



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Desarrollo y validación de un método analítico para
perfiles de disolución de esomeprazol por uv

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN FARMACIA

PRESENTA:

MICHELL CAROLINA ALONSO VILLANUEVA

ASESORES:

M. EN C. ELVIA ADRIANA MORALES HIPÓLITO
DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO

CUAUTITLÁN IZCALLI; ESTADO DE MÉXICO. 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

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

Desarrollo y validación de un método analítico para perfiles de disolución de esomeprazol por uv.

Que presenta la pasante: Michell Carolina Alonso Villanueva
Con número de cuenta: 310056553 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Farmacia.

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de Agosto de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Q.B.P. Martha Elena García Corrales</u>	
VOCAL	<u>M.C. Miriam Aide Castillo Rodríguez</u>	
SECRETARIO	<u>M. C. Elvia Adriana Morales Hipólito</u>	
1er. SUPLENTE	<u>M.C. Gabriela Rodríguez Patiño</u>	
2do. SUPLENTE	<u>M.C. Mariana Dolores Hernández</u>	

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

LMCF/cga*

DEDICATORIA

*A mamá, te agradezco infinitamente todo, soy muy afortunada
de tenerte.*

*Por tu ayuda en cada momento, por darme lo mejor siempre y
por el inmenso cariño que me tienes.*

Te AMO masí.

AGRADECIMIENTOS

A MAMÁ

Principalmente a ti, mamá querida y de mi corazón, por todo lo que has hecho siempre por mi bienestar. Por darme la maravillosa oportunidad de tener una buena educación, simplemente por todo ya que si mencionara cada cosa sería una lista muy larga. Por cierto no creas que me olvide de Cha.

¿Sabes algo?.....te admiro mucho y eres un gran ejemplo para mí, te quiero mucho.

A MIS AMIGOS

Por su compañía desde hace ya mucho tiempo, por todos los momentos que hemos compartido las risas, miedos, horas de estudio o simplemente de no hacer nada. Por hacer de cualquier cosa algo divertido. Los aprecio y les deseo el mejor de los éxitos: Lilitiana y Jhovani.

A las personas con las que tuve la oportunidad de compartir alguna etapa, dejando buenos recuerdos y aprendizajes y que aunque no mencione de igual manera son importantes.

A MIS ASESORES

A la Doctora Raquel López Arellano por permitir mi estancia LEDEFAR, por la confianza y el apoyo brindados y por creer en mí.

A la maestra Adriana Morales Hipólito por la asesoría brindada, porque siempre existió la disposición de ayudarme y de resolver mis dudas con paciencia.

A cada uno de mis sinodales por haberse tomado el tiempo para revisar y realizar los comentarios y sugerencias necesarias a este trabajo.

A LA UNAM

Por brindarme la oportunidad crecer académicamente y el orgullo de pertenecer a una gran institución y a su vez conocer a grandes personas de las cuales he obtenido algún tipo de aprendizaje.

ÍNDICE

ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ABREVIATURAS.....	VI
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	5
MARCO TEÓRICO.....	7
1. GENERALIDADES ESOMEPRAZOL.	7
1.1. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE ESOMEPRAZOL.	7
1.2. CARACTERÍSTICAS DE ESOMEPRAZOL.	9
1.3. ESTABILIDAD DE ESOMEPRAZOL.	10
1.4. INDICACIÓN TERAPÉUTICA Y USOS CLÍNICOS	12
1.5. MECANISMO DE ACCIÓN.	12
1.6. FARMACOCINÉTICA.	12
I. ABSORCIÓN Y DISTRIBUCIÓN.	12
II. METABOLISMO Y EXCRECIÓN.	13
1.7. FARMACODINAMIA.	13
2. ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA.	14
2.1. ORIGEN DE LOS ESPECTROS DE ABSORCIÓN.	14
2.2. CONCEPTOS TEÓRICOS.	14
2.3. ORIGEN DE LOS ESPECTROS ULTRAVIOLETA-VISIBLE.	15
2.4. TRANSMITANCIA Y ABSORBANCIA.	16
2.5. ANÁLISIS CUANTITATIVO.	16
I. LEY DE LAMBERT.	16
II. LEY DE BEER.	17
III. LEY DE LAMBERT-BEER.	17
2.6. REQUISITOS DE LA MUESTRA A ANALIZAR.	18
2.7. LINEALIDAD Y DESVIACIONES DE LA LEY DE LAMBERT-BEER.	19
3. DISOLUCIÓN.....	20
3.1. PROCESO DE DISOLUCIÓN.....	20
3.2. TEORÍA DE LA DISOLUCIÓN, MODELO DE CAPA DE DIFUSIÓN (TEORÍA DE PELÍCULA).	21
3.3. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN.	23
4. SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA.....	24
5. PERFILES DE DISOLUCIÓN.....	26
5.1. APARATOS DE DISOLUCIÓN.....	28
I. APARATO 2 PALETAS.....	28
II. APARATO 4 CELDA DE FLUJO CONTINUO.....	28
5.2. CONDICIONES PRUEBA.....	29
I. MEDIO DE DISOLUCIÓN.....	29
II. VOLUMEN.....	30
III. DESGASIFICACIÓN.....	30
IV. ENZIMAS.....	30

6.	VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	31
6.1.	TIPOS DE VALIDACIÓN	32
I.	PROSPECTIVA	32
II.	CONCURRENTE	32
III.	RETROSPECTIVA.....	33
IV.	REVALIDACIÓN	34
6.2.	CLASIFICACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.	34
6.3.	PARÁMETROS DE DESEMPEÑO.....	35
I.	LINEALIDAD.....	35
II.	PRECISIÓN.....	35
III.	EXACTITUD.....	36
IV.	REPETIBILIDAD.....	36
V.	REPRODUCIBILIDAD.....	36
VI.	LÍMITE DE DETECCIÓN.....	36
IV.	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.....	36
V.	INFLUENCIA DEL FILTRO.....	36
VI.	ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.....	36
VII.	SELECTIVIDAD.....	36
	MATERIAL Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	46
1.	REACTIVOS, MATERIAL, INSTRUMENTOS Y EQUIPOS	47
2.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	48
2.1.	DETERMINACIÓN DE LONGITUD DE ONDA.....	48
2.2.	VALIDACIÓN DEL SISTEMA.....	49
2.3.	VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	53
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
1.	SELECCIÓN DE LONGITUD DE ONDA.....	59
2.	RESULTADOS VALIDACIÓN SISTEMA.....	59
3.	RESULTADOS VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	64
	CONCLUSIONES.....	73
	REFERENCIAS.....	76
	ANEXO 1. CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN PARA LINEALIDAD DEL MÉTODO.....	80
	ANEXO 2. CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN PARA EXACTITUD Y PRECISIÓN DEL MÉTODO.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Generalidades de Esomeprazol.	7
Tabla 2. Generalidades Omeprazol.....	8
Tabla 3. Generalidades de Esomeprazol Magnésico.	8
Tabla 4. Generalidades de Esomeprazol Magnésico Trihidrato.	9
Tabla 5. Espectro Electromagnético.....	14
Tabla 6. Características de desempeño de métodos analíticos en base a su categoría de acuerdo a la USP 38.	35
Tabla 7. Características de desempeño y criterios de aceptación para métodos espectrofotométricos según la NOM-177-SSA1-2013 y la Guía de Validación del Colegio de QFB's.	37
Tabla 8. Producto analizado.....	47
Tabla 9. Reactivos y sustancias.	47
Tabla 10. Equipos e Instrumentos.....	47
Tabla 11. Equivalencias de distintas sales de esomeprazol.	48
Tabla 12. Diluciones para la curva de calibración del sistema.	50
Tabla 13. Diluciones para evaluar precisión del sistema.....	51
Tabla 14. Diluciones para las soluciones stock de la curva de calibración del método.	53
Tabla 15. Diluciones para las soluciones stock de exactitud y precisión del método.	55
Tabla 16. Resultados linealidad del sistema.	60
Tabla 17. Resultados del análisis de regresión para linealidad del sistema.....	61
Tabla 18. Análisis de varianza para linealidad del sistema.	61
Tabla 19. Resultados de precisión del sistema.	62
Tabla 20. Resultados de la influencia del filtro.	63
Tabla 21. Resultados linealidad del método.....	64
Tabla 22. Resultados de análisis de regresión para linealidad del método.....	65
Tabla 23. Análisis de varianza para linealidad del método.....	66
Tabla 24. Resultados exactitud y precisión del método.	67
Tabla 25. Resultados repetibilidad del método.....	68
Tabla 26. Resultados reproducibilidad del método.....	68
Tabla 27. Parámetros de la curva de calibración utilizados para determinar Límite de detección y Límite de Cuantificación.	69
Tabla 28. Resultados estabilidad de la muestra a tres diferentes condiciones.	70
Tabla 29. Resultados para obtener la concentración recuperada en linealidad del método.	80
Tabla 30. Resultados para obtener la concentración recuperada en exactitud y precisión del método.	81

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diagrama de ionización de esomeprazol en función de pH.	11
Figura 2. Diagrama esquemático de Wagner, que ilustra los procesos involucrados en la disolución de preparados sólidos.	21
Figura 3. Diagrama general de trabajo.	46
Figura 4. Diagrama para la determinación de longitud de onda de máxima absorción de esomeprazol en búfer de fosfatos pH 6.8.	49
Figura 5. Diagrama para la curva de calibración del sistema.	50
Figura 6. Diagrama para evaluar precisión del sistema.	51
Figura 7. Diagrama para evaluar influencia del filtro.	52
Figura 8. Diagrama para la curva de calibración del método.	54
Figura 9. Diagrama para exactitud y precisión del método.	56
Figura 10. Diagrama para evaluar estabilidad de la muestra.	58
Figura 11. Espectro de absorción de esomeprazol a una concentración de 40.12 µg/ml en la región ultravioleta en búfer de fosfatos pH 6.8.	59
Figura 12. Curva de calibración del sistema para esomeprazol de 8-40 µg/ml en búfer de fosfatos.	60
Figura 13. Curva de calibración del método para esomeprazol de 10-50 µg/ml en búfer de fosfatos.	65
Figura 14. Espectros de absorción de esomeprazol obtenidos a partir de materia prima y tableta.	71

