se disuelven lentamente, por lo tanto la velocidad de absorción estará limitada por la velocidad de disolución del fármaco sin disolver.

3.5 PERFILES DE DISOLUCION.^{4,12,26}

Los perfiles de disolución permiten evaluar la velocidad en que una forma farmacéutica sólida, libera el principio activo en el medio de disolución, bajo condiciones de temperatura y composición del medio de disolución.

En 1970 estos estudios fueron reconocidos oficialmente como indicador de calidad y fueron incorporados a la Farmacopea de Estados Unidos (USP).



Hasta la fecha, son empleados como herramienta de análisis ante las agencias regulatorias, para proveer una conexión de calidad, por esta razón, el desarrollo y la validación, son factores críticos para asegurar que estos ensayos son robustos.

Debido que la liberación y absorción de un fármaco son pasos críticos para el éxito terapéutico, la disolución in vitro ha sido una prueba relevante para la predicción del rendimiento in vivo. Sin embargo los perfiles de disolución también tienen las siguientes aplicaciones en la industria farmacéutica:

- 1) Evaluar la calidad de un producto medicinal lote a lote.
- 2) Guiar el desarrollo de nuevas formulaciones.
- 3) Asegurar la calidad y el rendimiento de un producto después de cambios en la formulación, el proceso de fabricación, el sitio de fabricación y/o el aumento en escala del proceso de fabricación.

3.6 APARATOS PARA EVALUAR LOS PERFILES DE DISOLUCION.^{4,12,22}

Existen siete aparatos para realizar estudios de disolución, pero los más empleados en la FEUM son los aparatos 1 (canastillas) y 2(paletas).

3.6.1 Aparato 1 (canastilla).

Este aparato consta de un baño de agua, o en su caso camisas de calentamiento, las cuales rodean a seis unidades de prueba, cada una está constituida por:

- Un vaso cilíndrico de fondo semiesférico.
- Un eje transmisor.
- Un regulador de velocidad de rotación.
- Una canastilla.

Los vasos son de vidrio u otro material transparente de forma cilíndrica con capacidad para 1000 mL y con una tapa ajustada que retarde la evaporación y permita la inserción de un termómetro.



El vaso se sumerge en un baño de agua, o camisa de calentamiento los cuales deben mantener la temperatura del interior del vaso a 37 ± 0.5 °C. El eje transmisor, debe ser de acero inoxidable con una canastilla cilíndrica, de giro suave y sin bamboleo, ubicado al centro del vaso.

Esencialmente consta de una canastilla de 20,2 mm de diámetro y 37,0 mm hecha de acero inoxidable, la cesta es de alambre. Y que puede girar a una velocidad constante entre 25 y 150 rpm (Figura 2).

3.6.2 Aparato 2 (paletas).

Fue desarrollado originalmente por Poole (1969) y fue refinado por científicos de la FDA para el análisis de fármacos.

Contiene los mismos componentes que el aparato 1, excepto que en lugar de la canastilla, usa una paleta compuesta por un aspa y un eje como elemento de agitación. La FEUM especifica que la paleta debe girar suavemente sin oscilación significativa. Los contornos de la hoja de la paleta no deben incluir bordes afilados en las puntas, que puedan producir turbulencia en lugar de los patrones de flujo laminar (Figura 2).

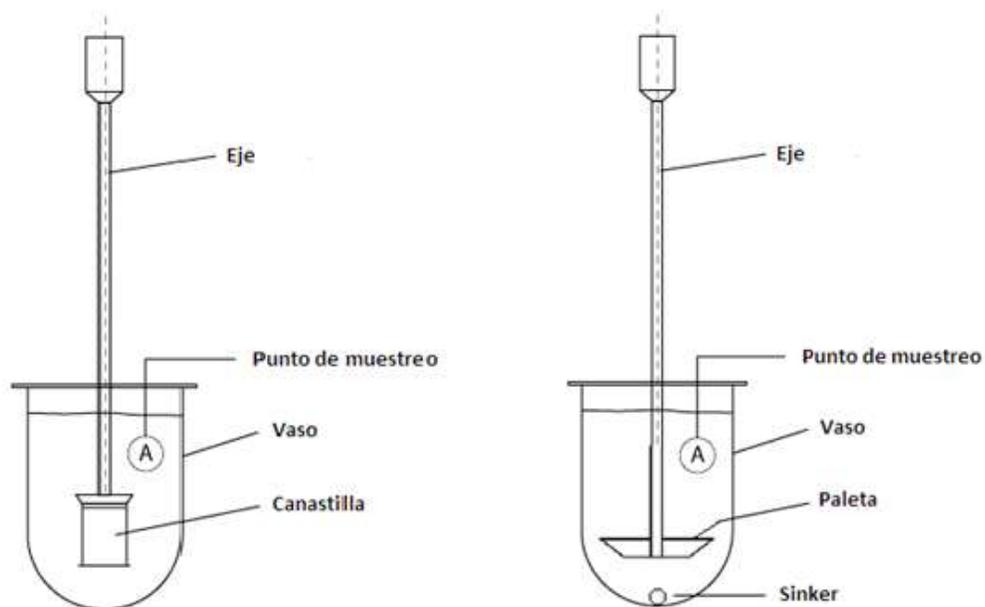


Figura 2. Aparatos de disolución, Aparato I izquierda. Aparato II derecha.²⁶



3.7 CONDICIONES DE LOS PERFILES DE DISOLUCION.^{4,26.}

Estos ensayos deben realizarse bajo condiciones que simulen adecuadamente las condiciones fisiológicas tras la administración oral de una forma farmacéutica sólida, en cuanto a pH, temperatura y movilidad gastrointestinal.

El tracto gastrointestinal actúa de tal forma que el fármaco en la forma farmacéutica es diluido y absorbido mientras se disuelve, por tal razón es importante emplear la cantidad suficiente de medio, al menos tres veces mayor que el volumen de saturación del fármaco. Esto tiene como fundamento la ecuación de Noyes- Nest- Burner, que expresa las condiciones sink como:

$$C_{sat} \gg C_{sol} \quad \therefore \quad C_{sat} - C_{sol} \approx C_{sol}$$

El volumen del medio es de 500, 900 ó 1000 mL, pH de medio de acuerdo a la monografía de la farmacopea y temperatura de 37 ± 0.5 ° C y bajo condiciones adecuadas de desgasificación del medio, de lo contrario puede generar resultados poco confiables.

3.8 COMPARACION DE LOS PERFILES DE DISOLUCION.^{10,12,13,20,29.}

Las diferentes normativas de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y la Food and Drug Administration (FDA) marcan los criterios estadísticos que permiten establecer la similitud entre las formulaciones.

La comparación de los perfiles de disolución entre productos se determina mediante el cálculo del factor de similitud (F2):

$$F2 = 50 * \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - P_t) \right]^{-0.5} * 100 \right\}$$

Donde:

n = número de tiempos de muestreo.

R_t = porcentaje disuelto promedio en el tiempo t del medicamento de referencia.

P_t = porcentaje disuelto promedio en el tiempo t del medicamento de prueba.



De acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013, se deben graficar los porcentajes disueltos promedio en cada uno de los medios de disolución. 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, es posible comparar los perfiles de disolución usando el F2 definido.

Para el cálculo se debe considerar hasta máximo un tiempo de muestreo después de que el medicamento de referencia ha alcanzado el 85% del fármaco disuelto, deben ser un mínimo de 3 puntos, si el valor $F2 \geq 50$ (50 a 100) asegura la similitud o equivalencia entre las dos curvas, en el medio.

3.9 SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA.^{14 21,24,30,31.}

El sistema de clasificación biofarmacéutica (SCB), fue publicado en 1955 por Gordon Amidon, quien propone clasificar los fármacos en cuatro categorías de acuerdo a dos factores importantes que afectan su proceso de absorción, que son la solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal. A continuación se muestra la clasificación de los fármacos de acuerdo a dichos criterios:

Clase	Solubilidad	Permeabilidad
I	Alta	Alta
II	Baja	Alta
III	Alta	Baja
IV	Baja	Baja

Tabla 2. Sistema de Clasificación Biofarmacéutica²⁴



Actualmente el SCB toma en cuenta tres factores que rigen la tasa y la magnitud de la absorción de fármacos, que son: (1) solubilidad, (2) permeabilidad intestinal y (3) disolución. Los parámetros para clasificar a un fármaco de alta o baja, solubilidad o permeabilidad se establecen en la guía de la FDA y en el Anexo 8 de la OMS.^{13,14,30.}

3.9.1 Solubilidad.

Un fármaco es de alta solubilidad, cuando la cantidad de fármaco de la dosis más alta, es soluble en 250 mL o menos del medio acuoso, y en un intervalo de pH de 1.2 a 6.8 de acuerdo a la OMS y de 1.0 a 7.5 según la FDA.

3.9.2 Permeabilidad.

Un fármaco es altamente permeable, si la cantidad absorbida en humanos es mayor a 85 % de acuerdo a la OMS y en más de 90 % de acuerdo a la FDA.

Estas propiedades junto con la disolución, modulan la velocidad y cantidad absorbida del principio activo a partir de formas farmacéuticas sólidas de administración oral.

3.9.3 Disolución.

De acuerdo a la guía de la FDA se considera que un producto se puede clasificar de dos formas de acuerdo a su velocidad de disolución, de rápida disolución y muy rápida disolución.

Rápida disolución: se considera como tal, cuando no menos del 85% de la cantidad marcada de fármaco se ha disuelto a los 30 minutos, a una temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, y valores de pH 1.2, 4.5 y 6.8 empleando el Aparato I (canastillas) de la Farmacopea de Estados Unidos USP a 100 rpm ó en el Aparato II (paletas) de la USP a 50 rpm.



Muy rápida disolución: se considera como tal, si no menos del 85% de la cantidad marcada de fármaco se ha disuelto a los 15 minutos, a una temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5$, y valores de pH 1.2, 4.5 y 6.8, empleando el Aparato II de la USP a 50 rpm ó en el Aparato I de la USP a 100 rpm.

3.10 BIOEXENCIÓN.^{30.}

La bioexención, hace referencia a un conjunto de criterios que permiten a un fármaco en una forma farmacéutica, ser exento de los estudios de bioequivalencia, mediante un estudio comparativo de perfiles de disolución in vitro el cual sustituye a las pruebas in vivo. Esto permite disminuir el tiempo de desarrollo de nuevos productos así como la exposición innecesaria de voluntarios sanos en fase clínica.

3.11 IMPORTANCIA DE LA BIOEXENCIÓN.^{13,14.}

En la actualidad millones de pacientes en el mundo no tienen acceso a los medicamentos para tratar sus padecimientos, ya sea por su alto costo, por la falta de profesionales o servicios para su prescripción, falta de dispensación, o por vivir en lugares apartados.

La OMS considera que el acceso a los medicamentos es un derecho de salud fundamental para el ser humano, por tal razón la fabricación de medicamentos genéricos ha ido en aumento, como una solución que permita garantizar a la población el acceso a medicamentos en un menor tiempo.

3.12 CRITERIOS DE BIOEXENCIÓN DE ACUERDO A LA FDA.^{12.}

Los criterios establecidos por la FDA están basados en el SCB, para fármacos que pertenecen a la clase I y clase III como formas de dosificación oral sólidas y de liberación inmediata.



Para productos farmacéuticos de clase I de SCB, se debe demostrar lo siguiente:

- La sustancia fármaco es muy soluble
- La sustancia fármaco es altamente permeable.
- El fármaco (prueba y referencia) se disuelve rápidamente.
- El producto no contiene ningún excipiente que afecte la velocidad o el grado de absorción del fármaco.

Para productos farmacéuticos de clase III del SCB, debe demostrar lo siguiente:

- La sustancia fármaco es muy soluble
- El fármaco (prueba y referencia) se disuelven muy rápidamente.
- La formulación del producto de ensayo es cualitativamente igual y cuantitativamente muy similar al de referencia.

3.13 PRUEBAS DE INTERCAMBIABILIDAD DE ACUERDO A COFEPRIS.⁵

Los criterios que toma en cuenta la COFEPRIS son más amplios, ya que no solo toma en cuenta al sistema SCB, si no otros criterios. En la (Tabla 3) se describen dichos criterios para asignar el tipo de prueba de intercambiabilidad para un determinado medicamento.

En caso de no existir información suficiente de un medicamento, debidamente acreditada en publicaciones internacionales, se deberá en todos los casos realizar la prueba de Bioequivalencia (in vivo).

Las pruebas para demostrar la intercambiabilidad de los medicamentos genéricos, se deben llevar a cabo según lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable y a los cuales deben sujetarse los terceros autorizados que realicen la prueba, vigente.



CRITERIO	DESCRIPCIÓN DEL CRITERIO	TIPO DE PRUEBA	CARACTERÍSTICAS DE LOS MEDICAMENTOS.
I	Medicamentos que no requieren someterse a pruebas de disolución o de bioequivalencia.	A	Esta prueba aplica a soluciones acuosas de uso parenteral, gases, tópicos de uso no sistémico, medicamentos para inhalación cuyo tamaño de partícula sea igual al innovador.
II	Medicamentos sólidos orales, que deberán someterse a pruebas de perfil de disolución y exentar la de bioequivalencia siempre y cuando demuestren tener una alta solubilidad.	B	Esta prueba aplicará para medicamentos sólidos orales de rápida liberación, que aparecen en el catalogo de medicamentos genéricos, donde se señala el producto de referencia designado.
III	Medicamentos que deberán ser sometidos a pruebas de bioequivalencia.	C	Para designar los medicamentos para esta prueba se seguirán 5 criterios: 1) Forma farmacéutica (liberación inmediata, modificada, rectales, vaginales, transdérmicas, en suspensión emulsión o combinación de activos) 2) Margen terapéutico estrecho. Que la concentración terapéutica y toxica se encuentren cercanas. 3) Grupo terapéutico. (Antibiótico, hormonal, antineoplásico, cardiotónico, antiepiléptico, inmunosupresor, virostático, e hipoglucemiante.) 4) Farmacocinética. No lineal, baja absorción, alto metabolismo del primer paso, vías metabólicas combinadas. 5) Fisicoquímica. Baja solubilidad, con polimorfismo o altamente inestable.

Tabla 3. Criterios que establece COFEPRIS para las pruebas de intercambiabilidad de medicamentos ⁵.



3.14 AZATIOPRINA.^{2,3,7,11.}

La Azatioprina, es un fármaco con propiedades inmunosupresoras. Químicamente es un derivado imidazólico de la 6-mercaptopurina (6-MP) y un análogo de las purinas endógenas adenina, guanina e hipoxantina.

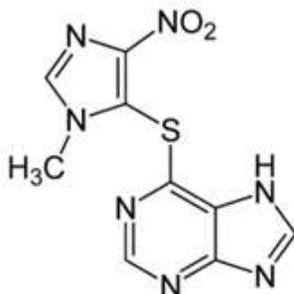


Figura 3. Estructura química de la Azatioprina.

3.14.1 Propiedades fisicoquímicas^{31.}

- Fórmula química: $C_9H_7N_7O_2S$
- Nombre IUPAC: 6-(3-metil-5-nitroimidazol-4-yl) sulfanil-7H-purina.
- Masa molar: 277.26 g/ mol
- Apariencia: Polvo fino color amarillo claro.
- Punto de fusión: 243–244 °C
- pKa: 8.2
- Longitud de onda máxima: $\lambda_{max} = 280 \text{ nm}$
- Valor $E_{1cm}^{1\%}$ 630-660 a una $\lambda_{max} = 280 \text{ nm}$, en agua como medio de disolución.
- Solubilidad: Ligeramente soluble en alcohol, prácticamente insoluble en agua.

3.14.2 Mecanismo de acción.^{3, 28.}

La Azatioprina, ha sido empleada en la práctica clínica por más de 50 años, y aun no se conoce con precisión su mecanismo. Algunos mecanismos sugeridos son:

1. Que la 6-MP liberada, actúa como antimetabolito purínico.
2. Que actúa como agente de bloqueo de grupos tiol (–SH) mediante alquilación.
3. La posible inhibición de las vías de biosíntesis del ácido nucleico, de este modo se evita la proliferación de las células involucradas en la determinación y amplificación de la respuesta inmune (linfocitos B y T).



4. El daño al ácido desoxirribonucleico (ADN) mediante la incorporación de tioanálogos purínicos.

Siendo este último, el mecanismo más aceptado desde el punto de vista farmacológico, ya que la Azatioprina es considerada un fármaco antagonista de las purinas endógenas que interfiere en la fase S del ciclo celular.

Aunado a esto, se ha demostrado que la Azatioprina, altera la síntesis de purina en los linfocitos T, disminuyendo su proliferación y síntesis de los compuestos que desencadenan su activación (IL-2)

Por otra parte se ha demostrado que la Azatioprina como la 6-MP determinan la apoptosis de los LT, la cual es ocasionada por la interacción inhibitoria de un metabolito de la Azatioprina (la 6-tioGTP) con Rac-1, esta interacción convierte la señal coestimuladora de CD28 en una señal apoptótica.

Además de los efectos sobre la replicación del DNA, la AZA ha demostrado reducir, de manera reversible y dosis dependiente, el número de monocitos circulantes.