ABREVIATURAS

USP	United States Pharmacopeia.
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
UV	Ultravioleta.
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución.
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos.
BCS	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica.
ERGE	Reflujo gastroesofágico.
AINES	Antiinflamatorio no esteroideo.
C Máx.	Concentración máxima.
T. Máx.	Tiempo Máximo.
AUC	Área bajo la curva.
MUPS	Multi Unit Pellets System.
COX-2	Ciclooxigenasa.
CYP	Citocromo.
ϵ	Coeficiente de absorción.
nm	Nanómetros.
μm	Micrómetros.
Abs	Absorbancia.
λ	Longitud de onda.
I_0	Radiación incidente.
I	Radiación transmitida.
K	Constante.
Cs	Concentración de saturación.
Ct	Concentración en el tiempo.
CIVIV	Correlación <i>in vitro</i> - <i>in vivo</i> .
TGI	Tracto Gastrointestinal
ICH	International Conference on Harmonisation.
L	Litro.
Kg	Kilogramo.
g	Gramo.
mg	Miligramos.
μg	Microgramos.
ml	Mililitros.
r	Coeficiente de regresión.
r^2	Coeficiente de correlación.
b_1	Pendiente.
b_0	Intercepto.
IC	Intervalo de confianza.
μ	Media.
CV	Coeficiente de Variación.
S	Desviación Estándar.
Vol.	Volumen
Conc.	Concentración.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El esomeprazol magnésico es un inhibidor de la bomba de protones, inhibe la secreción de ácido gástrico y alivia la acidez estomacal. Es el isómero S del omeprazol y el primer isómero óptico inhibidor de la bomba de protones. Proporciona un mejor control de ácidos que la mezcla racémica. [1]

El método oficial para disolución de esomeprazol se encuentra reportado en la USP 35 mediante el uso de HPLC.

Este trabajo pretende desarrollar y validar un método alternativo para cuantificar esomeprazol en perfiles de disolución mediante espectrofotometría ultravioleta, pues esta técnica resulta más conveniente debido a las ventajas que ofrece en rapidez y costos, además de que las características de la molécula permiten el uso de esta.

La calidad de los productos de una empresa es de suma importancia tanto para su prestigio como para su desarrollo económico. Las exigencias de los mercados obligan a las empresas manufactureras a enfrentar escenarios cada día más competitivos. Esta demanda en la calidad así como la necesidad de optimizar procesos productivos ha hecho necesario que se dispongan de métodos analíticos rápidos, fiables y que el proceso de manufactura sea estable.

Una herramienta con la que se cuenta para asegurar la calidad de los productos y procedimientos es la validación de los mismos, por lo cual, la adopción de un nuevo método analítico debe estar soportada por suficientes datos de laboratorio y una validación bien documentada, que cumpla con los requisitos establecidos. [2]

La validación del método es el proceso por el cual se demuestra que los procedimientos analíticos son aptos para el uso indicado [3]

El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que es apto para el propósito indicado. La validación del método analítico se considera una parte esencial del desarrollo del método analítico, es la evaluación de un método para asegurar que es apropiado para el análisis en cuestión y que los resultados son confiables y consistentes. [4]

La validación garantiza la calidad del medicamento, pues confiere fiabilidad a los resultados obtenidos del análisis, asegurando que el medicamento cumple con los parámetros establecidos. [5]

El desarrollo y validación de métodos analíticos para disolución es importante en el desarrollo de medicamentos genéricos.

La disolución es una herramienta importante en el desarrollo de fármacos y puede ser una clave en la aprobación de productos farmacéuticos. [6]. Ayuda a asegurar la calidad continúa del producto y su optimización después de cambio de manufactura, formulación, sitio de manufactura y escalamiento de proceso.

Un perfil de disolución es la determinación experimental de la velocidad o cantidad con que el principio activo se disuelve en un intervalo de tiempo, bajo condiciones experimentales controladas a partir de la forma farmacéutica. Se utiliza como indicador del desarrollo *in vivo* y para establecer correlación de los resultados *in vitro* y los resultados de biodisponibilidad. [7]

La disolución se utiliza como herramienta de control de calidad para predecir el rendimiento *in vivo* de un medicamento. La prueba *in vitro* sirve como herramienta para distinguir entre medicamentos aceptables e inaceptables. Los productos aceptables son bioequivalentes, en términos del rendimiento *in vivo*, mientras que los productos inaceptables no lo son. Con mucha frecuencia, se encuentra que la prueba de disolución *in vitro* es más sensible y discriminatoria que la prueba *in vivo*. Desde el punto de vista de la seguridad cualitativa, se prefiere un método de disolución más discriminatorio, porque la prueba indicará posibles cambios en la calidad del producto antes de que sea afectado el rendimiento *in vivo*. [8]

OBJETIVOS

OBJETIVOS

GENERAL

Desarrollar y validar un método analítico mediante espectrofotometría ultravioleta para cuantificar esomeprazol en perfiles de disolución.

ESPECÍFICOS

- Realizar una búsqueda bibliográfica para conocer las propiedades fisicoquímicas de esomeprazol magnésico trihidrato.
- Establecer las condiciones espectrofotométricas para cuantificar esomeprazol en búfer de fosfatos pH 6.8.
- Demostrar la consistencia y reproducibilidad del método espectrofotométrico conforme a lo indicado en la NOM-177-SSA1-2013 y la guía de validación de métodos analíticos del colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos.

MARCO TEÓRICO

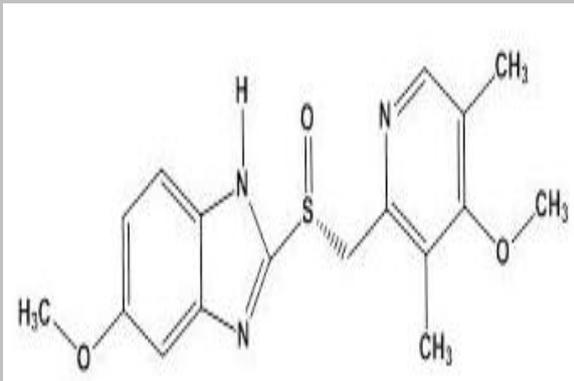
MARCO TEÓRICO

1. GENERALIDADES ESOMEPRAZOL.

El omeprazol existe en dos isómeros quirales: el isómero S y R. El isómero S es biológicamente activo; por lo tanto el esomeprazol representa la forma activa S. En las personas el esomeprazol se metaboliza más lentamente, produciendo mayor exposición.^[10]

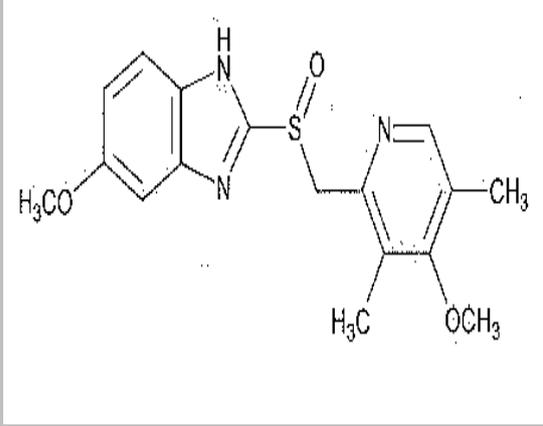
1.1. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE ESOMEPRAZOL.

Tabla 1. Generalidades de Esomeprazol.

Esomeprazol	Estructura
Nombre: 5-methoxy-2-[(S)-[(4-methoxy-3,5-dimethyl-2-pyridyl) Methyl] sulfinil] benzimidazole	
Formula Condensada: C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₃ S	
Peso molecular: 345.4 g/mol	
Numero CAS: 119141-88-7	
PKa: 4.71, 8.5	
Punto de fusión: 155°C	
Densidad: 1.37 ± 0.1 g/cm ³	
SCB: II	
Solubilidad:	
Agua pH 6.83 temp: 25°C 0.027 g/L pH 1 Temp: 25°C soluble (66 g/L) pH 2 Temp: 25°C soluble (19 g/L) pH 3 Temp: 25°C ligeramente soluble (1.6 g/L) pH 4 Temp: 25°C escasamente soluble (0.16 g/L) pH 5 Temp: 25°C escasamente soluble (0.038 g/L) pH 6 Temp: 25°C escasamente soluble (0.028 g/L) pH 7 Temp: 25°C escasamente soluble (0.027 g/L) pH 8 Temp: 25°C escasamente soluble (0.030 g/L) pH 9 Temp: 25°C escasamente soluble (0.059 g/L) pH 10 Temp: 25°C escasamente soluble (0.32 g/L)	

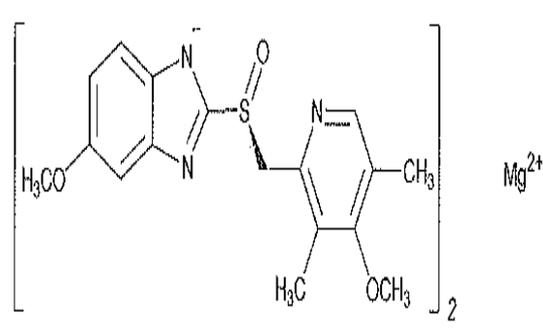
[11][12][14]

Tabla 2. Generalidades Omeprazol.

Omeprazol	Estructura
Nombre: 5-Metoxi-2-[[(4-metoxi-3,5-dimetil 1-2-piridinil)metil]sulfinil] bencimidazol	
Formula Condensada: C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₃ S.	
Peso molecular: 345.42 g/mol	
Numero CAS: 73590-58-6	
PKa: 4.72, 8.78	
Punto de fusión: 156°C	
Densidad: 1.332 g/cm ³	
SCB: II	
Solubilidad: Agua pH 6.96 temp: 25°C (0.030 g/L) pH 1 Temp: 25°C soluble (76 g/L) pH 2 Temp: 25°C soluble (22 g/L) pH 3 Temp: 25°C ligeramente soluble (1.8 g/L) pH 4 Temp: 25°C escasamente soluble (0.18 g/L) pH 5 Temp: 25°C escasamente soluble (0.045 g/L) pH 6 Temp: 25°C escasamente soluble (0.031 g/L) pH 7 Temp: 25°C escasamente soluble (0.030 g/L) pH 8 Temp: 25°C escasamente soluble (0.032 g/L) pH 9 Temp: 25°C escasamente soluble (0.048 g/L) pH 10 Temp: 25°C escasamente soluble (0.21 g/L)	

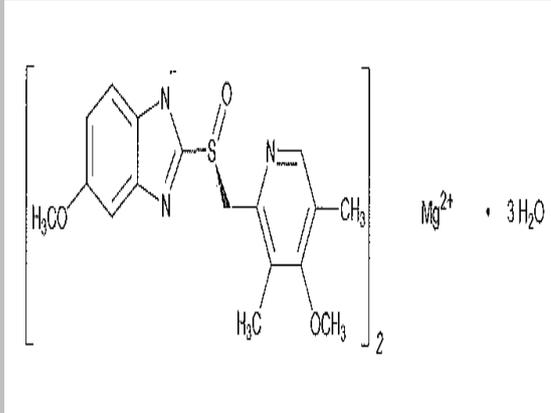
[11][13][14]

Tabla 3. Generalidades de Esomeprazol Magnésico.

Esomeprazol Magnésico	Estructura
Nombre: 1H-Benzimidazol, 5-metoxi-2-[(S)-[(4-metoxi-3,5-dimetil-2-pyridinil) metil] sulfinil], sal magnésica (2:1).	
Formula Condensada: C ₃₄ H ₃₆ N ₆ O ₆ S ₂ Mg.	
Peso molecular: 717.12 g/mol	
Numero CAS: 161973-10-0	
PKa: 4.71, 8.5	
SCB: II	

[15]

Tabla 4. Generalidades de Esomeprazol Magnésico Trihidratado.

Esomeprazol Magnésico Trihidratado	Estructura
Nombre: 1H-Benzimidazol,5-metoxi-2-[(S)-[(4-metoxi-3,5-dimetil-2-pyridinil)metil] sulfinil], sal magnésica (2:1), Trihidrato	
Formula Condensada: $C_{34}H_{36}N_6O_6S_2Mg \cdot 3H_2O$	
Peso molecular: 767.2 g/mol	
Numero CAS: 217087-09-7	
PKa: 4.71,8.5	
SCB: III	

[15][16]

1.2. CARACTERÍSTICAS DE ESOMEPRAZOL.

Es el primer inhibidor de la bomba de protones desarrollado como isómero óptico para tratamientos relacionados con la acidez, se utiliza en el tratamiento de la dispepsia, la ulcera péptica, la enfermedad de reflujo gastroesofágico y síndrome de Zollinger-Ellinson. [17]

Es particularmente adecuado para aquellos que sufren reflujo gastroesofágico (ERGE) persistente y recurrente. [18]

También es usado en la prevención de gastroenteritis en los pacientes que reciben tratamiento con AINES. Investigaciones in vivo demostraron que esomeprazol es quiralmente estable después de la administración. [19]

Esomeprazol ofrece ventajas sobre el omeprazol administrado por vía oral tiene una tasa metabólica y un aclaramiento sistémico más bajos, dando como resultado valores C máx. y AUC más altos. Esomeprazol demostró ser más eficaz que el omeprazol en manteniendo el pH intra-gástrico por encima de 4,0, una condición que promueve la curación de la mucosa.

Como todos los inhibidores de la bomba de protones, por razones de estabilidad gastrointestinal, el esomeprazol se administra en formas de liberación retardada. [20]

Esomeprazol se comercializa en forma de sal magnésica, sal magnésica trihidrata, sal sódica y sal de estroncio.

La sal magnésica trihidratada se encuentra bajo el nombre comercial de NEXIUM-MUPS, por la compañía farmacéutica AstraZeneca. Las siglas MUPS (Multi Unit Pellets System) hacen referencia a una forma farmacéutica tipo cápsula compuesta por gránulos con una cubierta entérica extremadamente pequeña (pellets) dentro de un recubrimiento externo que puede ser una cápsula de gelatina dura. El recubrimiento entérico protege el principio activo de la inactivación que sufre el esomeprazol en el medio ácido del estómago. La compañía farmacéutica AstraZeneca diseñó este nuevo sistema de entrega del fármaco de modo que los pellets se dosifiquen y administren en forma de comprimidos. [21]

1.3. ESTABILIDAD DE ESOMEPRAZOL.

Se ha investigado la estabilidad del esomeprazol en soluciones búfer. Las soluciones de muestra fueron protegidas de la luz. La semivida a 25°C (pH=6.8) es de aproximadamente 20 horas, mientras que la cifra correspondiente a 37° C es de aproximadamente 10 horas. Se supone que la velocidad de degradación es la misma para el enantiómero y el racemato.

Los datos indican que el esomeprazol y el omeprazol se degradan rápidamente a 25°C (pH=7), mientras que el proceso de agotamiento es algo más lento a temperaturas inferiores. [22]

Es posible conocer el comportamiento de ionización de la molécula de esomeprazol utilizando sus dos valores de pKa 4.71 y 8.5.

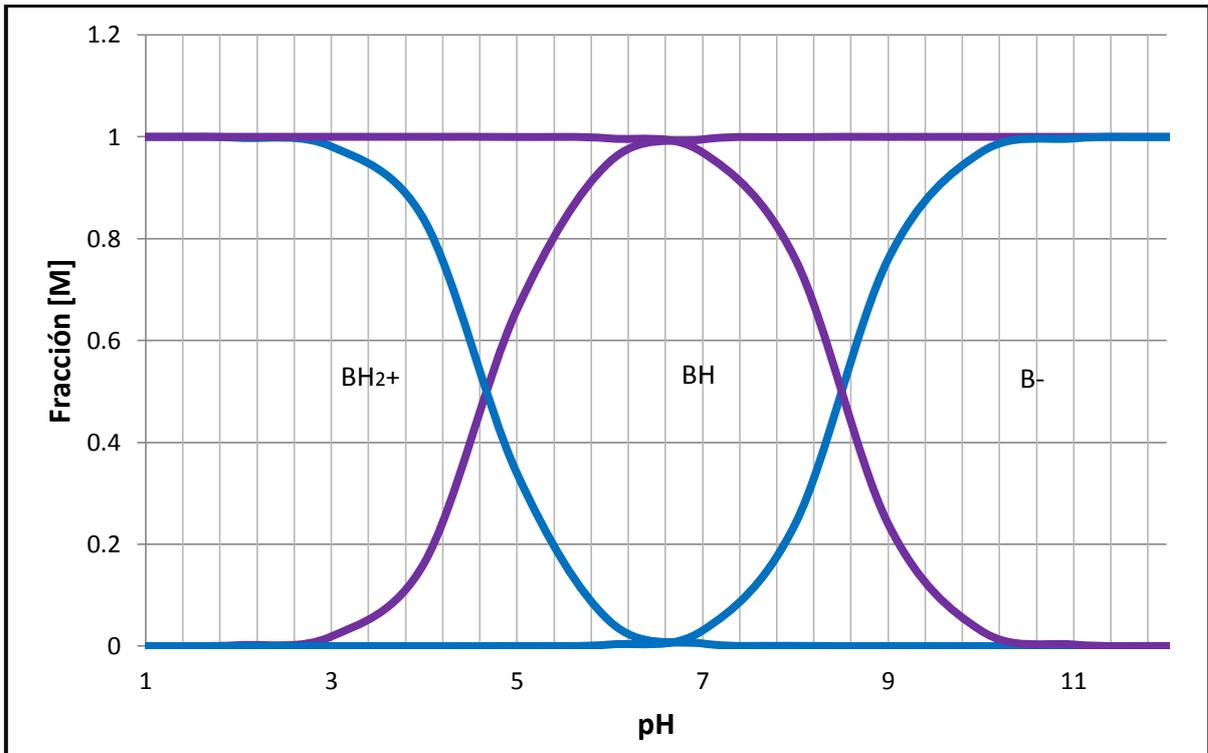


Figura 1. Diagrama de ionización de esomeprazol en función de pH.

La figura número 1 indica que en el medio de trabajo búfer de fosfatos pH 6.8 esomeprazol se encuentra principalmente en su forma ionizada por lo cual será más soluble. Esto se comprueba con la ecuación de Henderson-Hasselbach y los valores de pKa (4.71, 8.5) de esomeprazol:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{BH}]}{[\text{B}^-]}$$

$$6.8 = 8.5 + \log \frac{[\text{BH}]}{[\text{B}^-]}$$

$$6.8 - 8.5 = \log \frac{[\text{BH}]}{[\text{B}^-]}$$

$$-1.7 = \log \frac{[\text{BH}]}{[\text{B}^-]}$$

$$10^{-1.7} = \frac{[\text{B}^-]}{[\text{BH}]}$$

$$10^{-1.7} [\text{BH}] = [\text{B}^-]$$

Siendo que:

$$[\text{B}^-] + [\text{BH}] = 100\%$$

Al sustituir

$$10^{-1.7} [\text{BH}] + [\text{B}^-] = 100\%, [\text{B}^-] (10^{-1.7} + 1) = 100$$

$$[\text{B}^-] 1.02 = 100$$

$$[\text{B}^-] = 100 / 1.02$$

$$[\text{B}^-] = 98.03\% \text{ en forma ionizada.}$$

$$[\text{BH}] = 1.96\% \text{ en forma molecular.}$$

1.4. INDICACIÓN TERAPÉUTICA Y USOS CLÍNICOS

Esomeprazol al igual que otros inhibidores de la bomba de protones se utiliza para la prevención y el tratamiento de las úlceras gastrointestinales. [10]

Está indicado para la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE).

- Tratamiento de esofagitis erosiva por reflujo.
- Prevención de recaídas en el tratamiento a largo plazo de esofagitis cicatrizada.
- Tratamiento sintomático de la ERGE.