3.14.3 Indicaciones terapéuticas y dosis.³

La Azatioprina se usa en combinación con otros agentes inmunosupresores, para la prevención del rechazo después de trasplantes alogénicos de riñón, hígado, corazón pulmón o páncreas.

Está indicada en combinación con glucocorticoides en formas de evolución de las siguientes enfermedades:

- Artritis reumatoide.
- Enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.
- Hepatitis autoinmune.
- Lupus eritematoso sistémico.
- Psoriasis.
- Pénfigo vulgar y pénfigo bulloso.
- Anemia hemolítica autoinmune.
- Purpura trombocitopenica idiopática refractaria crónica.

3.14.4 Reacciones adversas.³

El principal efecto tóxico de la Azatioprina es la mielosupresión (anemia macrocítica, leucopenia y trombocitopenia), desapareciendo en su mayoría al reducir la dosis o suspender el tratamiento. Habitualmente existen manifestaciones gastrointestinales, como náuseas, vómitos y dolor epigástrico.



Menos frecuente es la aparición de estomatitis, diarrea, pancreatitis y toxicidad hepática. Sin embargo, ante síntomas severos, el fármaco debe ser inmediatamente suspendido, por el riesgo de estar frente a una reacción de hipersensibilidad.

La hepatotoxicidad se describe de manera aislada; ocurre varias semanas después de iniciada la terapia. Los problemas dermatológicos son más frecuentes en pacientes trasplantados, destacando la alopecia, verrugas, herpes zóster, hiperpigmentación y neoplasias.

3.14.5 Propiedades farmacocinéticas.

3.14.5.1 Absorción y permeabilidad.³

La Azatioprina es rápidamente metabolizada in vivo a 6-MP y una porción a metilnitroimidazol. La 6-MP atraviesa rápidamente las membranas celulares del tracto gastrointestinal y se convierte intracelularmente en numerosos tioanálogos de las purinas, incluyendo su principal nucleótido activo, el ácido tioinosínico.

La tasa de conversión varía de un individuo a otro. Los nucleótidos no atraviesan las membranas celulares. Las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan de 1 a 2 horas después de la toma.

3.14.5.2 Distribución.³

La Azatioprina se distribuye rápidamente en el organismo. La vida media plasmática es de 3 a 5 horas. Solamente el 30 % de la sustancia está unida a proteínas plasmáticas. Algunos estudios realizados en ratones con S- Azatioprina demostraron que no existe ninguna concentración inusual en algún tejido en particular, pero se encontró ³⁵ S en el cerebro. La Azatioprina y sus metabolitos atraviesan el líquido cefalorraquídeo.

3.14.5.3 Metabolismo.^{2,3}

El metabolismo de la AZA es bastante complejo. AZA es convertida rápidamente, de forma no enzimática, por componentes sulfhidrilos ubicuos (cisteína, glutatión, proteínas). El producto de este clivaje resulta en la formación de 6-MP y derivados imidazólicos.



La 6-MP resultante es metabolizada por tres enzimas diferentes: La tiopurina s-metiltransferasa (TPMT) y la xantina oxidasa (XO) determinan la producción de metabolitos inactivos; la hipoxantina fosforibosil transferasa (HPRT) es la encargada de convertir la 6-MP en 6-tioinosina monofosfato; sobre ésta actúa la TPMT, determinando la formación de metabolitos metilados, y la iosina monofosfatato deshidrogenasa (IMPDH), vía crucial en la formación de nucleótidos activos de 6-tioguanina, ácido tioúrico y 6-metil-MP. Estos componentes son incorporados al DNA en estado de replicación, deteniéndose el proceso (Figura 4).

En caso de función hepática disminuida, se modifica el metabolismo de la Azatioprina, la transformación en los metabolitos activo está limitada, pero principalmente está reducida la degradación a metabolitos eliminables.

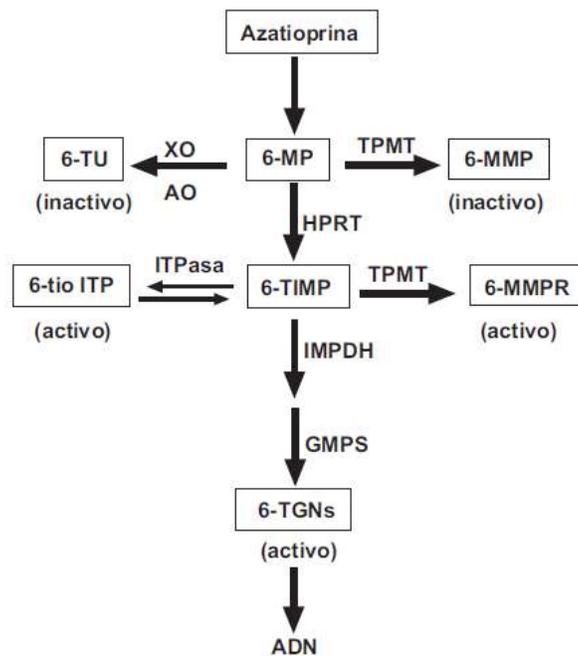


Figura 4. Metabolismo de la Azatioprina.⁷



3.14.5.4 Excreción.³

Independientemente de si se administra directamente o procede de la degradación in vivo de la Azatioprina, la 6-MP se elimina fundamentalmente en forma de metabolito oxidado e inactivo, el ácido tioúrico.

La oxidación se lleva a cabo por la xantina oxidasa, una enzima que se inhibe por el alopurinol. La actividad de la porción metilnitroimidazólica no ha sido definida hasta el momento.

Hasta un 50 % de la dosis es excretada en la orina dentro de las 24 horas de ser administrada, aproximadamente un 10 % de ello en forma inalterada. Solo 12.6 % de la dosis aparece en las heces dentro de las 48 horas. No hay indicio de circuito enterohepático. En pacientes con función renal limitada puede ser necesario reducir la dosis, dado que está reducida la eliminación de los metabolitos activos.

3.15 VALIDACIÓN.^{8,9,18,20}

Se define como el proceso que permite confirmar mediante un examen y provisión de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso propuesto.

Todos los métodos analíticos empleados para evaluar que los productos farmacéuticos cumplen los requisitos de seguridad, calidad y eficacia, deben ser validados para asegurar que los resultados son confiables.

En el caso de la regulación mexicana, estos los parámetros a evaluar del método analítico se establecen en la NOM-177-SSA1-2013 y estos son congruentes con los que solicita la FEUM.



3.16 PARAMETROS A EVALUAR EN LA VALIDACION, DE ACUERDO A LA NOM-177-SSA1-2013.²⁰

La NOM-177-SSA1-2013 establece los parámetros y valores que se deben de cumplir en la validación de método analítico con el fin de asegurar que la cuantificación del fármaco es confiable (Tabla 4).

Validación	Parámetro	Forma de cálculo	Criterio de aceptación
Sistema	➤ Linealidad	Se calcula por mínimos cuadrados m,b y r.	$r \geq 0.99$ $\%ERDR \leq al 2 \%$
	➤ Precisión	Se calcula el % CV del Factor respuesta (F=Abs/ Concentración)	$\%CV \leq al 2 \%$
	➤ Estabilidad	Se calcula la diferencia absoluta de la retención del fármaco (DA)	$\%DA \leq al 3 \%$
	➤ Influencia del filtro	Se calcula la diferencia absoluta de la retención del fármaco (DA)	$\%Retención \leq al 2 \%$
Método	➤ Linealidad	Se calcula por mínimos cuadrados m,b y r.	$r \geq 0.99$ $\%ERDR \leq al 3 \%$
	➤ Exactitud	Se calcula la diferencia absoluta de la concentración recuperada (DAC)	$\%DAC \leq al 2 \%$ (para cada punto de la curva)
	➤ Precisión ✓ Repetibilidad ✓ Reproducibilidad	✓ Se calcula el %CV de las curvas de un mismo día. ✓ Se calcula el % CV de concentración extrapolada (Cext=Abs-b/m)	$\%CV \leq al 3 \%$ $\%CV \leq al 3 \%$

Tabla 4. Parámetros y valores para la validación²⁰.



3.17 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD.^{19,21}

Los estudios de estabilidad para fármacos, medicamentos o remedios herbolarios, son una serie de ensayos, cuyos resultados permiten establecer su periodo de validez en su envase original, y bajo condiciones de almacenamiento que correspondan a la zona climática del país. El periodo de validez es el intervalo de tiempo donde las características de un medicamento se alteran, pero dentro de límites que no alteren su calidad.

La Organización mundial de la Salud establece que existen 4 zonas climáticas en el mundo:

- Zona I clima templado
- Zona II subtropical con posible humedad elevada
- Zona III clima caliente y seco
- Zona IV clima caliente y húmedo

La correspondiente a la República Mexicana, es la Zona Climática II (subtropical, con posible humedad elevada), y en la cual se basan las pruebas que establece la NOM-073-SSA1-2013 de estabilidad de medicamentos.

3.18 TIPOS DE ESTUDIOS DE ESTABILIDAD.¹⁹

Las condiciones del estudio y duración deben ser suficientes para cubrir el almacenamiento, distribución y uso del medicamento o del remedio herbolario; aplicar cualquiera de las condiciones siguientes:

Tipo de estudio	Condiciones de almacenamiento	Periodo mínimo	Frecuencia de análisis
Estabilidad acelerada	40 °C ± 2°C/75%±5% HR	3 meses	0,1 y 3 meses
Estabilidad a condición intermedia	30 °C ± 2°C/65%±5% HR	6 meses	0,3 y 6 meses
Estabilidad a largo plazo	25°C ± 2°C/60%±5% HR o 30 °C ± 2°C/65%±5% HR	12 meses	0, 3, 6, 9 y 12 meses

Tabla 5. Estudios de estabilidad.¹⁹



3.19 CRITERIOS PARA CONSIDERAR UN MEDICAMENTO ESTABLE, MEDIANTE PERFILES DE DISOLUCIÓN.¹⁹

Se consideran cambios significativos durante la estabilidad acelerada para perfiles de disolución: Cuando haya un cambio significativo en los límites de especificación de disolución para 12 unidades de dosificación, de acuerdo a la forma farmacéutica.



4.0 METODOLOGÍA.

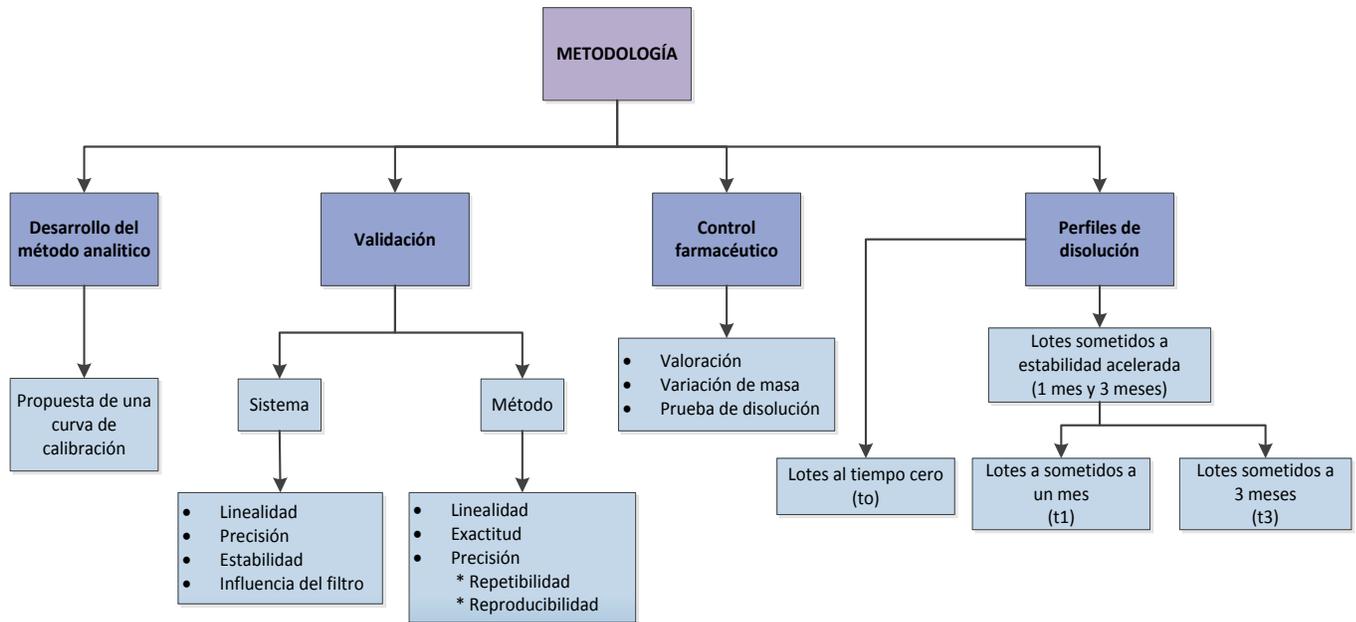


Figura 5.- Resumen de la metodología.

4.1 Reactivos.

- Heptanosulfonato de sodio.
- Metanol
- HCl
- Hidróxido de amonio
- Azatioprina Sref (99.06 %)
- Tabletas de Azatioprina
- Membranas de celulosa 0.45 micrometros
- Agua destilada (pH=6.6 -7.0)
- Agua desionizada (Milly Q).



4.2 Materiales.

- Matraces volumétricos de 10, 20, 25, 50, 100 mL
- Vasos de precipitados de 25, 50, 100, 250 mL
- Probeta de plástico de 1000 ml
- Tubos de ensayo de 13X100 mm
- Espátula
- Pinzas de metal
- Navecilla de pesar
- Tubos de centrifuga 15 mL
- Jeringas de plástico de 10 mL
- Filtros de teflón de 0.45 μm
- Puntas para pipeta automática de 5000 μL
- Pipeta automática de 5000 μL
- Dispensador de agua.

4.3 Equipos.

- Balanza analítica Sartorius Praxum
- Potenciómetro pH 210
- Sonificador Transsonic 700/H
- Termómetro calibrado Evolution 60
- Cronómetro
- Espectrofotómetro Thermo Scientific
- Disolutor TDT 08L (Calificado 16OCT15)
- HPLC Agilent 1100 Series



4.4 DESARROLLO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AZATIOPRINA.

Para el desarrollo de esta metodología se tomaron en cuenta las recomendaciones que especifican la FEUM y la NOM-177-SSA1-2013 para validación de métodos analíticos, los cuales se muestran en la tabla 6, dichos criterios se adaptaron al procedimiento de la prueba de disolución que establece la monografía de la FEUM 11ª edición para tabletas de Azatioprina.

Referencia	Criterios
FEUM (Apéndice III. Variación de métodos analíticos)	Pruebas de disolución: El intervalo de linealidad debe comprender desde un 5% hasta un 110 % de lo declarado en el marbete.
NOM-177-SSA1-2013	LIC: La concentración más baja del analito que puede cuantificarse cumpliendo precisión y exactitud. MCB: Concentración del analito, equivalente hasta 3 veces por el LIC. MCM: Es la concentración intermedia entre la MCB y la MCA. MCA: Concentración del analito entre el 75 y 85 % del LSC. LSC: La concentración más alta del analito que puede cuantificarse cumpliendo precisión y exactitud.

Tabla 6.- Recomendaciones para la validación del método analítico^{9,20}.

Para agilizar el procedimiento se utilizó el valor del coeficiente de extinción específica ($E_{1cm}^{1\%}$) proporcionado en el certificado de análisis de la sustancia de referencia para predecir la absorbancia de la Azatioprina en diferentes concentraciones, y con base en ello considerar las concentraciones ideales para de la curva de calibración, de acuerdo al material disponible en el laboratorio.



Parte del procedimiento

Cálculo

1) 55.55 µg/mL de Azatioprina equivale al 100 % de lo que se espera disuelto a los 30 min.

$$\left(\frac{50 \text{ mg AZA}}{900 \text{ mL}}\right) \left(\frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}}\right) = 55.55 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \text{Azatioprina}$$

2) Se realiza una regla de tres para determinar el intervalo que va de un 5 a un 115 % como recomienda la FEUM.

$$\left(\frac{115 \%}{100 \%}\right) \left(\frac{55.55 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \text{Azatioprina}}{1}\right) = 63.88 \mu \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \text{Azatioprina}$$

3) Se realiza una división con el factor de dilución (5) de acuerdo al procedimiento de la prueba de disolución de la FEUM.

$$\frac{63.88 \mu\text{g/mL}}{5} = 12.78 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \text{Azatioprina}$$

4) Se emplea una regla de tres para predecir la Absorbancia con el valor de $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (600 – 660)

$$\left(\frac{12.78 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} * E_{1\text{cm}}^{1\%}}{10,000 \mu\text{g/mL}}\right) = \text{Absorbancia te rica}$$

Tras los cálculos pertinentes y consideración del material disponible en el laboratorio, se llegó a la siguiente propuesta para validar la linealidad, precisión (del sistema) y linealidad y exactitud (del método) de la metodología analítica para la cuantificación de Azatioprina:

Solución	[AZA] µg/mL	Volumen final	Alícuota	Origen alícuota
1	13.2	25	3.00	Stock
2	11.0	25	2.50	Stock
3	8.8	25	2.00	Stock
4	5.0	10	4.50	Solución 2
5	1.0	20	4.00	Solución 4

Tabla 7.- Resumen de la metodología a seguir para elaborar la curva de calibración.