Pacientes que requieren etapa sostenida o continua con antiinflamatorios no esteroideos (AINES).

- Tratamiento de síntomas gastrointestinales superiores asociados a la terapia con AINES.
- Cicatrización de úlceras gástricas y duodenales asociadas a la terapia con AINES, incluidos AINES selectivos para COX-2.
- Prevención en pacientes con riesgo de úlceras gástricas y duodenales asociadas a la terapia con AINES, incluidos selectivos para COX-2.

Erradicación de *Helicobacter pylori* en combinación con antibióticos apropiados.

- Cicatrización de úlcera duodenal asociada a *H. pylori*.
- Prevenir recaídas en pacientes con úlceras pépticas asociadas con *H. pylori*. [23]

1.5. MECANISMO DE ACCIÓN.

Esomeprazol magnésico, es un inhibidor de la bomba de protones, bloquea el paso final en la producción de ácido mediante la inhibición específica de la $H^{(+)}K^{(+)}-ATPasa$ (bomba de ácido) en la célula parietal gástrica, suprimiendo así la secreción de ácido gástrico. El enantiómero S de omeprazol, parece ofrecer ventajas farmacocinéticas sobre el compuesto racémico, incluyendo menos metabolismo hepático de primer paso y un menor aclaramiento plasmático. [24]

1.6. FARMACOCINÉTICA.

I. ABSORCIÓN Y DISTRIBUCIÓN.

Esomeprazol es lábil al ácido y se administra generalmente como gránulos de capa entérica. Se ha demostrado en los estudios farmacocinéticos que la absorción de esomeprazol, tiene lugar en el intestino delgado. [25]

La conversión in vivo al R-isómero es insignificante. La absorción de esomeprazol es rápida, con una concentración plasmática máxima en una a dos horas después de su administración. Su biodisponibilidad absoluta es de

64% después de una sola dosis de 40 mg y se incrementa a 89% después de dosis repetidas una vez al día. El volumen aparente de distribución en personas sanas es de aproximadamente 0.22 L/kg. La unión de esomeprazol a las proteínas plasmáticas es de 97% aproximadamente. El efecto de esomeprazol sobre la acidez intragástrica no sufre ninguna influencia no obstante que la ingestión de alimentos retrasa y disminuye la absorción del mismo.

II. METABOLISMO Y EXCRECIÓN.

Esomeprazol se metaboliza por completo a través del sistema citocromo P450 (CYP). La mayor parte del metabolismo es dependiente de la isoforma CYP2C19, responsable de la formación de los metabolitos hidroxilados y desmetilados de esomeprazol. La parte remanente depende de otra isoforma específica, CYP3A4, responsable de la formación de esomeprazol sulfona, el metabolito principal en el plasma. La depuración plasmática total es 17 L/h aproximadamente después de una sola dosis y de 9 L/h después de la administración repetida. Esomeprazol se elimina completamente del plasma entre las dosis sin que exista tendencia a la acumulación durante la administración de una vez al día. Los metabolitos principales de esomeprazol no tienen efecto sobre la secreción de ácido gástrico. Casi el 80 % de una dosis oral de esomeprazol es excretada como metabolitos en la orina y el remanente en heces. Menos del 1% del medicamento es encontrado en la orina.^[26]

1.7. FARMACODINAMIA.

Esomeprazol es el S-isómero de omeprazol y reduce la secreción de ácido gástrico a través de un mecanismo de acción específico y selectivo. Es un inhibidor específico de la bomba de ácido en la célula parietal. Ambos isómeros R- y S- de omeprazol tienen una actividad farmacodinámica similar.^[26]

2. ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA.

2.1. ORIGEN DE LOS ESPECTROS DE ABSORCIÓN.

Todos los átomos y las moléculas son capaces de absorber energía, de acuerdo a ciertas limitaciones, las cuales dependen de la estructura de las sustancias. La energía se puede proporcionar en forma de radiación electromagnética (luz). El tipo y cantidad de luz absorbida por una molécula guarda relación con la estructura de la molécula; la cantidad de radiación absorbida está sujeta así mismo al número de moléculas que interaccionan con la radiación. El estudio de estas dependencias se conoce como espectroscopia de absorción.

La espectroscopia de absorción es una de las técnicas analíticas más interesantes. A pesar de los nuevos avances de la química analítica probablemente permanecerá como un instrumento útil, debido a sus varias y preponderantes ventajas en la solución de muchos problemas. Estas ventajas incluyen rapidez, sencillez, especificidad y sensibilidad.

Toda la radiación electromagnética es, de modo fundamental, similar con independencia de su longitud de onda, pero se han asignado distintos nombres a la radiación de diferentes márgenes de frecuencia. El intervalo completo de radiaciones se denomina espectro electromagnético y se ha caracterizado de la siguiente manera [27]:

Tabla 5. Espectro Electromagnético.

Regiones	Intervalos de longitud de onda
Ultravioleta Lejano	100-200 nm
Ultravioleta	200-400 nm
Visible	400-750 nm
Infrarrojo cercano	0.75-4 μm
Infrarrojo	4-25 μm

[27]

2.2. CONCEPTOS TEÓRICOS.

La radiación ultravioleta (UV) comprende sólo una pequeña parte del espectro electromagnético, que incluye otras formas de radiación como radio, infrarrojo (IR), cósmica y rayos X.

La energía asociada con la radiación electromagnética se define por la siguiente ecuación:

$$E=h \nu$$

Donde E es la energía (en julios), h es la constante de Planck (6.62×10^{-34} Js) y ν es la frecuencia (en segundos).

La radiación electromagnética puede considerarse una combinación de campos eléctricos y magnéticos alternos que viajan por el espacio con un movimiento de onda. Como la radiación actúa como una onda, puede clasificarse según la longitud de ésta o la frecuencia, relacionadas por:

$$\nu = c/\lambda$$

Donde ν es la frecuencia (en segundos), C es la velocidad de la luz (3×10^8 ms⁻¹) y λ es la longitud de onda (en metros). En espectroscopia UV-visible, la longitud de onda normalmente se expresa en nanómetros ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$).

De las ecuaciones anteriores se deduce que radiación con longitud de onda más corta tiene mayor energía. En espectroscopia UV-visible, la luz UV de longitud de onda más pequeña tiene la energía más alta. En algunos casos, esta energía es suficiente para causar reacciones fotoquímicas no deseadas al medir los espectros.

2.3. ORIGEN DE LOS ESPECTROS ULTRAVIOLETA-VISIBLE.

Cuando la radiación interacciona con la materia, pueden ocurrir varios procesos como reflexión, dispersión, absorción, fluorescencia/fosforescencia (absorción y reemisión) y una reacción fotoquímica (absorción y rotura de enlaces). En general, cuando se miden espectros UV-visible, sólo es deseable que ocurra absorción.

Como la luz es una forma de energía, la absorción de la luz por la materia causa que aumente el contenido de energía de las moléculas (o átomos). La energía potencial total de una molécula, generalmente se representa como la suma de sus energías electrónica, vibración y rotacional:

$$E_{\text{total}} = E_{\text{electrónica}} + E_{\text{vibracional}} + E_{\text{rotacional}}.$$

La cantidad de energía que una molécula posee en cada forma no es un continuo, sino una serie de niveles o estados discretos. Las diferencias de energía entre los diferentes estados siguen el orden:

$$E_{\text{electrónica}} > E_{\text{vibracional}} > E_{\text{rotacional}}.$$

En algunas moléculas y átomos, los fotones de luz UV y visible tienen suficiente energía para causar transiciones entre los diferentes niveles. La longitud de onda de la luz absorbida es aquella que tiene la energía requerida para mover un electrón desde un nivel de energía inferior a uno superior. [28]

2.4. TRANSMITANCIA Y ABSORBANCIA.

Cuando la luz atraviesa o se refleja en la muestra, la cantidad de luz absorbida es la diferencia entre la radiación incidente (I_0) y la transmitida (I). La cantidad de luz absorbida se expresa como transmitancia o absorbancia. La transmitancia normalmente se da en términos de una fracción de 1 o como porcentaje, y se define como se indica a continuación:

$$T = I/I_0 \text{ ó } \%T = (I/I_0) * 100$$

La absorbancia se define como la cantidad de energía radiante absorbida por una sustancia pura o en solución. Matemáticamente, corresponde al logaritmo negativo de la transmitancia, la transmitancia expresada como fracción decimal %T, transmitancia expresada como porcentaje.

$$A = - \log T = 2 - \log \%T$$

$$\text{Pero. } T = I/I_0 = 10^{-abc}$$

$$\text{Luego } A = - \log (I/I_0) = - \log 10^{-abc}$$

$$A = a b c$$

Esta ecuación indica que la absorbancia es una función lineal de la concentración, donde a es una constante de proporcionalidad llamada absorptividad. La magnitud de a depende de las unidades de b y c . Si la concentración c está expresada en moles por litro y la longitud de la cubeta b en centímetros, la constante a recibe el nombre de absorptividad molar (ϵ). [29]

$$A = \epsilon b c$$

Para la mayoría de las aplicaciones se utilizan valores de absorbancia, ya que la relación entre ésta y tanto la concentración como el paso óptico es, normalmente lineal. [28]

2.5. ANÁLISIS CUANTITATIVO.

Los principios que rigen la absorción de la radiación se aplican a todas las regiones del espectro electromagnético. La absorción se mide determinando la disminución de potencia experimentada por un haz de radiación como resultado de las interacciones con las especies absorbentes situadas en la trayectoria de dicho haz.

I. LEY DE LAMBERT.

Esta ley establece que cuando pasa luz monocromática por un medio homogéneo, la disminución de la intensidad del haz de luz incidente es proporcional al espesor del medio, lo que equivale a decir que la intensidad de la luz transmitida disminuye exponencialmente al aumentar aritméticamente el espesor del medio absorbente.

La siguiente relación matemática da cuenta de esta ley:

$$I/I_0 = e^{-k \cdot b}$$

Donde I_0 es la intensidad incidente, I es la intensidad transmitida, e es la base de los logaritmos naturales, k es una constante, cuyo valor depende de la naturaleza del soluto, longitud de onda de luz incidente naturaleza del medio y b es el paso óptico (normalmente en centímetros). [28]

II. LEY DE BEER.

La ley de Beer es idéntica a la ley de Lambert, excepto porque está expresada en términos de la concentración. La cantidad de luz absorbida es proporcional al número de moléculas absorbentes por las que pasa la luz.

La intensidad de un haz de luz monocromática disminuye exponencialmente al aumentar aritméticamente la concentración de la sustancia absorbente, cuando este haz pasa a través de un medio homogéneo.

$$I/I_0 = e^{-K \cdot C}$$

Donde I_0 es la intensidad incidente, I es la intensidad transmitida, e es la base de los logaritmos naturales, k es una constante, cuyo valor depende de la naturaleza del soluto, longitud de onda de luz incidente naturaleza del medio y C la concentración del soluto. [29]

III. LEY DE LAMBERT-BEER.

Combinando las dos leyes se obtiene la ley Beer-Bouguer-Lambert:

$$T=I/I_0 = e^{-kbc}$$

Donde c es la concentración de las especies absorbentes (normalmente expresada en gramos por litro o miligramos por litro). Esta ecuación puede transformarse en una expresión lineal tomando el logaritmo y, normalmente, se expresa en la forma decádica:

$$A = -\log T = -\log (I/I_0) = \log (I_0/I) = \epsilon bc$$

Donde ϵ es la absorción molar o coeficiente de extinción. Esta expresión se conoce como ley de Beer.

El coeficiente de extinción (ϵ) es característico de una sustancia en condiciones definidas de longitud de onda, disolvente y temperatura. En la práctica, el coeficiente de extinción medido también depende de las características del instrumento utilizado. Por esta razón, normalmente no se utilizan valores predeterminados del coeficiente de extinción para análisis cuantitativo. En su

lugar, se construye una curva de calibración o curva de trabajo para la sustancia a analizar, utilizando una o dos disoluciones patrón con concentraciones conocidas del analito.

Para transiciones electrónicas, la diferencia de energía entre los estados fundamentales y excitados, es relativamente grande. Por tanto, a temperatura ambiente, es muy probable que todas las moléculas estén en estado electrónico fundamental. La absorción y vuelta al estado fundamental, son procesos rápidos y el equilibrio se alcanza muy rápidamente. Por consiguiente, la absorción de luz UV-visible es cuantitativamente muy exacta. La simple relación lineal entre la absorbancia y la concentración y la relativa facilidad de medida de la luz UV-visible, ha hecho de la espectroscopia UV-visible la base de miles de métodos analíticos cuantitativos.

2.6. REQUISITOS DE LA MUESTRA A ANALIZAR.

Para resultados exactos, la muestra a analizar debe contener sólo el componente absorbente para el que se ha realizado la calibración. Si la muestra es una disolución, debe utilizarse como blanco el disolvente puro.

Puede que sea posible corregir una interferencia con una segunda longitud de onda. [28]

Las cantidades espectroscópicas que se miden son la transmitancia, T , donde $T=I/I_0$ y la absorbancia A , donde $A=\text{Log}(1/T)$. La ley de Beer se expresa más frecuentemente por la siguiente ecuación:

$$A=abc$$

Que establece que la absorbancia A de una solución es directamente proporcional a la concentración, c , del soluto absorbente. La absorptividad, a , es una constante de proporcionalidad que es independiente de la concentración, paso de luz e intensidad de la radiación incidente. La absorptividad depende de la temperatura, disolvente, estructura molecular, longitud de onda de la radiación. Las unidades de a se determinan apartir de las de b y c . Cuando b esta en cm y c en gramos por litro la absorptividad se expresa en litros por gramo centímetro. [28]

Se determina un espectro de absorción midiendo la absorbancia o transmitancia de una solución como función de la longitud de onda o frecuencia de la luz. Los espectros visibles y ultravioleta se representan más a menudo como trazados de la absorbancia (eje de ordenadas) respecto a la longitud de onda.

Si a una serie de soluciones de una sustancia en diferentes concentraciones se mide la absorbancia a la misma longitud de onda, temperatura y condiciones de disolución y se representan en un gráfico la absorbancia de cada solución en función de su concentración, se obtendrá por lo general, una línea recta que pasa por el origen, de acuerdo con la ecuación ($A = a \cdot b \cdot c$). Este gráfico se denomina trazado de la línea de Beer, y si la línea es recta se dice que cumple con la ley de Beer en el margen de concentración investigado.

La longitud de onda seleccionada para la determinación de la absorptividad es usualmente la longitud máxima (λ máx.) por dos razones:

1. La sensibilidad máxima se alcanza trabajando en el máximo de la banda, puesto que una concentración dada produce señal más fuerte a esta longitud de onda.
2. La variación de la absorbancia para pequeños cambios de la longitud de onda es mínima en el máximo de la banda (a menos que la banda sea en extremo pronunciada).^[28]

2.7. LINEALIDAD Y DESVIACIONES DE LA LEY DE LAMBER-BEER.

Por encima de 3 unidades de absorbancia un instrumento monocromador comienza a desviar la linealidad verdadera. Esto se debe principalmente a la luz dispersa inherente al sistema del monocromador. La luz borrosa se puede definir como la cantidad de luz presente en un haz luminoso de longitudes de onda no analíticas. Así por ejemplo, si el instrumento está leyendo a 500 nm (la longitud de onda analítica), entonces cualquier luz presente desde otras longitudes de onda se llama luz extraviada.

El detector del instrumento ve todos los fotones que pasan a través de la muestra y por lo tanto no puede discriminar entre la luz analítica y la luz dispersa. La luz borrosa está presente como una cantidad constante (por ejemplo 0.1% de la luz total) esta significaría que a 3 unidades de absorbancia (0.1% T) el detector ve una cantidad igual de luz analítica y dispersa (suponiendo que la muestra no esta absorbiendo ninguna de la luz dispersa).

La luz perdida puede deberse a inter reflexiones entre espejos en la óptica del instrumento, así como fugas de la luz en el compartimiento de la muestra. Además de la luz dispersa, hay algunos factores que pueden afectar la linealidad.

La no linealidad puede ocurrir si la muestra se dispersa. La dispersión es inespecífica y es pronunciada en longitudes de onda más bajas. Una muestra que ha sido afectada por la dispersión es fácil de diagnosticar ya que toda la

absorbancia del espectro será elevada. Es una técnica propensa a interferencias, particularmente en matrices biológicas. Esto se debe a que muchos compuestos tienen un espectro de absorción y esto significa que la matriz de fondo también posee una absorbancia. [30]

3. DISOLUCIÓN.

3.1. PROCESO DE DISOLUCIÓN

La disolución se define como el proceso mediante el cual una cantidad de fármaco entra en solución por unidad de tiempo bajo condiciones estandarizadas. El primer objetivo de las pruebas de disolución es ser usado como una herramienta para evaluar biodisponibilidad de un fármaco así como para demostrar bioequivalencia. Los datos de biodisponibilidad y bioequivalencia obtenidos resultados de la prueba de disolución se pueden utilizar para guiar el desarrollo de una nueva formulación, el desarrollo y optimización de procesos, así como para la asegurar la continuidad en la calidad del producto. Además la disolución es un requisito para la aprobación reglamentaria de la comercialización de productos. [31]

El proceso de disolución es el paso de las moléculas o iones del estado sólido a una solución. La solubilidad de una sustancia es la determinada cantidad de la misma que pasa a la solución cuando se establece el equilibrio entre la solución y la sustancia en exceso (sin disolver). Se dice que la solución obtenida de estas condiciones esta saturada. [32]

Para determinar la velocidad de disolución de fármacos en preparados sólidos en condiciones estandarizadas, deben considerarse diversos procesos fisicoquímicos acerca de la disolución. Estos incluyen las características de humidificación de los preparados sólidos, la capacidad de penetración del medio de disolución en los preparados, el proceso de hinchamiento, la desintegración y la desagregación. En la figura no 2 se observa el esquema que Wagner propuso para describir los procesos involucrados en la disolución de preparados sólidos.

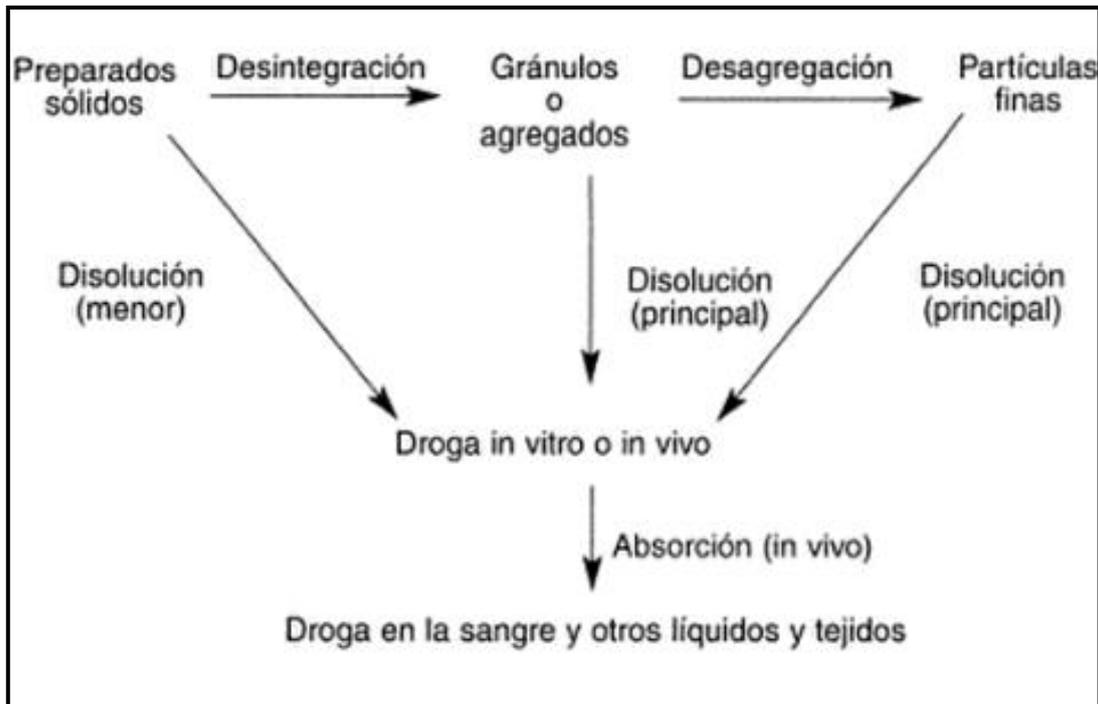


Figura 2. Diagrama esquemático de Wagner, que ilustra los procesos involucrados en la disolución de preparados sólidos.^[33]

Carstensen mencionó que la humidificación de la superficie de los preparados sólidos controla el acceso del líquido hacia la superficie del sólido y muchas veces es el factor limitante del proceso de disolución. La velocidad de la humidificación depende directamente de la tensión superficial en la interfase (tensión interfásica) y el ángulo de contacto entre la superficie sólida y el líquido.