(NOTA: el Stock es de 110µg/mL para el sistema
Stock_m es de 110µg/mL para el método)

Además se validara la estabilidad e influencia del filtro del a cuerdo a la NOM-177-SSA1-2013.



4.5 VALIDACIÓN DEL SISTEMA.^{9,27.}

4.5.1 Linealidad del sistema.

Preparar por duplicado la curva de calibración con la sustancia de referencia de Azatioprina, emplear agua destilada como medio de disolución y leer a una absorbancia de 280 nm (se realiza un barrido del espectro de absorción del compuesto para determinar la longitud de onda de máxima absorción).

Preparación de la solución stock.

Pesar 11 mg del estándar de referencia de Azatioprina, transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 4 mL de metanol y 50 mL de agua, poner en ultrasonido durante 5 min y llevar al aforo con agua. Esta solución tiene una concentración de 110 µg/mL.

Elaboración de la curva de calibración.

A partir de la solución stock tomar las alícuotas correspondientes de acuerdo a la tabla siguiente, para obtener las concentraciones indicadas. Llevar al aforo con agua destilada.

Solución	[AZA] µg/mL	Volumen final	Alícuota	Origen alícuota
1	13.2	25	3.00	Stock
2	11.0	25	2.50	Stock
3	8.8	25	2.00	Stock
4	5.0	10	4.50	Solución 2
5	1.0	20	4.00	Solución 4

Tabla 8. Relación de alícuotas y volúmenes para la preparación de las curvas de calibración.

Cálculos para linealidad del sistema.

Con los datos de absorbancia obtenidos de las curvas de calibración, se calcula el coeficiente de correlación (r^2), pendiente (m) e intercepto (b) para cada curva por el método de mínimos cuadrados, así como el error relativo debido a la regresión (ERDR) con la siguiente fórmula:



$$\% ERDR = S_{y/x,r} = \frac{\left[\frac{\sum y^2 - (m * \sum xy) - (b * \sum y)}{N - 2} \right]^{1/2}}{y_{promedio}} * 100$$

Donde:

$\%ERDR = S_{y/x,r}$ = Error relativo debido a la regresión.

$\sum y^2$ = Suma de absorbancias al cuadrado.

$\sum xy$ = Suma de los productos de la concentración por absorbancia.

$\sum y$ = Suma de absorbancias.

N = Niveles de la curva de calibración.

$y_{promedio}$ = Absorbancia promedio.

Criterio de aceptación: Se debe de cumplir que el coeficiente de correlación sea mayor o igual a 0.99 y el ERDR es menor o igual al 2 %.

4.5.2 Precisión del sistema.

La precisión se evalúa a partir de los datos de absorbancia de las curvas de calibración realizadas por duplicado.

Cálculo para precisión del sistema.

Se debe calcular el factor respuesta por nivel de concentración y el coeficiente de variación global entre ambas curvas.

$$Factor\ de\ respuesta = \frac{Respuesta\ muestra}{Concentración\ muestra}$$

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación global entre dos curvas debe ser menor o igual al 2 % para considerar que el método es preciso.



4.5.3 Influencia del filtro.

Preparar solución stock, a partir de ella preparar dos diluciones, una de concentración baja de 5 µg/mL y otra de concentración alta de 11 µg/mL.

Transferir una alícuota de 2 mL de la solución stock a un matraz de 50 mL, para la concentración de 5 µg/mL y una alícuota de 5 mL a un matraz de 50 mL para la concentración de 11 µg/mL, llevar ambas diluciones al aforo con agua y mezclar.

De cada solución se toma una muestra de 2 mL sin filtrar y 6 alícuotas de 2 mL con ayuda de una jeringa, extensión de plástico y un filtro de teflón de 45 µm. Se determinan las absorbancias a 280 nm, tanto de la solución sin filtrar, como de las soluciones filtradas.

Cálculos para influencia del filtro.

De los datos obtenidos se calcula el porcentaje de Azatioprina retenida en el filtro.

$$\%AZA \text{ retenida} = 100 - \left(\frac{100}{Abs \text{ Muestra sin filtrar}} \right) \left(\frac{Abs \text{ promedio muestras filtradas}}{1} \right)$$

$$\% \text{ Retenido} = \left| \left(\frac{\% AZA \text{ sin filtrar} - \%AZA \text{ filtrada}}{\% AZA \text{ sin filtrar}} \right) \right| * 100$$

Criterio de aceptación: La diferencia absoluta entre el promedio de los datos de por lo menos 6 muestras de solución filtrada y sin filtrar debe ser igual o menor al 2%.

4.5.4 Estabilidad de la muestra.

Con el fin de determinar si en las condiciones de trabajo para obtener los perfiles de disolución, la muestra permanece estable, preparar una solución a una concentración de 11 µg/mL en el medio de disolución. Determinar la absorbancia a longitud de onda máxima, una vez preparada.



La solución se mantiene en tres diferentes condiciones de temperatura 4°C, 25 °C y 37 °C, donde se muestrea por triplicado cada hora, durante 6 horas incluyendo el tiempo cero.

Cálculo para estabilidad de la muestra.

$$\% DA = \left| \left(\frac{Abs\ final - Abs\ inicial}{Abs\ inicial} \right) \right| * 100$$

Criterio de aceptación: La diferencia absoluta (DA) del promedio del porcentaje cuantificado inicial y final debe ser menor al 3%.

4.6 VALIDACIÓN DEL MÉTODO.^{9,27.}

4.6.1 Linealidad del método.

Preparar por triplicado la curva de calibración con el polvo obtenido a partir de las tabletas de Azatioprina, emplear agua como medio de disolución y leer a una absorbancia de 280 nm.

Preparación de la curva de calibración.

Pesar el peso equivalente a 11 mg de Azatioprina del polvo de tabletas de cada producto, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 4 mL de metanol y 50 mL de agua, poner en ultrasonido durante 5 min y llevar al aforo con agua.

Esta solución (Stock_m) tiene una concentración de 110 µg/mL, esperar a que sedimenten los excipientes y filtrar con ayuda de un filtro de teflón de 45 µm; a partir de solución preparar la curva de calibración de acuerdo a la tabla siguiente:



Solución	[AZA] $\mu\text{g/mL}$	Volumen final	Alícuota	Origen alícuota
1	13.2	25	3.00	Stock _m
2	11.0	25	2.50	Stock _m
3	8.8	25	2.00	Stock _m
4	5.0	10	4.50	Solución 2
5	1.0	20	4.00	Solución 4

Tabla 9. Relación de alícuotas y volúmenes para la preparación de las curvas de calibración.

Cálculos para linealidad del método.

Con los datos de absorbencia obtenidos de las curvas de calibración, se calcula la pendiente (m), el intercepto (b) y el coeficiente de correlación (r^2) por mínimos cuadrados, además del ERDR.

Criterio de aceptación: La linealidad del método se demuestra si el coeficiente de correlación es mayor o igual a 0.99 y el ERDR es menor o igual al 3 %.

4.6.2 Precisión del método.

Este involucra dos parámetros repetibilidad y reproducibilidad.

Cálculos para la repetibilidad.

Para cada una de las concentraciones de las curvas de calibración, se calcula el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación en cada punto debe ser menor al 3%.



Cálculos para la reproducibilidad.

Se preparan 3 curvas más en un día diferente, se determina la absorbancia y a partir de estos datos, la concentración extrapolada. Para cada una de las concentraciones se calcula el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

$$\text{Concentración extrapolada} = \frac{y - b}{m}$$

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación global (ambos días) para cada concentración de la curva de calibración, no debe ser mayor al 3 %.

4.6.3 Exactitud del método.

A partir de los datos de reproducibilidad se calcula el promedio de la concentración de recuperación en cada uno de los puntos de la curva, y con estos datos se calcula la diferencia absoluta de la concentración (DAC).

$$\% \text{ DAC} = \left| \frac{\text{Concentración nominal} - \text{Concentración extrapolada}}{\text{Concentración nominal}} \right| * 100$$

Criterio de aceptación: La diferencia absoluta de la concentración, no debe variar en más del 3% con respecto a la cantidad nominal en cada punto.

4.7 CONTROL FARMACEUTICO.^{9,27.}

Se realizaron las pruebas de valoración, uniformidad de masa y prueba de disolución de acuerdo a la monografía de la Azatioprina y el MGA 0299 de la FEUM.

4.7.1 Valoración.

Contiene no menos del 93.0% y no más del 107.0 % de la cantidad de Azatioprina indicada en el marbete.

**Condiciones cromatograficas:**

- Cromatógrafo: Agilent Series 1100
- Detector: UV-VIS SCL 10 A
- Columna: L8
- Fase móvil: Agua:Metanol (70:30) con 1g de Heptanosulfonato.
- Velocidad de flujo: 1.2 mL/min
- Longitud de onda 254 nm
- Volumen de inyección: 10 µL

Preparación de la referencia.

Pesar 12.5 mg de la sustancia de referencia de Azatioprina, pasar a un matraz volumétrico de 25 mL, agregar 10 mL de metanol y 0.25 mL de hidróxido de amonio, agitar y someter a la acción de un baño de ultrasonido durante 2 min, llevar al aforo con metanol y mezclar. Pasar una alícuota de 5 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 25 mL, llevar al aforo con metanol y mezclar. Esta solución contiene 100 µg/ mL aproximadamente de Azatioprina.

Preparación de las muestras.

Pesar por lo menos 20 tabletas de cada producto a evaluar. Calcular su peso promedio y triturar hasta polvo fino, pesar una cantidad del polvo equivalente a 50 mg de Azatioprina, pasar a un matraz volumétrico de 100 mL , agregar 25 mL de metanol y 1.0 mL de hidróxido de amonio agitar y someter a la acción de un baño de ultrasonido durante 2 min, llevar al aforo con metanol y mezclar. Dejar en reposo la solución hasta que los excipientes se sedimenten. Pasar una alícuota de 5 mL del sobrenadante a un matraz volumétrico de 25 mL, llevar al aforo con agua, mezclar y filtrar a través de una membrana de celulosa de 0.45 micrómetros de porosidad.

**Procedimiento.**

Inyectar al cromatógrafo repetidas veces, volúmenes iguales de (10 µL) de la preparación de la referencia y registrar los picos respuesta. La eficiencia de la columna no es menor a 800 platos teóricos, el factor de coe no es mayor a 1.5 y la desviación estándar relativa no es mayor al 2.0 %. Una vez ajustados los parámetros de operación inyectar al cromatógrafo por separado, volúmenes iguales de (10 µl) de la preparación de referencia y de la preparación de la muestra, para obtener sus correspondientes cromatogramas y calcular el área de los picos.

Cálculo para valoración.

$$\%AZA = (C \text{ referencia})(Fd) \left(\frac{\text{Area muestra}}{\text{Area referencia}} \right)$$

$$\% \text{ Diferencia} = \left(\frac{\% \text{ AZA referencia} - \% \text{ AZA muestra}}{\% \text{ AZA referencia}} \right) 100$$

Criterio de aceptación: 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.

4.7.2 Uniformidad de dosis por el método de variación de masa.

Pesar con exactitud 10 tabletas de forma individual. Calcular el porcentaje de Azatioprina en cada una de las tabletas, relacionando el peso obtenido, con el resultado de la valoración y expresarlo en forma de porcentaje, para calcular el valor de aceptación.



Cálculo para variación de masa.

$$\% AZA = \frac{(\text{Peso individual de la tableta} * \% AZA \text{ de la valoración})}{\text{Peso promedio de las tabletas}}$$

Criterio de aceptación: El valor de aceptación debe ser menor al 15 % ($L1 \leq 15$), de acuerdo a la tabla de la FEUM (Anexo 1).

4.7.3 Prueba control de disolución .

Esta prueba se realizó durante la evaluación de los perfiles de disolución, considerando únicamente el dato del porcentaje de disolución (% Dis) al tiempo de 30 min en cada uno de los vasos, como lo establece la monografía de tabletas de Azatioprina de acuerdo a la FEUM.

Criterio de aceptación: Aparato 2, el % Dis debe ser mayor o igual a $75 + 5\%$.



4.8 EVALUACIÓN DE PERFILES DE DISOLUCIÓN.^{9,27.}

Se lleva a cabo la disolución de 12 unidades de dosificación de los productos estudiado. Las condiciones experimentales se presentan en la tabla siguiente.

Aparato de disolución	II (paletas)
Temperatura del medio de disolución	37 °C ± 0.5 °C
Medio de disolución	Agua destilada
Volumen de medio de disolución	900 mL
Velocidad de agitación	50 rpm ± 4 %
Tiempos de muestreo	10, 15, 20, 30, 45 y 60 minutos
Volumen de muestra tomada	5 mL

Tabla 10. Condiciones experimentales empleadas para llevar a cabo el estudio de disolución (NOTA: se considera Q=75%).

Procedimiento.

- 1) Preparar el medio de disolución y degasificar.
- 2) Encender el disolutor y el termociclador. Ajustar la velocidad de agitación de los vástagos a 50 rpm y la temperatura a 37 °C.
- 3) Colocar los vasos vacíos en su respectiva posición y sujetarlos con los seguros de retención.
- 4) Colocar las paletas, bajar el cabezal del disolutor hasta que las paletas toquen el fondo de los vasos, subir el cabezal y colocar el medidor de altura para paletas.
- 5) Con ayuda de una probeta de 1000 mL medir 900 mL de medio de disolución y vaciarlo en cada vaso del disolutor.
- 6) Cuando la temperatura del medio de disolución colocada en cada vaso alcance los 37 ± 0.5 °C, bajar las paletas y tapan los vasos.
- 7) Accionar el controlador de velocidad de agitación de los vástagos.
- 8) Encender el cronómetro al mismo tiempo de colocar una tableta dentro del vaso 1, después de 15 segundos colocar una tableta dentro del vaso 2 y así sucesivamente hasta el vaso 6.



- 9) Retirar una muestra de 5 mL de cada vaso con una jeringa provista de una extensión de plástico y un filtro de teflón, en los tiempos establecidos.
- 10) Realizar una dilución, tomando 2.5 mL de la muestra y llevar a 15 mL con el dispensador al tubo de centrifuga de 15 mL.
- 11) Obtener lecturas de absorbancia de cada una de las muestras en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm, utilizando medio de disolución como blanco de ajuste.
- 12) Realizar el perfil de disolución de cada medicamento con un total de 12 unidades.

Cálculos para el porcentaje de disolución.

Se determina el porcentaje disuelto de cada tableta por cada tiempo de muestreo sin reposición de medio de disolución utilizando las fórmulas siguientes:

Ecuación 1
$$Xi = \frac{Yi - b}{m}$$

Ecuación 2
$$Ei = Xi * Fd * V$$

Ecuación 3
$$Dis = \frac{Xi * Vi * Fd}{1000} + \sum_{i=0}^{N-1} Ei$$

Ecuación 4
$$\%Dis = \frac{Dis}{Dosis} * 100$$

**Donde:**

X_i = Concentración de la muestra ($\mu\text{g/mL}$).

Y_i = Absorbancia.

b = Ordenada al origen de la recta.

m = Pendiente de la recta.

E_i = Cantidad de fármaco tomada en cada alícuota al i -ésimo tiempo de muestreo (mg).

F_d = Factor de dilución (6).

V = Volumen de la alícuota (5 mL).

V_i = Volumen del vaso al i -ésimo tiempo de muestreo.

Dis = Cantidad de fármaco disuelto al i -ésimo t de muestreo (mg).

% Dis = Porcentaje de disolución.

Dosis = 50 mg de Azatioprina que corresponde a la dosis nominal.

4.9 PERFILES DE DISOLUCION PARA LOTES SOMETIDOS A ESTABILIDAD ACELERADA.

Para evaluar el perfil de los lotes sometidos a pruebas de estabilidad acelerada, se emplearon las mismas condiciones descritas anteriormente. Para calcular el valor de F_2 , se empleo el resultado del producto de referencia al tiempo cero, es decir sin ser sometido a dichas pruebas, y empleando 6 unidades por lote, no 12 como lo indica la norma, puesto que el objetivo de la prueba es observar el comportamiento de la formulación de los lotes.



5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AZATIOPRINA.

		E 1%/1cm	600	630	660	
% Dis en el vaso	[AZA] ug/mL	FD	Abs teórica	Abs teórica	Abs teórica	
127.3	70.0	14	0.84	0.88	0.92	
122.7	67.5	13.5	0.81	0.85	0.90	
118.2	65.0	13	0.78	0.82	0.86	LSC
113.6	62.5	12.5	0.75	0.79	0.83	
109.1	60.0	12	0.72	0.76	0.80	
100.0	55.0	11	0.66	0.70	0.73	MCA
90.9	50.0	10	0.6	0.63	0.66	
81.8	45.0	9	0.54	0.57	0.60	
72.7	40.0	8	0.48	0.50	0.53	
63.6	35.0	7	0.42	0.44	0.46	
59.1	32.5	6.5	0.39	0.41	0.43	MCM
54.5	30.0	6	0.36	0.38	0.40	
45.5	25.0	5	0.3	0.32	0.33	
36.4	20.0	4	0.24	0.25	0.26	
27.3	15.0	3	0.18	0.19	0.20	MCB
18.2	10.0	2	0.12	0.13	0.13	
9.1	5.0	1	0.06	0.06	0.07	LIC
5.5	3.0	0.6	0.04	0.04	0.04	

Tabla 11.- Resumen de cálculos para la predicción de las concentraciones para la curva de calibración.