Una vez que el preparado sólido se ha desintegrado en gránulos o agregados, las características de penetración desempeñan un papel primario en el proceso de desagregación, el gran tamaño de los poros facilita la penetración pero si es demasiado grande puede inhibir la penetración por disminución de la tensión interna.

Una vez que se produce la desagregación y dislocación de las partículas del fármaco quedan expuestas al medio de disolución dando lugar al proceso de disolución.^[33]

3.2. TEORÍA DE LA DISOLUCIÓN, MODELO DE CAPA DE DIFUSIÓN (TEORÍA DE PELÍCULA).

En 1897 Noyes y Whitney desarrollaron una ecuación sobre la base de la segunda ley de Fick para describir el fenómeno de la disolución.

$$\frac{dc}{dt} = K (C_s - C_t)$$

Donde dc/dt es la velocidad de disolución del fármaco, K es la constante de proporcionalidad, C_s es la concentración de saturación (solubilidad máxima). C_t es la concentración en el tiempo y $C_s - C_t$ es el gradiente de concentración.

La constante de proporcionalidad, K , también es denominada constante de disolución.

Brunner y Tolloezko modificaron la ecuación para incorporar el área de superficie, S , como una variable separada.

$$\frac{dc}{dt} = KS (C_s - C_t)$$

Para explicar el mecanismo de la disolución Nernst propuso la teoría del modelo de película. Bajo la influencia de fuerzas no reactivas o químicas, una partícula sólida sumergida en un líquido es sometida a dos pasos consecutivos:

1. La solución del sólido en la interfase, con la formación de una delgada capa estática o película h alrededor de la partícula.
2. La difusión desde esa capa en el límite con la masa del líquido.

El primer paso, la solución es casi instantáneo; el segundo, la difusión es mucho más lento y por lo tanto es el paso limitante de la velocidad. [33]

En primer lugar, se produce una reacción superficial que da lugar a la liberación de moléculas de soluto de la fase sólida. Esto implica un cambio de fase, de manera que las moléculas de sólido se convierten en moléculas de soluto en el disolvente en el que se disuelve el cristal. La solución en contacto con el sólido se saturará.

Las moléculas de soluto deben migrar a través de las capas limítrofes que rodean el cristal hacia la parte principal de la solución. Este paso implica el transporte de las moléculas lejos de la superficie de unión sólido-líquido hacia la parte principal de la fase líquida por difusión o convección. Los estratos limítrofes son capas de líquido estáticas o de movimiento lento que rodean todas las superficies sólidas húmedas. Se produce una transferencia de masa más lenta a través de capas estáticas o de movimiento lento, que inhiben el movimiento de las moléculas del soluto desde la superficie del sólido a la parte principal de la solución. Por consiguiente la concentración de la solución en capas limítrofes varía y pasa de la saturación en la superficie del cristal a la igualdad con la de la principal de la solución en su límite más externo. [32]

3.3. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN.

El papel del proceso de disolución en la eficiencia de una forma farmacéutica sólida (comprimido, cápsula, etc.) ha sido objeto de investigaciones en las últimas décadas. El proceso de absorción de fármacos a nivel gastrointestinal está controlado con la velocidad con que este se disuelve en los medios fisiológicos que allí se encuentran, ya que el mecanismo más generalizado de absorción es el de difusión pasiva de las moléculas disueltas, especialmente bajo su forma no ionizada, a través del epitelio gastrointestinal.^[33]

Los estudios de disolución son herramientas útiles solo si los resultados de las pruebas son consistentes. Para lograr reproducibilidad las variables que influyen la prueba deben ser altamente comprendidas y controladas en la medida posible.

La velocidad de disolución es influenciada por muchos factores. La variedad de factores que pueden afectar la velocidad de disolución *in vitro* es considerable:

1. Factores relacionados a las propiedades fisicoquímicas del fármaco:
 - Solubilidad.
 - Polimorfismo.
 - Estado amorfo y de solvatación.
 - Naturaleza Química; ácido libre, base libre o forma de sal.
 - Complejación
 - Tamaño de partícula.
 - Impurezas.

2. Factores relacionados con formulación del producto:
 - Excipientes.
 - Proceso de manufactura.
 - Tamaño de gránulo y distribución del tamaño.
 - Fuerza de compresión y velocidad de compresión (tabletas)
 - Composición y propiedades de la superficie de la cápsula.
 - Porosidad
 - Uso de recubrimiento (grajeas, formas de liberación controlada).

3. Factores relacionados con la forma farmacéutica:
 - Condiciones de almacenamiento de la forma farmacéutica.
 - Edad de la forma farmacéutica.

4. Factores Ambientales relacionados con la técnica de disolución:

- Intensidad de agitación, velocidad y tipo de fluido, factores geométricos.
- Gradiente de concentración (p.ej. la diferencia de concentración entre la solubilidad del fármaco en el medio de disolución y la concentración promedio en el seno del fluido).
- Composición del medio de disolución: pH, fuerza iónica, viscosidad, tensión superficial, etc. Todos son importantes y están determinados por la composición del medio.
- Temperatura del medio de disolución.
- Gases disueltos en el medio.^[34]

4. SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA.

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS), publicado por Gordon Amidon y *Col.s.* en 1995, se basa en un sólido fundamento científico para clasificar un fármaco considerando los parámetros de solubilidad y permeabilidad, factores estrechamente relacionados con el proceso de absorción, y plantea como objetivo, la posibilidad de establecer correlaciones *in vitro-in vivo* que permitan sustituir los ensayos realizados en humanos por ensayos de disolución *in vitro*, de acuerdo con la clasificación obtenida para el fármaco.^[35]

El sistema de clasificación biofarmacéutica esta basado en la solubilidad acuosa y en la permeabilidad intestinal del principio activo cuando las propiedades de los principios activos se evalúan en conjunto con la disolución de la forma farmacéutica, el BCS tiene en cuenta tres factores importantes que rigen la velocidad y grado de absorción del fármaco a partir de formas farmacéuticas de liberación inmediata. De acuerdo a la solubilidad y permeabilidad de la forma farmacéutica, el fármaco se ubica en una de las cuatro clases siguientes:

- Clase 1: alta solubilidad, alta permeabilidad.
- Clase 2: baja solubilidad, alta permeabilidad.
- Clase 3: alta solubilidad, baja permeabilidad.
- Clase 4: baja solubilidad, baja permeabilidad.

El uso del BCS se ha convertido en un medio para documentar la bioequivalencia sin efectuar un estudio *in vivo*.^[36]

Según sea la solubilidad o la permeabilidad del fármaco el factor limitante, se define cuál de ellas determina el proceso de absorción, lo cual permite relacionar la clasificación del fármaco con la posibilidad de establecer correlaciones *in vitro-in vivo* (CIVIV). Al momento de realizar la clasificación se

deben conocer los límites a los que se hace referencia en cada uno de los casos, tanto para la solubilidad como para la permeabilidad los cuales se encuentran establecidos por la OMS y las guías de la FDA.

- Solubilidad: se considera de alta solubilidad, cuando el fármaco en su mayor dosis (recomendada por la OMS o disponible en el mercado como forma sólida oral) es soluble en 250 mL o menos de medio acuoso en un rango de pH de 1.20 a 7.5, según la FDA, y de 1.2 a 6.8, según la OMS.
- Permeabilidad: se clasifica como altamente permeable, si la cantidad absorbida en humanos es mayor al 85%, según la OMS, y 90%, según la FDA.^[35]

Una correlación *in vitro-in vivo* es probable cuando la disolución de la forma farmacéutica es el paso limitante y el principio activo posee alta permeabilidad.

[37]

- **Clase I. Fármacos de alta solubilidad y alta permeabilidad.**

En este caso el principio activo se absorbe bien y el paso limitante de la velocidad de absorción podría ser el vaciamiento gástrico si la disolución es muy rápida.

Para formas farmacéuticas de liberación inmediata que se disuelven muy rápidamente, la velocidad de absorción estará controlada por la velocidad del vaciamiento gástrico y en este caso no se espera que se presente correlación.

- **Clase II. Fármacos de baja solubilidad y alta permeabilidad.**

En esta clase la velocidad de absorción es mayor que la de disolución, y es ésta la que controla la velocidad de absorción *in vivo* (con excepción de medicamentos con dosis muy elevadas). Para este grupo de fármacos, la absorción normalmente es más baja que para los de la clase I. Ya que los cambios de los contenidos lumbinales y de las membranas a lo largo del intestino y a que mayor porción de éste se encuentra expuesto al fármaco, el perfil de disolución determina el perfil de concentración a lo largo del intestino, durante un tiempo mucho mayor. Por tanto, el proceso de absorción ocurre durante un tiempo más prolongado. Los perfiles obtenidos son más dependientes del tipo de formulación que se tenga y de las condiciones *in vivo*, por lo que estos factores son incidentes a la hora de obtener una buena correlación. Para los medicamentos con esta clase de fármacos es posible obtener CIVIV lineales de nivel A, con medios biorrelevantes.