En la tabla 11, se muestran los cálculos que sirvieron como base para elegir las 5 concentraciones que cumplieran con los criterios de LSC, MCA, MCM, MCB y LIC que establece la NOM-177-SSA1-2013 y la FEUM para la validación de métodos analíticos. A partir de esa información los cuales se eligieron las concentraciones de 13.2, 11.0, 8.8, 5.0 y 1.0 µg /mL , las cuales cumplen los requisitos y que además se pueden obtener con el material disponible en el laboratorio.



5.2 VALIDACIÓN DEL SISTEMA.

Barrido de Azatioprina 11 μg / mL.

Como se observa en la (Figura 5) antes de realizar la validación se verificó la longitud de onda máxima para la cuantificación de Azatioprina por espectrofotometría UV es la especificada en la monografía, la cual coincide al observar la λ_{max} a 280 nm.

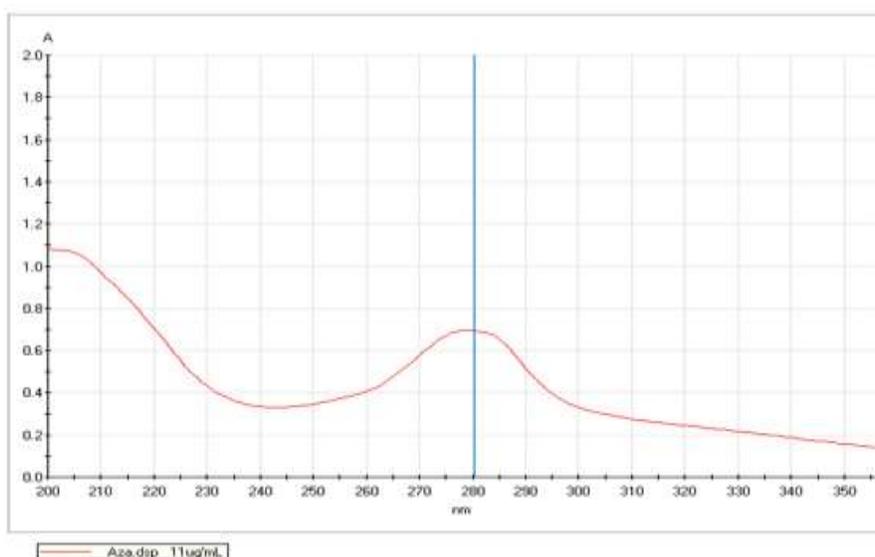


Figura 6. Barrido de la sustancia de referencia a concentración de 11 μg / mL.

5.2.1 Linealidad y precisión.

Como se observa en la (Tabla 12) y (Gráfico 1), el sistema es lineal al obtener una r mayor a 0.99 y un % ERDR menor al 2%. Mientras que el % CV del factor respuesta fue menor al 2% por lo tanto el sistema también es preciso.



Abs. $\lambda=280$ nm				
Concentración $\mu\text{g/mL}$	Curva promedio Día 1	Curva promedio Día 2	Factor respuesta	
1	0.059	0.060	0.059	0.060
5	0.294	0.294	0.059	0.059
8.8	0.504	0.508	0.057	0.058
11	0.641	0.637	0.058	0.058
13.2	0.776	0.777	0.059	0.059
b=	-0.0011	-0.0004	Promedio=	0.058
m=	0.0584	0.0584	DE=	0.001
r=	0.9998	0.9998	% CV =	1.2
%ERDR	1.3	1.1		

Tabla 12. Resultados de linealidad y precisión del sistema.

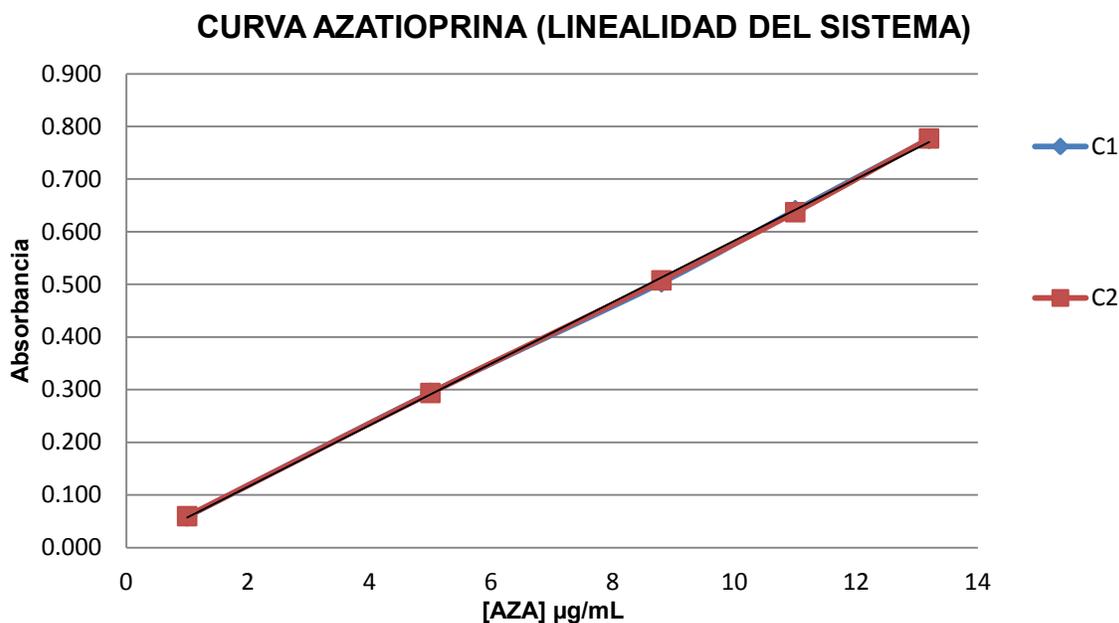


Gráfico 1. Regresión lineal, para determinar la linealidad del sistema.



5.2.2 Estabilidad de la muestra.

En las (Tablas 13, 14 y 15) podemos observar que el fármaco es estable durante 5 horas en las tres condiciones de temperatura evaluadas (4, 25 y 37 °C), ya que es justo en este tiempo en las tres tablas donde se observa el último tiempo con valor menor al 3% de la diferencia absoluta con respecto al tiempo cero como se indica en la NOM-177-SSA1-2013.

		Abs. $\lambda=280$ nm			Promedio	% DER
4 °C		1	2	3		
H O R A	0	0.646	0.645	0.645	0.645	/
	1	0.646	0.644	0.644	0.645	0.1
	2	0.655	0.654	0.653	0.654	1.3
	3	0.654	0.656	0.652	0.654	1.3
	4	0.66	0.658	0.657	0.658	2.0
	5	0.657	0.656	0.659	0.657	1.9*
	6	0.672	0.674	0.674	0.673	4.3

Tabla 13. Resultados de la prueba de estabilidad a una temperatura de 4 °C.

		Abs. $\lambda=280$ nm			Promedio	% DER
25 °C		1	2	3		
H O R A	0	0.646	0.645	0.645	0.645	/
	1	0.649	0.648	0.65	0.649	0.6
	2	0.652	0.654	0.651	0.652	1.1
	3	0.655	0.654	0.656	0.655	1.5
	4	0.663	0.664	0.663	0.663	2.8
	5	0.66	0.668	0.664	0.664	2.9*
	6	0.667	0.666	0.667	0.667	3.3

Tabla 14. Resultados de la prueba de estabilidad a una temperatura de 25 °C.



		Abs. $\lambda=280$ nm					
		37° C	1	2	3	Promedio	% DER
H O R A	0	0.646	0.645	0.645	0.645	0.645	/
	1	0.645	0.646	0.647	0.646	0.646	0.1
	2	0.652	0.651	0.65	0.651	0.651	0.9
	3	0.652	0.652	0.651	0.652	0.652	1.0
	4	0.656	0.658	0.657	0.657	0.657	1.8
	5	0.666	0.663	0.661	0.663	0.663	2.8 *
	6	0.672	0.674	0.676	0.674	0.674	4.4

Tabla 15. Resultados de la prueba de estabilidad a una temperatura de 37 °C.

5.2.3 Influencia del filtro.

En la (Tabla 16), podemos observar que el criterio de retención del fármaco por el filtro es aceptable, al obtener datos del % de diferencia absoluta menores al 3 % tanto en la concentración alta como en la concentración baja.

Abs. $\lambda=280$ nm		
	11 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$
Sin filtrar	0.692	0.454
Filtradas		
1	0.665	0.445
2	0.668	0.455
3	0.669	0.433
4	0.672	0.437
5	0.682	0.435
6	0.681	0.447
Promedio	0.673	0.442
DE	0.006	0.008
%CV	0.961	1.748
% Retenido	2.8	2.6

Tabla 16. Resultados de la influencia del filtro.



5.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

Como se observa en las tablas 17- 20 y gráficos 2-5, el método para el producto de referencia tanto para los lotes A B y C son lineales al obtener una r mayor a 0.99 y un %ERDR menor al 2%. En cuanto al criterio de precisión (repetibilidad) se puede observar que el método es repetible al obtener un % CV menor al 3 % en cada uno de los niveles de las curvas de un mismo día.

5.3.1 Linealidad y Precisión (Repetibilidad) producto de referencia.

Concentración [AZA] µg/mL	Abs. λ=280 nm		Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
	Curva promedio Día 1	Curva promedio Día 2	DE	%CV	DE	%CV
1	0.061	0.059	0.001	1.883	0.001	0.984
5	0.302	0.290	0.002	0.505	0.002	0.526
8.8	0.526	0.503	0.001	0.190	0.001	0.199
11	0.652	0.634	0.002	0.319	0.001	0.182
13.2	0.790	0.761	0.003	0.335	0.003	0.331
b=	0.0028	0.0013				
m=	0.0594	0.0574				
r=	0.9999	0.9999				
%ERDR	0.759	0.563				

Tabla 17. Resultados de la linealidad y precisión (repetibilidad) del método para el producto de referencia (IMURAN®).



LINEALIDAD DEL MÉTODO (IMURAN®)

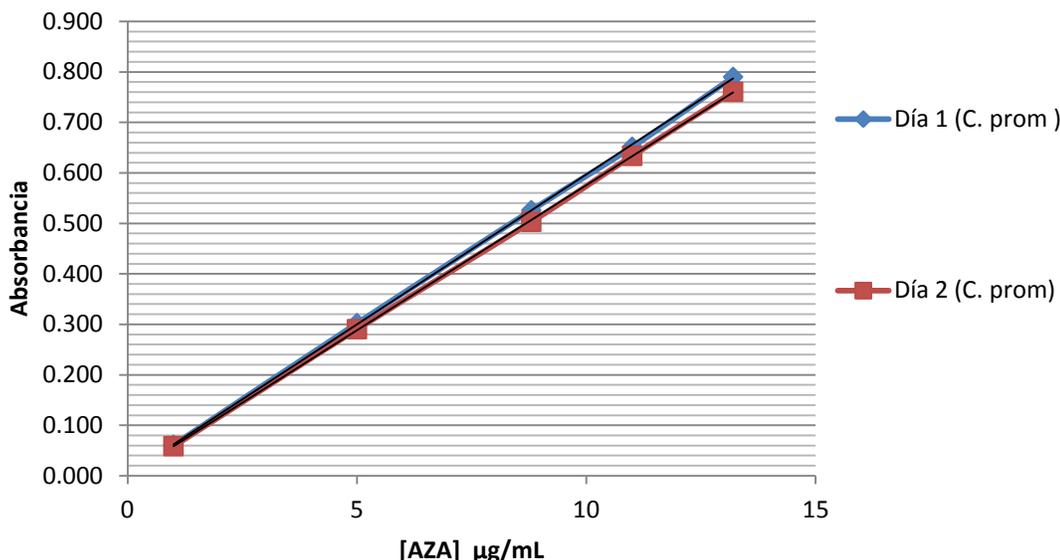


Gráfico 2. Regresión lineal, para determinar la linealidad del método del producto de referencia.

5.3.2 Linealidad y Precisión (Repetibilidad) del medicamento de prueba (Lote A)

Concentración [AZA] µg/mL	Abs. λ=280 nm		Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
	Curva promedio Día 1	Curva promedio Día 2	DE	%CV	DE	%CV
1	0.061	0.063	0.0006	0.941	0.0006	0.921
5	0.306	0.301	0.0025	0.823	0.0006	0.192
8.8	0.531	0.521	0.0006	0.109	0.0010	0.192
11	0.662	0.655	0.0021	0.314	0.0021	0.318
13.2	0.804	0.779	0.0010	0.124	0.0006	0.074
b=	0.0008	0.0054				
m=	0.0605	0.0588				
r=	0.9999	0.9998				
%ERDR	0.824	0.651				

Tabla 18. Resultados de la linealidad y precisión (repetibilidad) del método para el producto de prueba (Lote A).



LINEALIDAD DEL MÉTODO (LOTE A)

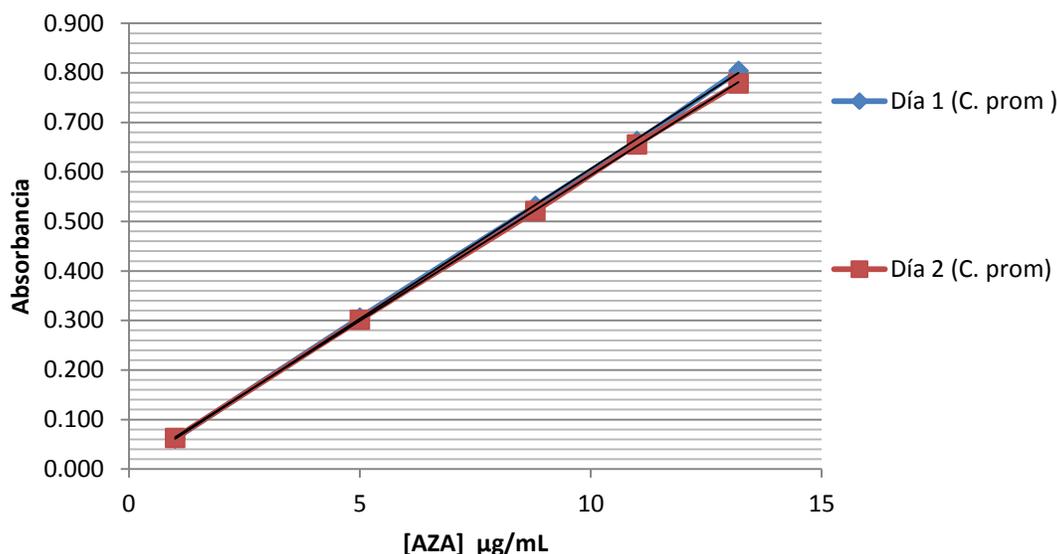


Gráfico 3. Regresión lineal, para determinar la linealidad del método del producto de prueba (Lote A).

5.3.3 Linealidad y Precisión (Repetibilidad) del medicamento de prueba (Lote B).

Concentración [AZA] µg/mL	Abs. λ=280 nm		Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
	Curva promedio Día 1	Curva promedio Día 2	DE	%CV	DE	%CV
1	0.057	0.056	0.001	1.019	0.001	1.025
5	0.283	0.281	0.001	0.353	0.001	0.205
8.8	0.500	0.503	0.002	0.416	0.001	0.199
11	0.621	0.620	0.002	0.279	0.002	0.336
13.2	0.753	0.754	0.001	0.133	0.001	0.133
b=	-0.0010	-0.0018				
m=	0.0569	0.0570				
r=	1.0000	1.0000				
%ERDR	0.651	0.985				

Tabla 19. Resultados de la linealidad y precisión (repetibilidad) del método para el producto de prueba (Lote B).



LINEALIDAD DEL MÉTODO (LOTE B)

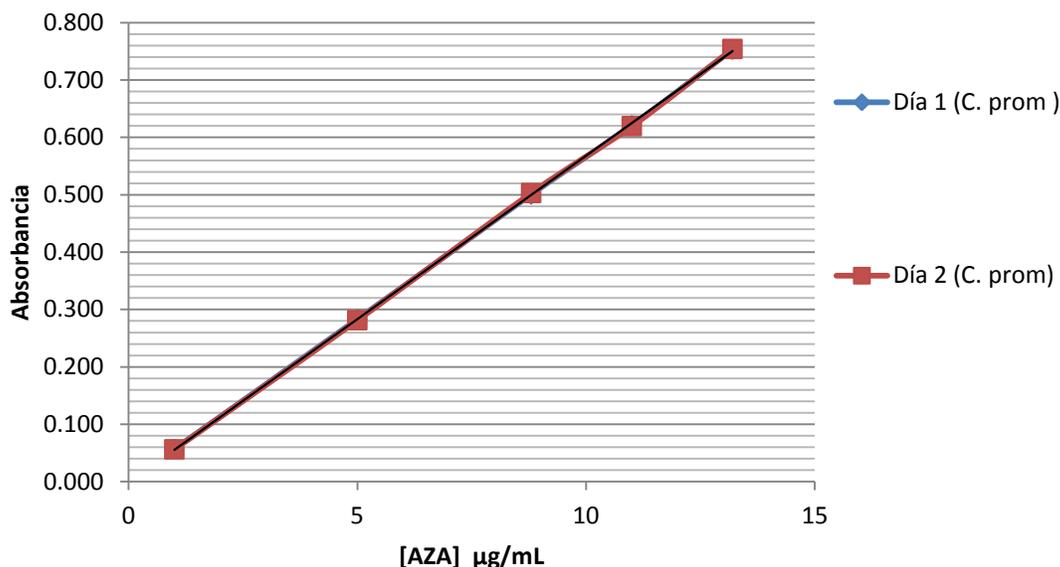


Gráfico 4. Regresión lineal, para determinar la linealidad del método del producto de prueba (Lote B).