- **Clase III. Fármacos de alta solubilidad y baja permeabilidad.**

Para este tipo de principios activos, la permeabilidad es el paso limitante de la absorción. En este caso, tanto la velocidad como la cantidad absorbida del fármaco pueden ser muy variables, pero si la disolución es rápida esta fluctuación se deberá a la variabilidad en el TGI, los contenidos luminales y a la permeabilidad de la membrana, más que a factores dependientes de la forma farmacéutica. Es posible obtener CIVIV, según la velocidad de disolución.

- **Clase IV. Fármacos de baja solubilidad y baja permeabilidad.**

Los principios activos pertenecientes a esta clase presentan problemas significativos para una liberación oral efectiva. Difícilmente se pueden obtener CIVIV. Considerando lo explicado, finalmente es importante definir cuándo un fármaco formulado en una forma farmacéutica de liberación inmediata, de administración oral, puede ser eximido de los estudios *in vivo* (bioexención).

Esto es deseable, por ejemplo, cuando se quiere establecer una bioequivalencia o cuando se quiere demostrar que algún cambio realizado a la formulación o al proceso de manufactura no tiene marcada incidencia en la biodisponibilidad, evaluada inicialmente *in vivo*.

Al clasificar un fármaco en el BSC, se tiene la posibilidad de acceder a una bioexención, de acuerdo con su clasificación. Actualmente se puede solicitar bioexención en los siguientes casos:

1. Fármacos clasificados en la categoría 1.
2. Fármacos clasificados en la categoría 2: para aquellos que son ácidos débiles, que requieran 250 mL o menos para disolver la dosis a pH 6,8, el medicamento debe ser de disolución rápida y los perfiles de disolución entre el comparador y el comparado, muy similares en el rango de pH establecido.
3. Fármacos clasificados en la categoría 3, siempre y cuando la velocidad de disolución del medicamento (tanto el comparado como el comparador) sea muy rápida.^[35]

5. PERFILES DE DISOLUCIÓN.

La disolución de los ingredientes activos es de suma importancia para el éxito de una forma farmacéutica. Las pruebas de disolución son una herramienta para evaluar el cumplimiento de las formas de dosificación. Además los perfiles de disolución *in-vitro* pueden utilizarse para predecir modelos de correlación *in vitro-in vivo*.^[38]

Un perfil de disolución es la determinación experimental de la cantidad de fármaco disuelta a diferentes tiempos, en condiciones experimentales controladas, a partir de la forma farmacéutica. [39]

El proceso de absorción de un fármaco contenido en una forma farmacéutica sólida, después de la administración oral depende, entre otros aspectos, de la liberación del principio activo del producto y de su disolución o solubilización en las mismas condiciones fisiológicas. Debido a la naturaleza de estos factores la evaluación de la velocidad de disolución *invitro* puede ser una predicción del comportamiento *in vivo*, siempre y cuando el paso limitante para la absorción sea la disolución.

Las pruebas de disolución farmacopeicas son pruebas limite puntuales, estas únicamente evalúan la cantidad de principio activo disuelto en un tiempo de determinado y el criterio de aceptación es útil para el control de calidad del medicamento, pero no proporciona información sobre la velocidad a la cual el fármaco se disuelve.

Un perfil de disolución considera diversos tiempos de muestreo, lo que permite establecer velocidad de disolución. Para comparar los perfiles de disolución se utiliza el factor de similitud (f_2) que es un factor puntual que proviene de un modelo matemático y permite relacionar a través de una transformación logarítmica la semejanza entre los perfiles de disolución de los medicamentos de referencia y de prueba. Esta aproximación es válida bajo las siguientes consideraciones:

1. Los tiempos de muestreo son los mismos para ambos productos.
2. Al menos se tienen 3 o 4 tiempos de muestreo. La norma establece 5 tiempos para lograr la mejor caracterización de la curva.
3. Los perfiles de disolución se realizan exactamente en las mismas condiciones operacionales.
4. El coeficiente de variación del porcentaje disuelto no es mayor que el 20% para el primer tiempo de muestreo y no es mayor de 10 % para los tiempos subsecuentes.
5. La curva de disolución se evalúa en su parte ascendente y en su meseta.

Este modelo, mediante la prueba de f_2 evalúa la similitud de todo el perfil del producto de prueba en relación con el producto de referencia. Si el valor de f_2 , es igual o mayor que 50 (entre 50 y 100), los perfiles son similares; es decir; demostrar similitud de los perfiles, el valor obtenido de f_2 , no es menor que 50.

[40]

5.1. APARATOS DE DISOLUCIÓN.

El procedimiento de disolución requiere de un aparato, un medio de disolución y condiciones de prueba que provean un método discriminatorio lo suficientemente resistente y reproducible para las operaciones diarias y capaz de ser transferido a otros laboratorios. [41]

Las propiedades físicas y químicas de un fármaco, así como la formulación juegan un papel importante en la selección del aparato para la prueba de disolución, especialmente en el caso de compuestos poco solubles. [38]

Los perfiles de disolución se realizaron utilizando el aparato 4 USP, mientras que la validación del método se realizó en el aparato 2 USP.

I. APARATO 2 PALETAS.

El aparato consiste de: un vaso, con o sin tapa, de vidrio u otro material inerte y transparente; un motor; un eje propulsor metálico un elemento de agitación de paleta compuesto por un aspa y un eje. El vaso está parcialmente sumergido en un baño de agua adecuado de cualquier dimensión conveniente o recibe calor de un dispositivo adecuado, como una camisa de calentamiento. Durante el transcurso de la prueba, el baño de agua mantiene la temperatura en el interior del vaso a $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y garantizan que el fluido del baño se mantenga en movimiento suave y constante. [42]

II. APARATO 4 CELDA DE FLUJO CONTINUO.

El equipo se compone de un depósito y una bomba para el medio de disolución, una celda de flujo continuo y un baño que mantiene el medio de disolución a 37°C . La bomba desplaza el medio de disolución a través de la celda de flujo en dirección ascendente. La bomba tiene un intervalo de operación de 240 ml y 960 ml por hora y las velocidades de flujo estándares son de 4 ml, 8 ml, y 16 ml por minuto. [42]

Con el aparato de paleta o cesta el volumen se limita a la capacidad de los vasos (1, 2 o 4 L). El desarrollo de la celda de flujo continuo se produjo en un intento por proporcionar un ambiente hidrodinámico controlado y una corriente de disolvente renovable en la muestra. [43]

El Aparato 4 USP se utiliza para productos de liberación controlada permite una extracción continua del fármaco, simulando la absorción a la circulación sistémica, al generar un flujo intermitente del medio de disolución hacia la celda en donde se encuentra la forma farmacéutica a evaluar. Es posible utilizar el Aparato 4 USP como un sistema abierto que trabaja bajo condiciones "sink" o de "no saturación" lo que facilita la disolución de fármacos poco solubles.

Adicionalmente, el Aparato 4 USP permite el recambio continuo del medio de disolución a lo largo de la prueba en un intervalo de valores de pH de relevancia fisiológica. [44]

Debido a que la forma de dosificación se aísla del medio, el muestreo y los cambios no perturban la hidrodinámica dentro de la celda. [45]

El aparato de celda de flujo ha ganado aceptación reciente en el mundo de la disolución debido a su versatilidad en la prueba de nuevas formas de dosificación en la que el aparato de disolución tradicional y los métodos han fallado. Formas de dosificación que incluyen solubles y comprimidos de liberación prolongada, microesferas, suspensiones, implantes, cápsulas de gelatina blanda y polvos. [46]

5.2. CONDICIONES PRUEBA.

El procedimiento de disolución requiere de un aparato, un medio de disolución y condiciones de prueba que provean un método discriminatorio lo suficientemente resistente y reproducible para las operaciones diarias y capaz de ser transferido entre laboratorios.

I. MEDIO DE DISOLUCIÓN.

Los datos físicos y químicos para el fármaco y la unidad de dosificación deben de determinarse antes de seleccionar el medio de disolución. Dos propiedades claves del producto farmacéutico son la solubilidad y la estabilidad del fármaco en solución en función del valor de pH. Cuando se selecciona la composición del medio se debe evaluar la influencia de las soluciones amortiguadoras, el valor del pH y los surfactantes respecto a la solubilidad y estabilidad del fármaco. Las propiedades claves de la unidad de dosificación que pueden afectar la disolución incluyen el mecanismo de liberación (inmediato, retardado o modificado) y la velocidad de desintegración afectados por la dureza, la friabilidad, la presencia de potenciadores de solubilidad y otros excipientes.

Por lo general cuando se desarrolla un procedimiento de disolución, la meta es tener condiciones de exceso de medio. [41]

Las características de la disolución de una formulación oral deben evaluarse en el rango de pH fisiológico entre 1.2 y 6.8 (de 1.2 a 7.5 para las formulaciones de liberación modificada). Durante el desarrollo del método, podría ser de utilidad que se mida el pH antes y después de una corrida para determinar si el pH cambia durante la prueba. En lo posible la selección de las condiciones más adecuadas para las pruebas de rutina se basan en la capacidad de discriminación, la dureza, la estabilidad del analito en el medio de prueba y la relevancia en función del desempeño in vivo. [41]

II. VOLUMEN.

Para aparatos con canastillas o paletas, el volumen del medio de disolución normal mente se encuentra entre 500 mL a 1000 mL, siendo 900 mL el volumen más común. Puede aumentarse el volumen entre 2 y 4 L, empleando recipientes más grandes y dependiendo de la concentración y de la condición de exceso de medio del fármaco; el empleo de este procedimiento debe justificarse.

III. DESGASIFICACIÓN

Se debe determinar la importancia de la desgasificación del medio ya que las burbujas de aire pueden interferir con los resultados de la prueba al actuar como una barrera para la disolución si las burbujas están presentes en la unidad de dosificación o en la malla de la canastilla. Más aun, las burbujas pueden causar que las partículas se adhieran a las paredes del vaso y del aparato. Por otra parte, las burbujas en la unidad de dosificación pueden aumentar la flotabilidad, lo que ocasiona el aumento de la velocidad de disolución o la disminución de la superficie específica disponible produciendo una disminución en la velocidad de la disolución.