5.3.4 Linealidad y Precisión (Repetibilidad) del medicamento de prueba (Lote C).

Concentración µg/mL	Abs. λ=280 nm		Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
	Curva promedio Día 1	Curva promedio Día 2	DE	%CV	DE	%CV
1	0.057	0.057	0.001	1.019	0.000	0.000
5	0.292	0.293	0.001	0.198	0.001	0.341
8.8	0.509	0.509	0.001	0.113	0.001	0.196
11	0.639	0.640	0.002	0.239	0.002	0.271
13.2	0.764	0.765	0.001	0.151	0.001	0.131
b=	-0.0002	0.0004				
m=	0.0580	0.0580				
r=	0.9999	0.9999				
%ERDR	0.347	0.502				

Tabla 20. Resultados de la linealidad y precisión (repetibilidad) del método para el producto de prueba (Lote C).



LINEALIDAD DEL MÉTODO (LOTE C)

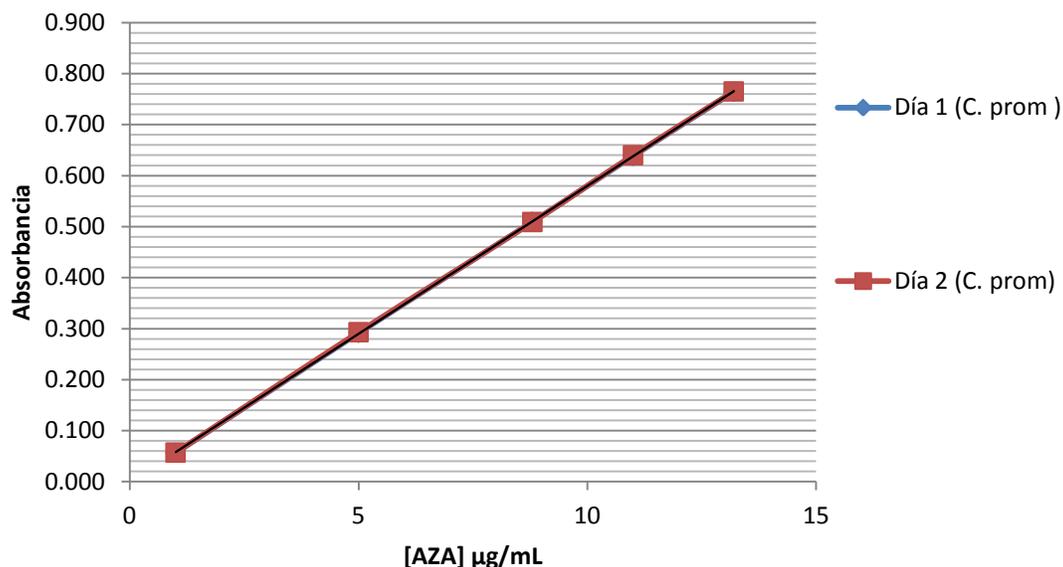


Gráfico 5. Regresión lineal, para determinar la linealidad del método del producto de prueba (Lote C).

5.3.5 Exactitud y precisión (Reproducibilidad).

Los resultados en las tablas 21-24 nos muestran que el método es exacto al obtener un %DAC menor al 2 % en cada uno de los puntos de la curva, y de igual forma reproducible al obtener un % CV menor al 3 %.

5.3.6 Exactitud y precisión (Reproducibilidad) del producto re referencia (IMURAN®).

Concentración	Media Conc Rec. µg/mL	DE	%CV	%DAC
1.0	0.992	0.011	1.156	0.791
5.0	5.037	0.012	0.233	0.738
8.8	8.770	0.045	0.518	0.336
11.0	10.965	0.052	0.474	0.314
13.2	13.235	0.023	0.171	0.266

Tabla 21. Resultados de la exactitud y precisión (reproducibilidad) del método para el producto de referencia.



5.3.7 Exactitud y precisión (Reproducibilidad) del producto de prueba (Lote A).

Concentración	Media Conc Rec. µg/mL	DE	%CV	%DAC
1.0	0.988	0.018	1.793	1.212
5.0	5.036	0.020	0.405	0.727
8.8	8.769	0.010	0.115	0.353
11.0	10.994	0.075	0.679	0.057
13.2	13.213	0.062	0.470	0.099

Tabla 22. Resultados de la exactitud y precisión (reproducibilidad) del método para el producto de prueba (Lote A).

5.3.8 Exactitud y precisión (Reproducibilidad) del producto de prueba (Lote B).

Concentración	Media Conc Rec. µg/mL	DE	%CV	%DAC
1.0	1.017	0.008	0.771	1.719
5.0	4.979	0.020	0.401	0.416
8.8	8.833	0.037	0.418	0.374
11.0	10.916	0.029	0.268	0.760
13.2	13.254	0.013	0.095	0.412

Tabla 23. Resultados de la exactitud y precisión (reproducibilidad) del método para el producto de prueba (Lote B).

5.3.9 Exactitud y precisión (Reproductibilidad) del producto de prueba (Lote C).

Concentración	Media Conc Rec. µg/mL	DE	%CV	%DAC
1.0	0.978	0.005	0.482	2.202
5.0	5.039	0.011	0.213	0.775
8.8	8.778	0.023	0.261	0.253
11.0	11.022	0.014	0.130	0.202
13.2	13.183	0.005	0.042	0.126

Tabla 24. Resultados de la exactitud y precisión (reproducibilidad) del método para el producto de prueba (Lote C).



5.4 CONTROL FARMACEUTICO.

5.4.1 Valoración.

De acuerdo a la monografía de la Azatioprina tabletas en la FEUM, estas deben contener no menos del 93.0 % y no más del 107.0 % de la cantidad de Azatioprina indicada en el marbete. Como se observa en la tabla 25 el producto de referencia (IMURAN®), como los lotes A, B y C cumplen con dicho requisito de valoración, al contener un porcentaje de Azatioprina (%AZA) dentro del intervalo establecido en la farmacopea.

Además de acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013 se cumple el requisito de valoración, donde ninguno de los lotes tiene un más de un 5% de diferencia con respecto al contenido de principio activo del medicamento de referencia.

Esta prueba se realizó por HPLC, los Cromatogramas cuyo tiempo de retención osciló alrededor de los 5.9 min en todos los productos, se incluyen en la parte (Anexos).

Producto	Lote	Peso promedio (g)	% AZA	% Diferencia
Referencia	IMURAN®	0.1574	97.2	/
Prueba 1	A	0.1780	97.3	0.1
Prueba 2	B	0.1861	93.4	3.9
Prueba 3	C	0.1886	95.3	2.0

Tabla 25. Resultados de la valoración de las tabletas de Azatioprina 50 mg.



5.4.2 Uniformidad de masa.

El MGA 299 Uniformidad de dosis de la FEUM 11^{va} edición, establece que cuando una tableta contiene más de 25 mg del principio activo y este a su vez constituye más del 25 % de la masa total de la unidad, se analiza el producto por el método de variación de masa.

Bajo este método de análisis, se evalúa que el producto cumple los requisitos de uniformidad, mediante el cálculo del valor de aceptación de las primeras 10 tabletas con respecto al valor obtenido durante la valoración, donde el valor de aceptación obtenido no es mayor a $L1\% = 15\%$. El caso anterior descrito, corresponde a las tabletas de Azatioprina, cuyas unidades contienen 50 mg del principio activo y constituye más del 25 % de la tableta.

Como se observa en la tabla 26 tanto el producto de referencia como los lotes a evaluar cumplen con el requisito farmacopeico de uniformidad de dosis al obtener valores menores a $L1\% = 15\%$. Los cuales fueron calculados con la fórmula $(VA = 98.5 - \text{Promedio} + ks)$ la cual se especifica en el (Anexo 1), ya que durante la valoración se obtuvo un % AZA menor a 98.5, donde el valor de $k=2.4$, $n=10$, siendo el valor del número de tabletas analizadas.

% Azatioprina				
Lote	Ref	A	B	C
1	98	99	95	93
2	98	94	95	98
3	96	98	94	99
4	98	98	90	88
5	97	98	93	97
6	98	95	92	96
7	97	97	93	90
8	96	97	94	99
9	96	96	95	97
10	97	100	93	96
Promedio	97	97	93	95
DE	0.9368	1.6810	1.5478	3.4368
%CV	0.96	1.73	1.66	3.61
VA	3.5	5.2	8.8	11.4

Tabla 26. Resultados uniformidad de masa de acuerdo a la FEUM.



5.4.3 Prueba de Q.

En el MGA 291 (Disolución) de la FEUM 11^{va} edición, establece que la prueba de disolución se debe realizar con 6 unidades (S1), donde ninguno de los resultados individuales del % Dis a los 30 min debe ser menor a $Q + 5\%$; de no cumplirse este requisito se repite la prueba con 6 muestras más (S2), donde al determinar el promedio de las doce unidades (S1+ S2), debe ser igual o mayor a $Q = 75\%$ y ninguno de los resultados individuales debe ser menor a $Q-15\%$. Con base en lo anterior, podemos observar en la tabla 27 que el producto de referencia (IMURAN®) y los lotes B y C, cumplen el requisito farmacopeico durante la etapa (S1); mientras que el Lote A no lo cumple al obtener en dos de las unidades evaluadas un % Dis de 68%, por lo cual se evaluaron 6 vasos más en una segunda etapa (S2), donde podemos observar que el promedio de las 12 unidades del Lote A es mayor $Q \geq 75\%$ y en ningún vaso se observa que existe un comportamiento de $Q-15\%$.

		Q (%Dis a los 30 min)			
	Vaso	Referencia	Lote A	Lote B	Lote C
S1	1	100	83	96	93
	2	99	81	90	91
	3	97	84	88	100
	4	94	68 *	98	102
	5	96	78	84	89
	6	97	68 *	94	95
S2	7	101	80	97	90
	8	98	76	95	100
	9	102	78	90	100
	10	91	70	101	105
	11	95	76	101	102
	12	97	78	99	103
	Promedio	97	77	94	98

Tabla 27. Resultados de la prueba de disolución en cada uno de los vasos.

(NOTA: $Q = 75\%$ Dis)



5.5 EVALUACIÓN DE LOS PERFILES DE DISOLUCIÓN.

En las tablas 28-31, se muestra el promedio del % Dis de cada tiempo de muestreo y % CV de las 12 unidades evaluadas de cada producto, en la columna de % CV podemos observar que todos los productos cumplen el requisito de la NOM-177-SSA1-2013, que establece que el % CV al primer tiempo de muestreo es menor o igual al 20 % y menor o igual al 10 % en los tiempos subsecuentes, para que proceda el cálculo de F2. Mientras que en los gráficos 6-13, se observa el comportamiento de los perfiles de disolución.

5.5.1 Resumen del perfil de disolución del producto de referencia (IMURAN®).

<i>Tiempo (min)</i>	<i>Promedio</i>	<i>X+DE</i>	<i>X-DE</i>	<i>DE</i>	<i>%CV</i>
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	59.5	67.50	51.5	7.997	13.44
15	80.1	87.05	73.2	6.944	8.67
20	88.4	94.40	82.4	6.011	6.80
30	97.3	100.26	94.3	3.002	3.09
45	101.6	104.04	99.2	2.410	2.37
60	103.4	105.71	101.1	2.327	2.25

Tabla 28. Resumen del perfil de disolución del producto de referencia obtenido a partir de 12 tabletas.

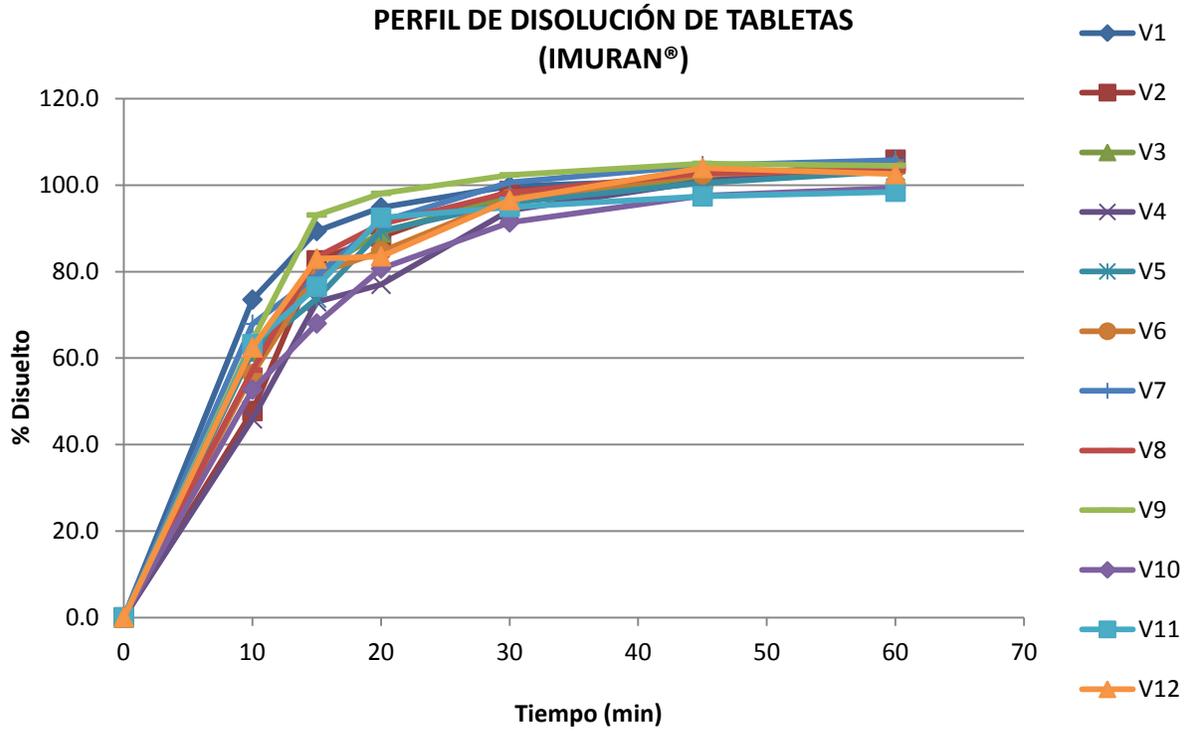


Gráfico 6. Perfil de disolución de los 12 vasos del producto de referencia.

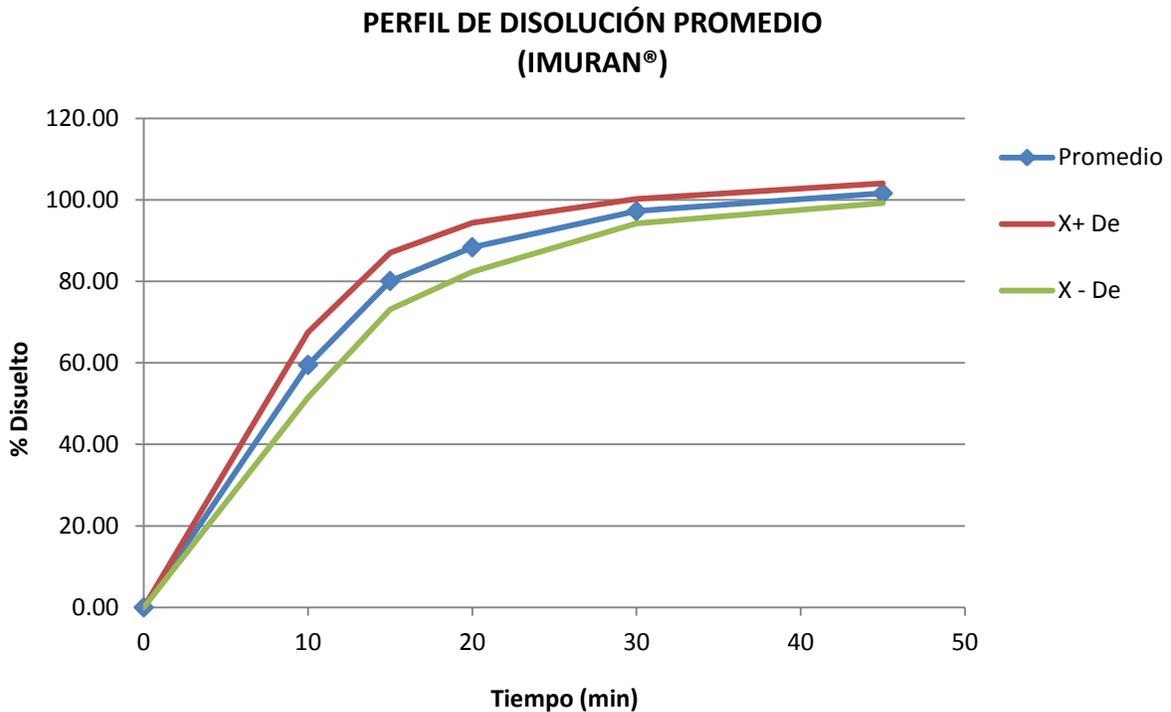


Gráfico 7. Perfil de disolución promedio de los 12 vasos del producto de referencia.



5.5.2 Resumen del perfil de disolución del producto de prueba (Lote A).

Tiempo (min)	Promedio	X+DE	X-DE	DE	%CV
0	0.0	0.00	0.0	0.000	0.00
10	45.2	49.69	40.8	4.454	9.85
15	56.4	60.81	51.9	4.445	7.89
20	66.1	71.01	61.2	4.919	7.44
30	76.7	82.06	71.3	5.378	7.01
45	84.5	89.60	79.4	5.108	6.05
60	91.5	94.69	88.3	3.212	3.51

Tabla 29. Resumen del perfil de disolución del producto de prueba (LOTE A) obtenido a partir de 12 tabletas.

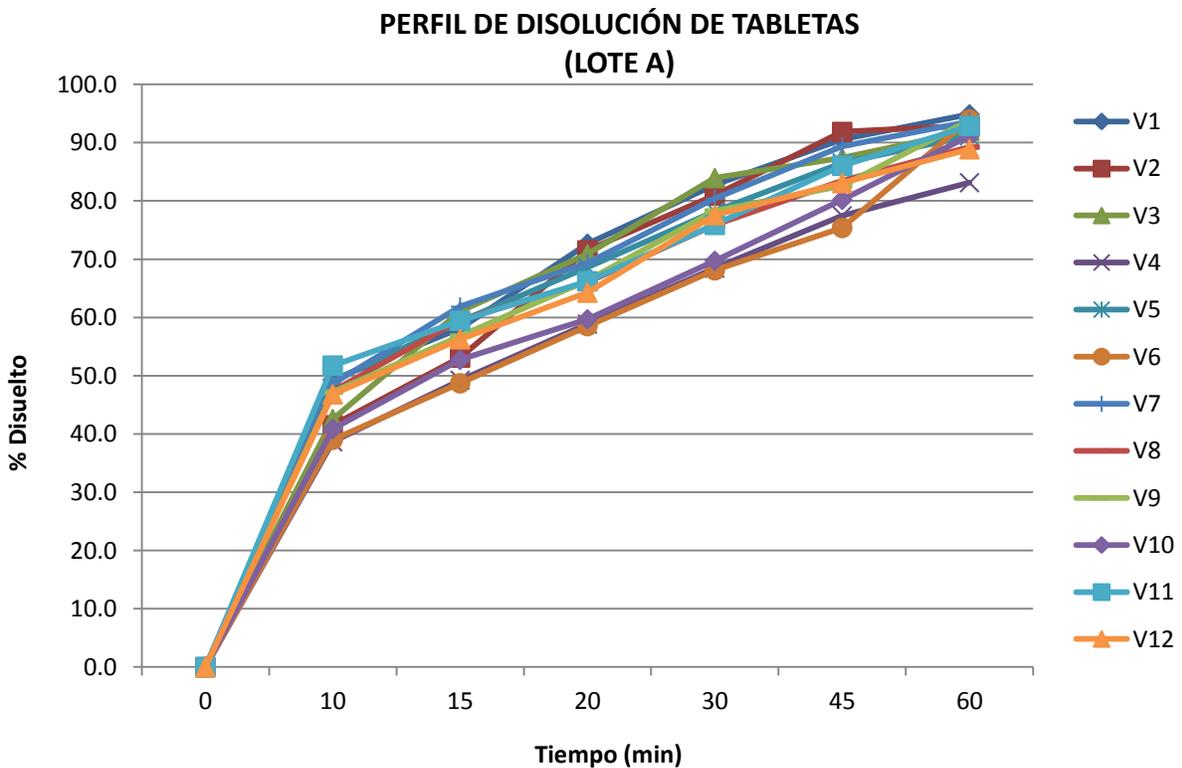


Gráfico 8. Perfil de disolución de los 12 vasos del producto de prueba (Lote A).

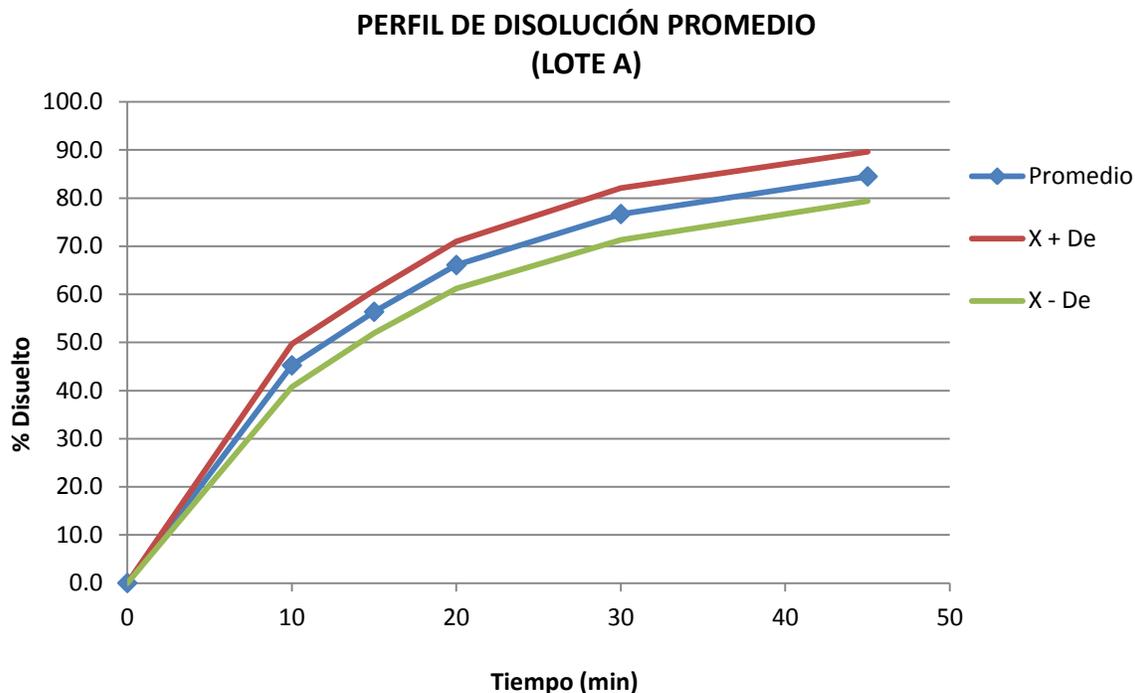


Gráfico 9. Perfil de disolución promedio de los 12 vasos del producto de prueba (Lote A).

5.5.3 Resumen del perfil de disolución del producto de prueba (Lote B).

Tiempo (min)	Promedio	X+DE	X-DE	DE	%CV
0	0.0	0.00	0.0	0.000	0.00
10	62.2	67.04	57.4	4.824	7.75
15	76.4	83.84	68.9	7.443	9.74
20	85.5	92.69	78.3	7.206	8.43
30	95.1	101.59	88.6	6.477	6.81
45	101.0	105.56	96.4	4.576	4.53
60	104.5	109.01	100.0	4.496	4.30

Tabla 30. Resultados del perfil de disolución del producto de prueba (Lote B).

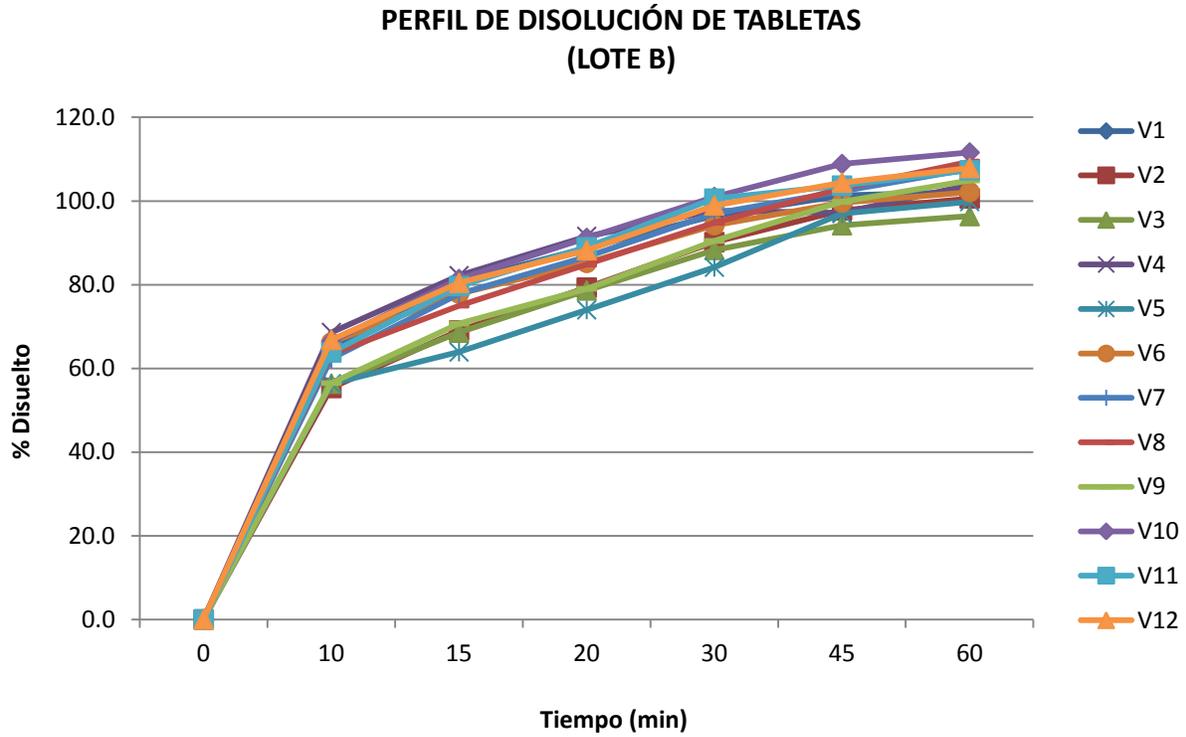


Gráfico 10. Perfil de disolución de los 12 vasos del producto de prueba (Lote B).

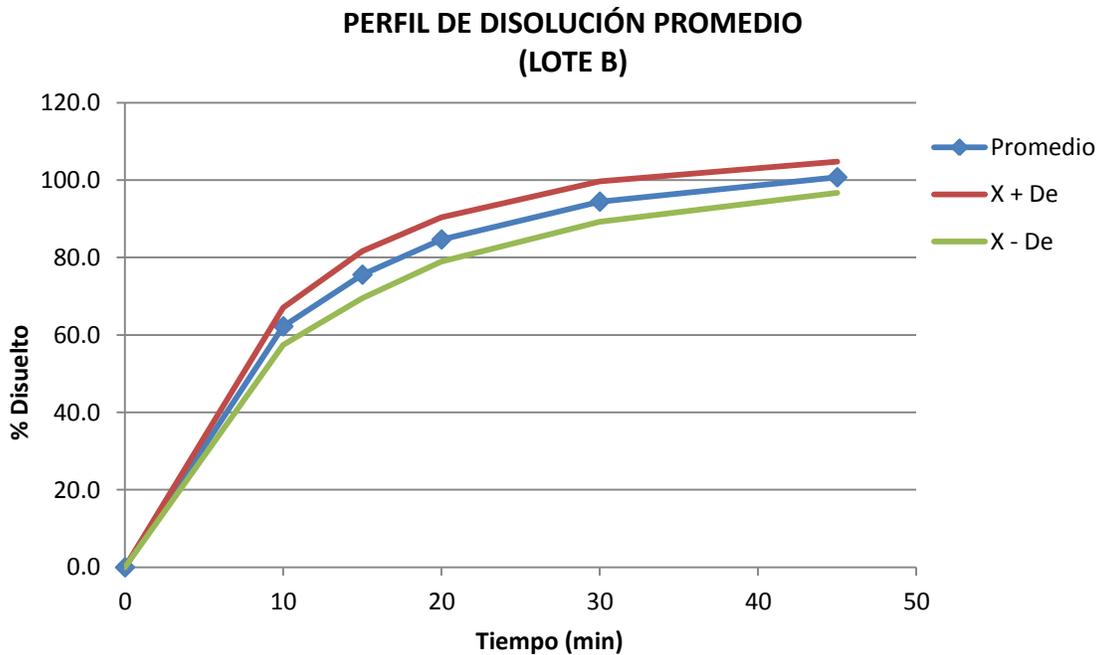


Gráfico 11. Perfil de disolución promedio de los 12 vasos del producto de prueba (Lote B).



5.5.4 Resumen del perfil de disolución del producto de prueba (Lote C).

Tiempo (min)	Promedio	X+DE	X-DE	DE	%CV
0	0.0	0.00	0.0	0.000	0.00
10	63.5	68.56	58.4	5.071	7.99
15	76.9	82.16	71.7	5.252	6.83
20	86.9	92.34	81.5	5.411	6.23
30	97.5	102.97	92.0	5.468	5.61
45	103.8	108.58	99.0	4.771	4.60
60	105.8	109.54	102.0	3.759	3.55

Tabla 31. Resultados del perfil de disolución del producto de prueba (Lote C).

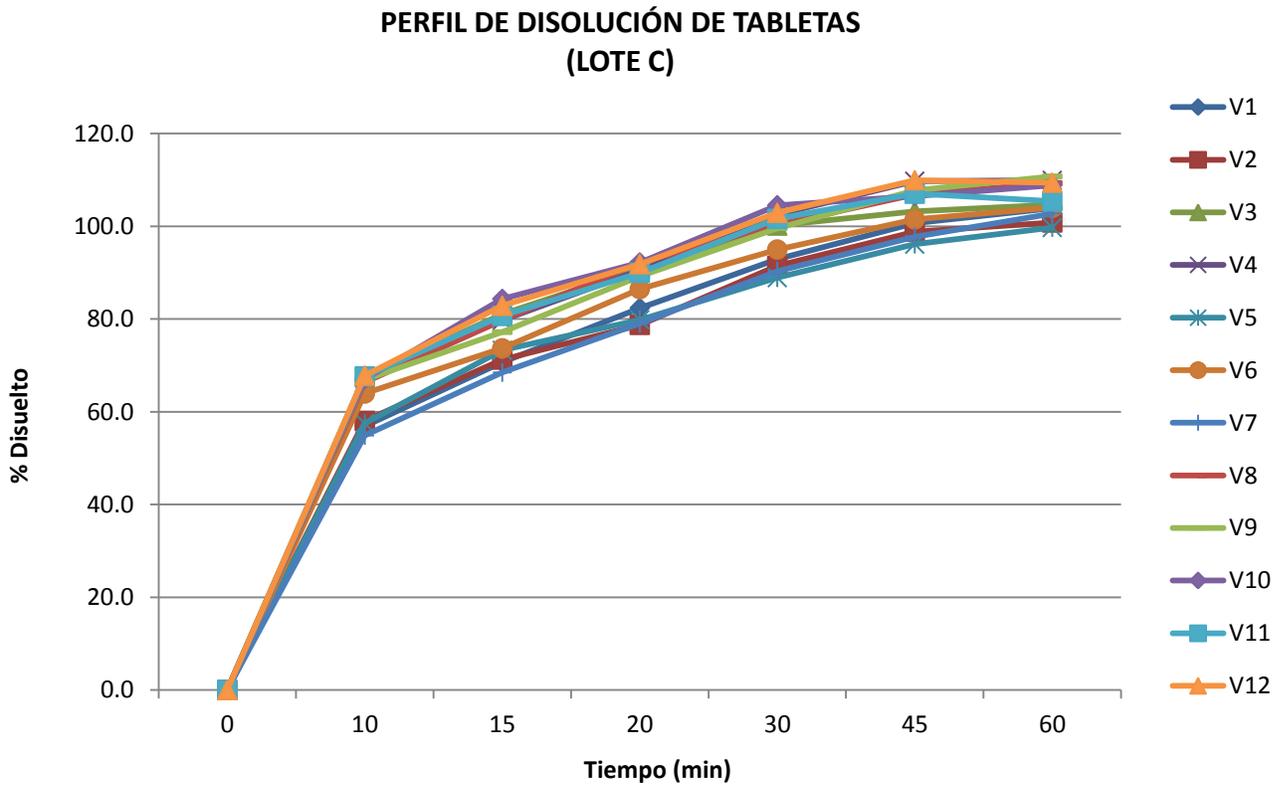


Gráfico 12. Perfil de disolución de los 12 vasos del producto de prueba (Lote C).



PERFIL DE DISOLUCIÓN PROMEDIO
(LOTE C)

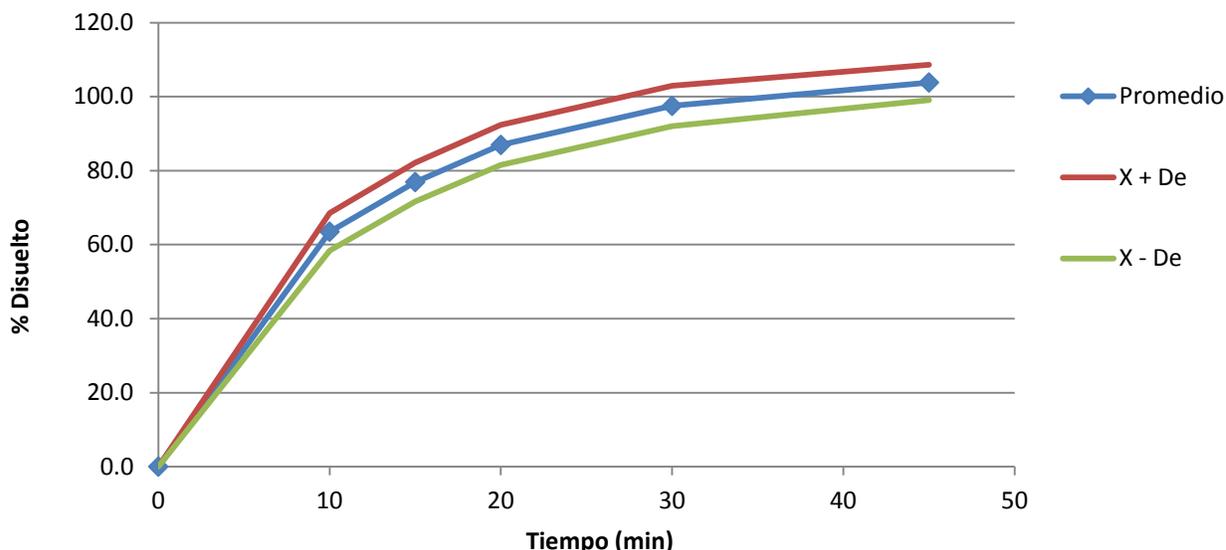


Gráfico 13. Perfil de disolución promedio de los 12 vasos del producto de prueba (Lote C).

5.5.5 Resultados obtenidos a partir del cálculo de F2.

En la tabla 32 podemos observar los resultados del cálculo de F2, los cuales indican que los lotes B y C son equivalentes con IMURAN® al obtener un F2 mayor a 50, mientras que el lote A no es equivalente al estar por debajo de 50.

Este resultado se refleja en los gráficos 14-16, donde el comportamiento del perfil del Lote A se ve más separado del de referencia, a comparación de los Lotes B y C.

Perfiles comparados	F2	Dictamen
Lote A	34	No cumple
Lote B	71	Cumple
Lote C	75	Cumple

Tabla 32. Valores de F2 de los lotes A, B y C comparados con el producto de referencia IMURAN®.



**COMPARACIÓN DE PERFILES DE DISOLUCIÓN
(IMURAN® / LOTE A)**

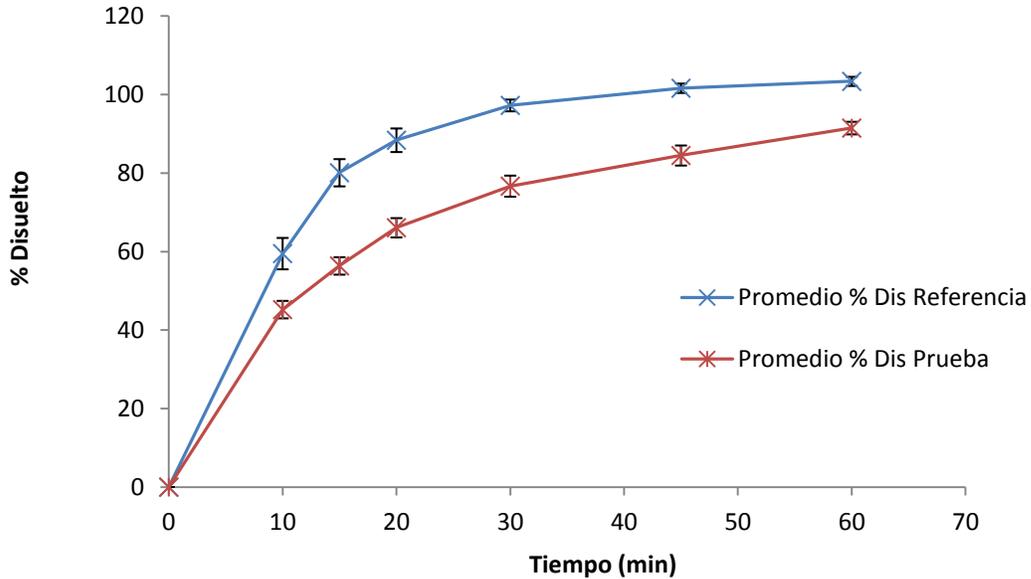


Gráfico 14. Comparación de perfil del producto de referencia con el producto de prueba (Lote A).

**COMPARACIÓN DE PERFILES DE DISOLUCIÓN
(IMURAN® / LOTE B)**

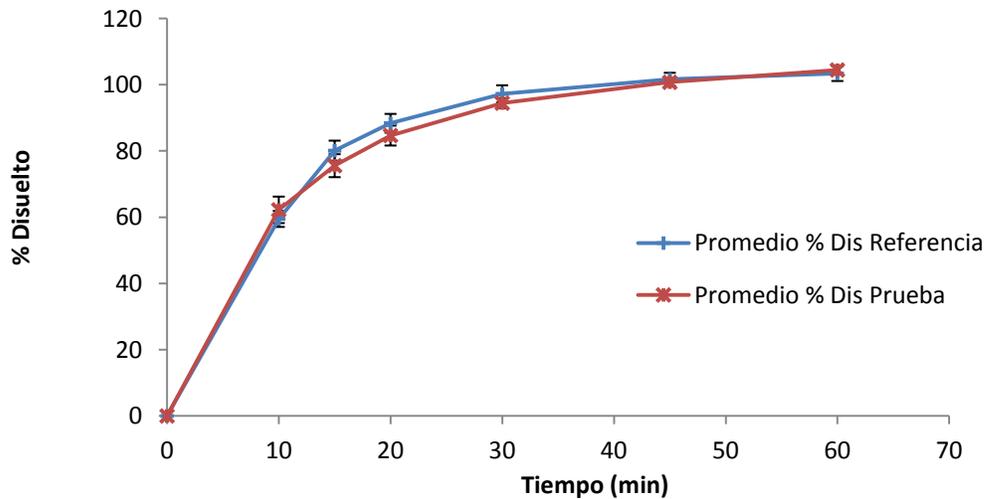


Gráfico 15. Comparación de perfil del producto de referencia con el producto de prueba (Lote B).

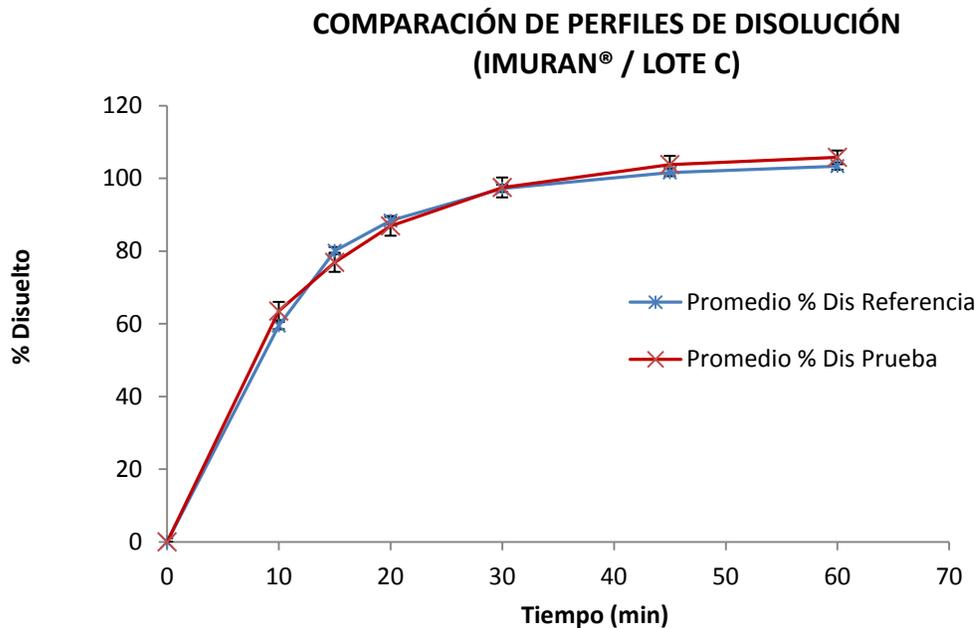


Gráfico 16. Comparación de perfil del producto de referencia con el producto de prueba (Lote C).

5.6 PERFILES DE DISOLUCION PARA LOTES SOMETIDOS A ESTABILIDAD ACELERADA.

5.6.1 Perfiles de disolución del Lote B, después de ser sometido a estabilidad acelerada 1 mes y 3 meses.

En las tablas 33 y 34, se muestra el promedio del % Dis de cada tiempo de muestreo y % CV de las 6 unidades evaluadas del lote B, después de ser sometido a estudios de estabilidad a 1 mes y 3 meses. En la columna de % CV podemos observar que todos los productos cumplen el requisito de la NOM-177-SSA1-2013, que establece que el % CV al primer tiempo de muestreo es menor o igual al 20 % y menor o igual al 10 % en los tiempos subsecuentes, por lo cual es factible hacer el cálculo de F2, comparado con los resultados del perfil al tiempo cero.



5.6.2 Resumen del perfil de disolución (LOTE B) 1 mes.

<i>Tiempo (min)</i>	<i>Promedio</i>	<i>X+DE</i>	<i>X-DE</i>	<i>DE</i>	<i>%CV</i>
0	0.0	0.00	0.0	0.000	0.00
10	59.5	66.87	52.2	7.337	12.32
15	72.4	80.02	64.8	7.624	10.53
20	81.8	89.01	74.7	7.163	8.75
30	90.3	98.22	82.3	7.943	8.80
45	97.5	102.19	92.8	4.708	4.83
60	100.9	105.78	96.0	4.867	4.82

Tabla 33. Resumen del perfil de disolución del producto de prueba (Lote B) sometidos a estabilidad acelerada 1 mes obtenido a partir de 6 tabletas.

5.6.3 Resumen del perfil de disolución (LOTE B) 3 meses.

<i>Tiempo (min)</i>	<i>Promedio</i>	<i>X+DE</i>	<i>X-DE</i>	<i>DE</i>	<i>%CV</i>
0	0.0	0.00	0.0	0.000	0.00
10	60.1	62.33	57.8	2.247	3.74
15	73.8	77.04	70.6	3.214	4.35
20	82.1	84.62	79.6	2.514	3.06
30	91.3	95.70	86.9	4.389	4.81
45	98.3	100.78	95.8	2.477	2.52
60	99.5	101.51	97.5	1.987	2.00

Tabla 34. Resumen del perfil de disolución del producto de prueba (Lote C) sometidos a estabilidad acelerada 1 mes obtenido a partir de 6 tabletas.



Tiempo (min)	Lote B to	Lote B t1(1 mes)	Lote B t3 (3 meses)
0	0	0	0
10	63	59	60
15	77	73	74
20	87	83	82
30	98	92	91
45	104	100	98
60	106	104	100
F2	/	69	70

Tabla 35.- Cálculo de F2, de los perfiles de disolución sometidos a estabilidad del lote B.

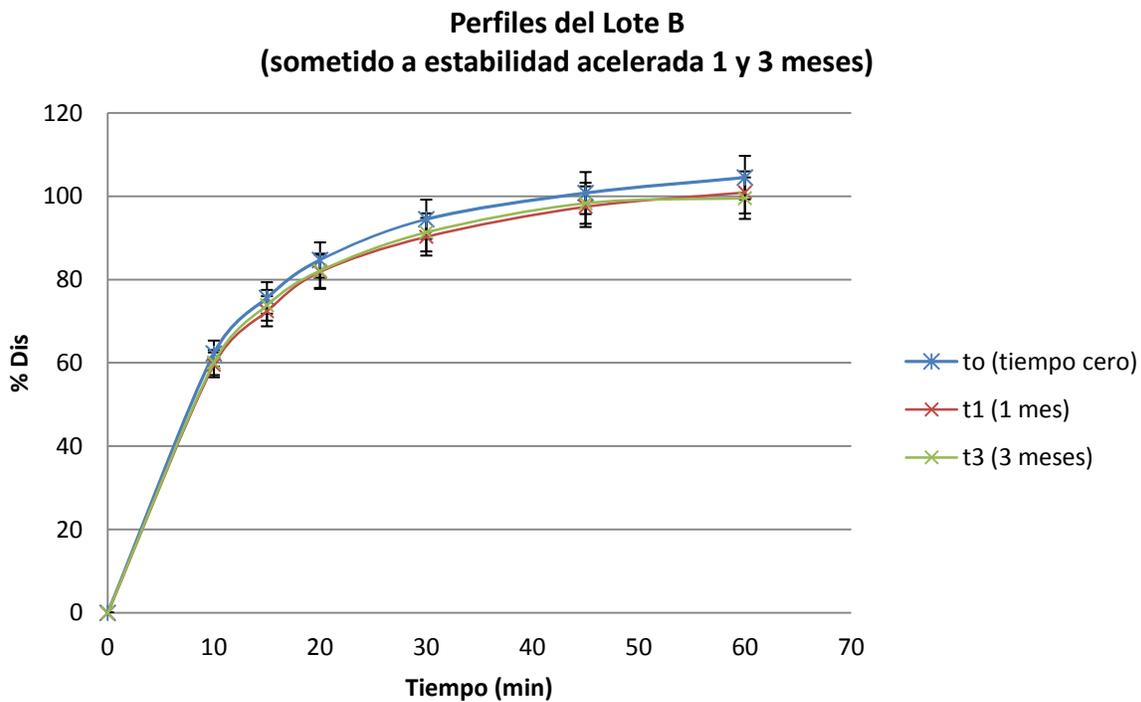


Gráfico 17.- Perfiles del lote B, sometidos a estabilidad acelerada 1 mes y 3 meses.

Como se observa en la tabla 35, el valor obtenido de F2 del lote B es mayor a 50 al primer y tercer mes, lo cual nos permite decir que este lote mantiene sus propiedades de disolución después de ser sometido a estudios de estabilidad acelerada. De igual forma podemos observar en el gráfico 17 que los perfiles mantienen una tendencia similar.



5.6.4 Perfiles de disolución del Lote C sometidos a estabilidad acelerada 1mes y 3 meses

En las tablas 36 y 37, se muestra el promedio del % Dis de cada tiempo de muestreo y % CV de las 6 unidades evaluadas del Lote C después de ser sometidos a estudios de estabilidad por 1 mes y 3 meses. En la columna de % CV podemos observar que todos los productos cumplen el requisito de la NOM-177-SSA1-2013, que establece que el % CV en al primer tiempo de muestreo es menor o igual al 20 % y menor o igual al 10 % en los tiempos subsecuentes, para que proceda el cálculo de F2 comparado consigo mismo al tiempo cero.

5.6.5 Resumen del perfil de disolución (LOTE C) 1 mes.

<i>Tiempo (min)</i>	<i>Promedio</i>	<i>X+DE</i>	<i>X-DE</i>	<i>DE</i>	<i>%CV</i>
0	0.0	0.00	0.0	0.000	0.00
10	58.7	62.90	54.5	4.194	7.14
15	73.4	79.86	66.9	6.493	8.85
20	83.1	88.57	77.6	5.484	6.60
30	92.4	97.17	87.6	4.811	5.21
45	100.3	105.60	95.0	5.280	5.26
60	104.0	110.45	97.5	6.457	6.21

Tabla 36. Resultados del perfil de disolución del producto de prueba (Lote B) sometidos a estabilidad acelerada 3 meses.



5.6.6 Resumen del perfil de disolución (LOTE C) 3 meses.

<i>Tiempo (min)</i>	<i>Promedio</i>	<i>X+DE</i>	<i>X-DE</i>	<i>DE</i>	<i>%CV</i>
0	0.0	0.00	0.0	0.000	0.00
10	58.6	61.99	55.2	3.399	5.80
15	71.8	75.76	67.9	3.934	5.48
20	81.1	86.24	75.9	5.158	6.36
30	89.5	94.30	84.6	4.834	5.40
45	96.3	100.09	92.5	3.814	3.96
60	98.4	102.09	94.7	3.681	3.74

Tabla 37. Resultados del perfil de disolución del producto de prueba (Lote C) sometidos a estabilidad acelerada 3 meses.

<i>Tiempo (min)</i>	<i>Lote C to</i>	<i>Lote C t1 (1 mes)</i>	<i>Lote C t3 (3 meses)</i>
0	0	0	0
10	62	60	60
15	76	72	74
20	85	82	82
30	94	90	91
45	101	97	98
60	104	101	100
F2	/	76	81

Tabla 38.- Cálculo de F2, de los perfiles de disolución sometidos a estabilidad del lote B.

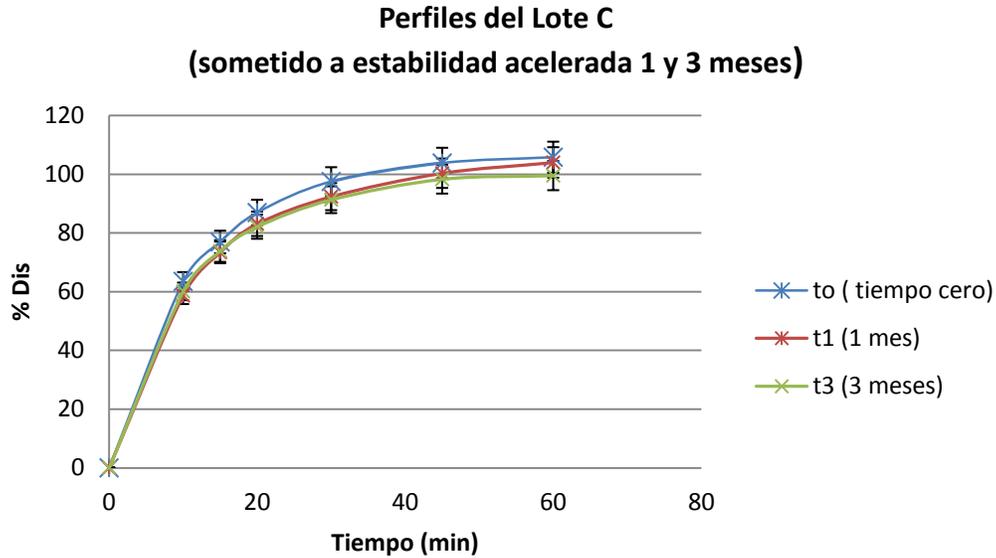


Gráfico 18.- Perfiles del lote B, sometidos a estabilidad acelerada 1mes y 3 meses.

Como se observa en la tabla 38t, el valor obtenido de F2 del lote C es mayor a 50 al primer y tercer mes, lo cual nos permite decir que este lote mantiene sus propiedades de disolución después de ser sometido a estudios de estabilidad acelerada. De igual forma podemos observar en el grafico 18, que los perfiles mantienen una tendencia similar.



6.0 CONCLUSIONES.

- 1) Se logró desarrollar y validar una metodología analítica que cumpliera con los requisitos establecidos en la NOM-177-SSA1-2013 para evaluar los perfiles de disolución de tabletas de 50 mg de Azatioprina.
- 2) Se logró evaluar mediante perfiles de disolución y cálculo de F2, que los lotes (B y C) de tabletas de Azatioprina 50 mg elaboradas por el LABORATORIO X, han sido formuladas de tal forma que son equivalentes con el producto de referencia, sin embargo se detecta inconsistencia en el proceso de fabricación de las tabletas de Azatioprina 50 mg, ya que el lote A no cumple con el valor de F2 al tiempo cero; por tal motivo no fue sometido a pruebas de estabilidad acelerada.
- 3) Se evaluó por medio de perfiles de disolución y cálculo de F2, que los lotes (B y C) conservan sus propiedades de disolución después de ser sometidos a pruebas de estabilidad acelerada a 1 y 3 meses.
- 4) Al realizar el control farmacéutico de: variación de masa, valoración y prueba de disolución del producto de referencia y los lotes A , B y C se observó que cumplen con los requisitos de acuerdo a la FEUM únicamente al tiempo cero, estas pruebas ya no se realizaron a los lotes sometidos a estabilidad acelerada por falta de recursos.



7.0 ANEXOS.

Cálculo del valor de aceptación (VA).

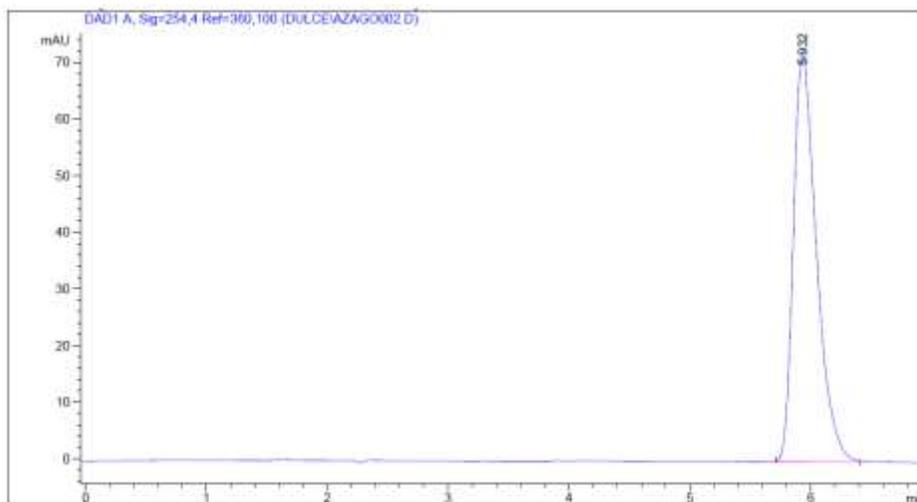
Tabla 0299.2. Variables para el cálculo del valor de aceptación.

Variable	Definición	Condiciones	Valor
\bar{X}	Media de los contenidos individuales (x_1, x_2, \dots, x_n) expresados como el porcentaje de la cantidad declarada.		
$x_i = x_1, x_2, \dots, x_n$	Contenido individual de las unidades probadas, expresado como el porcentaje de la cantidad declarada.		
n	Tamaño de la muestra (número de unidades en una muestra).		
k	Constante de Aceptabilidad.	Si $n = 10$, entonces $k =$	2.4
		Si $n = 30$, entonces $k =$	2.0
s (DE)	Desviación estándar de la muestra.		$DE = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$
CV	Coefficiente de variación (la desviación estándar de la muestra expresada como un porcentaje de la media).		$(100 S)/\bar{X}$
M (caso 1) a aplicar cuando $T \leq 101.5T$	Valor de referencia.	Si $98.5 \% \leq \bar{X} \leq 101.5 \%$, entonces	$M = \bar{X}$ $(VA = ks)$
		Si $\bar{X} < 98.5 \%$, entonces	$M = 98.5 \%$ $(VA = 98.5 - \bar{X} + ks)$
		Si $\bar{X} > 101.5 \%$, entonces	$M = 101.5 \%$ $(VA = \bar{X} - 101.5 + ks)$
M (caso 2) a aplicar cuando $T > 101.5$	Valor de referencia.	Si $98.5 \% \leq \bar{X} \leq T$, entonces	$M = \bar{X}$ $(VA = ks)$
		Si $\bar{X} < 98.5 \%$, entonces	$M = 98.5 \%$ $(VA = 98.5 - \bar{X} + ks)$
		Si $\bar{X} > T$, entonces	$M = T \%$ $(VA = \bar{X} - T + ks)$
Valor de aceptación (VA)			Fórmula general: $ M - \bar{X} + ks$ (Los cálculos especificados anteriormente son para los distintos casos).
$L1$	Máximo valor de aceptación permitido en porcentaje.		$L1 = 15.0$ a menos que se especifique algo diferente en la monografía individual.
$L2$	Máximo intervalo permitido para la desviación de cada unidad de dosificación probada a partir del valor calculado de M .	En el lado del valor menor, ningún resultado de unidad de dosificación puede ser menor que $[1 - (0.01)(L2)] M$, mientras que en el lado del valor superior ningún resultado de unidad de dosificación puede ser mayor que $[1 + (0.01)(L2)] M$. (Esto está basado en un valor de $L2$ de 25.0).	$L2 = 25.0$ a menos que se especifique algo diferente en la monografía individual.
T	Valor deseado en el momento de la fabricación. Para los efectos de esta Farmacopea, a menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, T es 100 % y para los efectos de fabricación, T es el valor asignado del fármaco, aprobado por el fabricante, en el momento de la fabricación.		

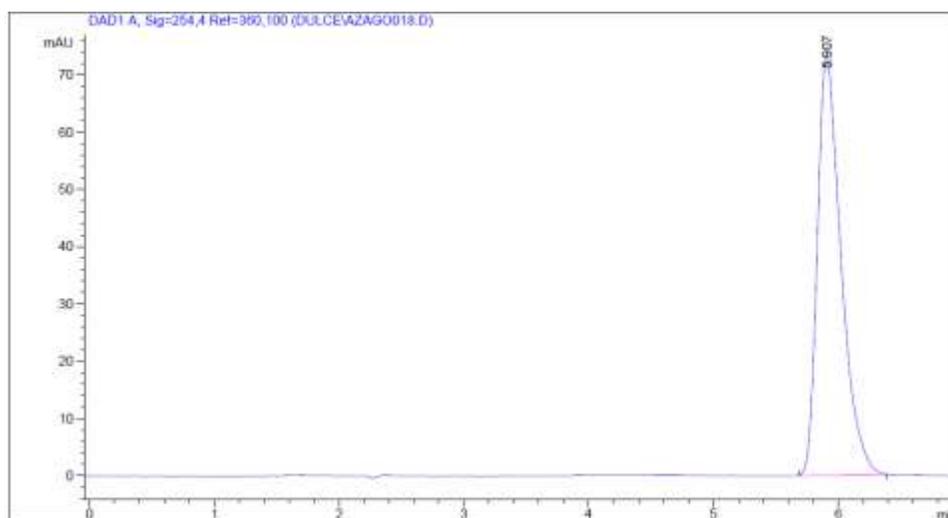
Anexo 1.- Tabla para cálculo del valor de aceptación.



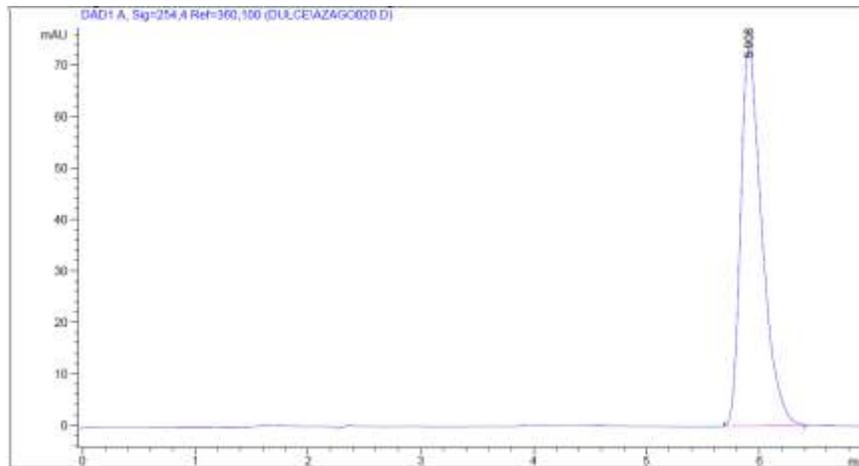
Cromatogramas.



Anexo 2. Cromatograma de la Sustancia de referencia de Azatioprina solución stock.



Anexo 3. Cromatograma del producto de referencia (IMURAN).



Anexo 4. Cromatograma del producto de prueba 1 (Lote A).



Anexo 5. Cromatograma del producto de prueba 2 (Lote B).



Anexo 6. Cromatograma del producto de prueba 3 (Lote C).



8.0 BIBLIOGRAFÍA.

- 1) Aguilar Ros. A. (2008). Biofarmacia y farmacocinética: ejercicios y problemas resueltos. Barcelona: Elsevier.
- 2) Álvarez L, Luis, Venegas S, Mauricio, Larrondo L, Milton, Becerra B, Natalia, Castro L, Ariel, & Quera P, Rodrigo. (2009). Polimorfismo del gen de la tiopurina S-metiltransferasa en donantes de sangre de un hospital universitario. Revista médica de Chile, 137(2), pág. 185-192. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872009000200001>
- 3) Bustos Mónica. (2012). Proyecto de prospecto IMURAN /Azatioprina 50 mg. Recuperado noviembre 2016 de, Biotoscana Farma S. A. Farmacéutica Sitio web: http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/marzo_2012/Dispo_1256-12.pdf
- 4) Christopher M. Riley, Thomas W. Rosanske, Shelley R. Rabel Riley. (2014). Specification of drug substances and products: development and validation of analytical methods. Amsterdam: Elsevier. pág. 245-263. Chapter 12 Dissolution.
- 5) COFEPRIS. (1998). ACUERDO por el que se adiciona y modifica la relación de especialidades farmacéuticas susceptibles de incorporarse al Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables. 2005, de COFEPRIS Sitio web: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/a110205.html>
- 6) COFEPRIS. Listado actualizado de medicamentos de referencia 2016/02. COFEPRIS Consultado ultima vez 18 / dic /2016 Sitio web: <http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/Bioequivalencia/LMR%202016-02%20V002.pdf>
- 7) Díaz G. Carolina. (2008). Mecanismos de acción de los fármacos Inmunosupresores. Hospital Clínico. Universidad de Chile. Revista Chilena de Reumatología Sitio web: http://www.academia.edu/8704613/Mecanismo_de_accion_de_fc0s_inmunosupresores. 24(2) pp73-88.
- 8) Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 11a. Edición. 2014
- 9) FEUM. Apéndice IIIValidación de métodos analíticos. 11a Edición. 2014 pág. 2789-2796.
- 10)Frutos G. Ocaña J. (2011) Técnicas de remuestreo en la comparación de curvas de disolución de fármacos. Departamento de estadística e investigación operativa. Facultad de farmacia. Universidad Complutense. Madrid.
- 11)Geary B. Richard, Barclay L. Murray.Geary B. Richard, Barclay L. Murray.Geary B. Richard, Barclay L. Murray. Azathioprine and 6-mercaptopurine pharmacogenetics and metabolite monitoring in inflammatory bowel disease. Journal of gastroenterology and Hepatology. 2005 20, pág.1149-1157.



- 12) Guía para la industria farmacéutica. Pruebas de disolución de formas de dosificación oral solidas de liberación inmediata. Última consulta 14/dic/16. Sitio web:
<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm200707.htm>
- 13) Guidance for industry, waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid dosage forms based on biopharmaceutics classification system. May 2015 Sitio web:
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070246.pdf>
- 14) Guidance for Industry. Immediate Release Solid Oral Dosage forms. Center for drug evaluation and research (CDER) November 1995. Sitio web:
<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070237.pdf>
- 15) Jung Cook Helgi. La Biofarmacia en México. Un breve análisis del pasado y presente. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 2013. Sitio web:
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57929952001>
- 16) Jung Cook, Helgi, Anda Jáuregui, Guillermo de, Rubio Carrasco, Kenneth, & Mayet Cruz, Lourdes. (2012). Comparación de perfiles de disolución: Impacto de los criterios de diferentes agencias regulatorias en el cálculo de f_2 . Revista mexicana de ciencias farmacéuticas, 43(3), 67-71. Recuperado el 13 de diciembre de 2016, de
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952012000300007&lng=es&tlng=es.
- 17) Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences. Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences: physical chemical and biopharmaceutical principles in the pharmaceutical sciences / Patrick J. Sinko ; assistant editor Yashveer Sing. Sixth edition.
- 18) NOM-059-SSA1-2015 Buenas prácticas de fabricación de medicamentos. Sitio web: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5407940&fecha=09/09/2015
- 19) NOM-073.SSA1-2015. Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios. Sitio web:
http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5440183&fecha=07/06/2016
- 20) 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 realizan las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos que deben sujetarse a los terceros autorizados, Centros de investigación o instituciones Hospitalarias que realizan las pruebas de biocomparabilidad. Sitio web:
http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013
- 21) Remington. The science and practice of pharmacy / editor in chief, Loyd V. Allen. 22st edition. Londres: Pharmaceutical Press; Filadelfia: Universidad de las Ciencias de Filadelfia, Facultad de Farmacia del 2013.
- 22) Rick NG, PhD, MBA. Drugs from discovery approval. Third edition. National University of Singapore Academy of GxP Excellence. Pp. 404-407.
- 23) Riveros O. Tesis evaluación de perfiles de disolución de productos de Ketoprofeno en medios de fosfatos pH 6.8 y pH 6.5



-
- 24) Riviere, Jim Edmond. Comparative pharmacokinetics: principles, techniques, and applications / Wiley-Blackwell, 2011. pág. 339-341
- 25) Ronald D. Schoenwald. Pharmacokinetics in Drug Discovery and Development. Boca Raton : CRC Press, 2002
- 26) Tabletsdissolution.com
<http://www.tabletdissolution.com/education/baskets-and-shafts>
<http://www.tabletdissolution.com/education/paddles>
<http://www.tabletdissolution.com/education/validation>
- 27) United States Pharmacopeia, USP 37 –NF32 2014
- 28) VADEMECUM, Azatioprina <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a061.htm>
- 29) Venkata Rommana, S. Uppor. Regulatory perspectives on in vitro dissolution/in vivo bioavailability correlations, Journal of controlled release. 2001 vol. 72 127-132.
- 30) World Health Organization. Annex 8. Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO Model List Essential Medicines Immediate-release, solid oral dosage forms. Sitio web: http://apps.who.int/prequal/info_general/documents/TRS937/WHO_TRS_937__annex8_eng.pdf
- 31) Y. Baena, L.F. Ponce D'Leon. Importancia y fundamentación del sistema de clasificación biofarmacéutico, como base de la exención de estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia in vivo. Universidad nacional de Colombia . Rev colomb.cienc. Quim. Farm. Vol 37 (1) , 18-32 , 2008.