Los pasos típicos incluyen calentamiento del medio, filtración y vacío durante un corto periodo. Usualmente no se desgasifican los medios que contengan surfactantes ya que el proceso genera demasiada espuma. Para determinar si es necesario desgasificar un medio, se deben comparar resultados de las muestras de disolución corridas con un medio no desgasificado y con otro medio desgasificado. [41]

Un método para eliminar los gases disueltos es el siguiente: calentar: el medio, mezclando suavemente hasta aproximadamente 41°C; inmediatamente filtrar al vacío utilizando un filtro con tamaño de poro de 0.45 µm o menor, mezclando vigorosamente y continuar mezclando al vacío durante aproximadamente 5 minutos. También se puede emplear otra técnica de desgasificación validada para eliminar los gases disueltos. [42]

IV. ENZIMAS

El uso de enzimas en el medio de disolución esta permitido cuando la disolución no cumpla con los requisitos debido al entrecruzamiento en cápsulas de gelatina o productos con cubiertas de gelatina. [41]

Si se trata de cápsulas de gelatina dura o blanda, o de tabletas recubiertas con gelatina que no cumplen con las especificaciones de disolución, repetir la prueba del siguiente modo: cuando se especifique agua o un medio con un pH

inferior a 6.8 como medio en la monografía individual, se puede emplear el mismo medio especificado agregando pepsina purificada de forma que la actividad resultante sea igual o menor a 750000 unidades por 100 ml. Para medios con un pH igual o mayor a 6.8 se puede agregar pancreatina de forma que la actividad de proteasa sea de no más de 1750 unidades USP por 100 ml.

[42]

6. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

Los estudios de validación son aplicables a las pruebas analíticas, los equipos, los sistemas y servicios del establecimiento (como aire, agua, vapor) y procesos (como el de fabricación, limpieza, esterilización, llenado estéril, liofilización, etc.).

El proceso de validación exige el tratamiento estadístico para el manejo y análisis de los datos permitiendo juicios con criterio que llevan a una correcta evaluación. Para hablar de validación es necesario conocer su significado. [2]

Los métodos analíticos utilizados para evaluar la calidad de los productos farmacéuticos, están sujetos a varios requisitos de acuerdo con la normatividad vigente, así como, con otros documentos normativos nacionales e internacionales. [46]

La guía del colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos define un método analítico como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico (analito) de una muestra. La validación es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; esta actividad se justifica por los siguientes aspectos:

- Moral y Ética.
- Aseguramiento de calidad.
- Económica.
- Regulatoria. [47]

FDA define la validación de métodos como el proceso por el cual se demuestra que los procedimientos analíticos son aptos para el uso adecuado.

La USP define la validación de un procedimiento analítico como el proceso que se establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. [48]

El objeto de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que es adecuado para la finalidad prevista, determinada por medio de pruebas experimentales bien documentadas. [49]

6.1. TIPOS DE VALIDACIÓN

Para validar un proceso, es indispensable disponer de un diseño experimental apropiado, de una metodología adecuada y de un tratamiento estadístico apropiado a los datos obtenidos experimentalmente. Esta metodología debe ser aplicada a cada uno de los factores críticos contemplados dentro del proceso productivo. [49]

I. PROSPECTIVA

Esta se lleva a cabo durante el proceso de desarrollo y es el resultado de un análisis de riesgo en el proceso de producción. Se basa en la planificación o plan maestro, en donde se detallan y estudian todos los pasos a realizar, desde lotes de producción a escala piloto, hasta el primer lote de fabricación industrial. La validación prospectiva de un proceso, conlleva previamente a asegurar formalmente que ciertas operaciones y procedimientos han sido terminados satisfactoriamente. [2]

Consiste en establecer evidencia documentada de que un proceso cumple con sus propósitos basados en un protocolo experimental de validación pre planeado. Este tipo de validación se asume normalmente siempre que una nueva fórmula, proceso y/o instalaciones deben ser validados antes de iniciar la rutina de producción. [49].

Se realiza antes de que el producto salga al mercado y demuestra que las operaciones se encuentran bajo control.

II. CONCURRENTE

Se define como el establecimiento de un programa documentado que proporciona con un alto grado de seguridad de que un proceso específico producirá consistentemente una forma farmacéutica que lleva las especificaciones predeterminadas y los atributos de calidad y que se sustenta en datos o información obtenidos a partir de un proceso que se encuentra en marcha, o en el cual se ha introducido alguna variación. Se realiza cuando un producto se fabrica industrialmente para su salida comercial. [2]

La validación concurrente está basada en los datos recogidos durante la ejecución efectiva de un proceso que ya se ha implementado en una planta de producción. En esta situación, los datos de validación se reúnen durante varios

ciclos del proceso continuo y se evalúan para determinar si éste es válido. Se debe redactar un protocolo para definir la información que ha de recogerse y evaluarse. Este método puede ser adecuado para los fabricantes que llevan mucho tiempo establecidos y que tienen un proceso de fabricación bien controlado. [50]

III. RETROSPECTIVA

Es la que se realiza para un producto que ya se viene fabricando habitualmente, cuyo proceso no ha sufrido cambios que obliguen a su revalidación y que se efectúa a través del estudio y análisis de datos históricos del producto y del proceso. [2]

Establece evidencia documentada basada sobre la revisión y análisis de información histórica, el objetivo es demostrar que un proceso se ha desarrollado satisfactoria y consistentemente a través del tiempo y promete seguir dando productos de calidad.

Si un producto se ha venido produciendo por largo tiempo pero no se ha validado de conformidad con un protocolo prospectivo, en algunos casos puede efectuarse una validación retrospectiva cuando la validación concurrente no constituye una opción realista (por ejemplo si existe vacuna a granel almacenada durante varios años, o si puede contarse con establecimientos empleados en una campaña distinta). Es posible examinar y analizar evaluaciones del producto y de los procesos de fabricación y de prueba para demostrar la uniformidad e integridad de los procedimientos y procesos.

Generalmente esta forma de validación no se acepta por varios motivos: la falta de protocolos de validación suele indicar falta de documentación, y con frecuencia los datos corresponden únicamente a la indicación de aprobado o rechazado, lo que no permite efectuar análisis estadísticos basados en datos numéricos.

En lo que respecta a las pruebas analíticas, es posible analizar retrospectivamente los valores de referencia y testigos de muchas pruebas cuando están bien documentados los números de lote y cualquier cambio que afecte a los parámetros de prueba, los operadores o el equipo. Si se cuenta con datos suficientes, se puede practicar la validación retrospectiva de una valoración analítica. [50]

IV. REVALIDACIÓN

Se puede dividir en dos categorías:

- Debido a cambios significativos sobre la calidad del producto.
- Periódica, se efectúa a intervalos programados de tiempo.^[2]

6.2. CLASIFICACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

Los métodos analíticos son usados para determinar la potencia de ingredientes activos, niveles de impurezas o productos de degradación, etc. La calidad de los métodos analíticos requiere la demostración apropiada de que cumple con linealidad, exactitud, precisión, especificidad, sensibilidad y tolerancia del método ^[2]

Los Métodos analíticos para fines de validación se clasifican en cuatro categorías, ya que requieren de diferentes esquemas de estudio:

- **Categoría I.** Métodos analíticos para cuantificar a un componente específico en muestras de producto terminado o en pruebas de estabilidad, ya sea en fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos, u otros analitos de interés (conservadores, solventes, etc.).
- **Categoría II.** Métodos analíticos para la determinación de impurezas (productos de degradación, sustancias relacionadas, isómeros ópticos, etc.) en muestras de fármacos, preparados farmacéuticos y aditivos. Estos métodos pueden incluir determinaciones cuantitativas pruebas límite. En estas últimas, el interés es establecer si el analito, excede o no, un valor límite. Los métodos de pureza quedan incluidos en esta categoría.
- **Categoría III.** Métodos analíticos utilizados en la determinación de un analito en una muestra con el objeto de evaluar una característica de desempeño del preparado farmacéutico (disolución en cápsulas, liberación controlada en tabletas, entre otras).
- **Categoría IV.** Pruebas de identificación de un analito en muestras de fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos, cuyo propósito es establecer la presencia del analito de interés. ^[40]

Tabla 6. Características de desempeño de métodos analíticos en base a su categoría de acuerdo a la USP 38.

Característica de desempeño	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis Cuantitativo	Pruebas límite		
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	No	Si	Si	*	Si
Límite de detección	No	No	Si	*	No
Límite de cuantificación	Si	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No

*puede requerirse dependiendo de la naturaleza de la prueba específica. [48]

6.3. PARÁMETROS DE DESEMPEÑO.

El sistema se refiere a los parámetros de validación con el fármaco, mientras que el método se refiere a los parámetros de validación con el medicamento.

A continuación se encuentra la definición de los parámetros de desempeño considerados para la validación del método analítico de acuerdo a la Guía Nacional del Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos, la NOM-177-SSA1-2013 y la guía ICH Q2 (R1).-[39][47][52]

I. LINEALIDAD.

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad (dentro de un intervalo dado) para obtener resultados de ensayo que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en la muestra.

La capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener una respuesta proporcional a la concentración del compuesto en la muestra.

II. PRECISIÓN.

Al grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea; se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.

III. EXACTITUD.

Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.

IV. REPETIBILIDAD.

Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y métodos.

V. REPRODUCIBILIDAD.

Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios. Precisión bajo las variaciones que comúnmente pueden ocurrir dentro del laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos.

VI. LÍMITE DE DETECCIÓN.

Concentración mínima del analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada.

IV. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.

Concentración mínima del analito que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables. El límite de cuantificación es un parámetro de ensayos cuantitativos para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y se utiliza particularmente para la determinación de impurezas y / o productos de degradación.

V. INFLUENCIA DEL FILTRO.

Determinar que no exista adherencia del fármaco al filtro.

VI. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

Propiedad de una muestra preparada, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse por un tiempo y condiciones determinadas.

VII. SELECTIVIDAD

La selectividad es la capacidad para evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes. Típicamente pueden incluir impurezas, degradantes, matriz, etc.

Se debe demostrar la selectividad del método para el fármaco ante otros componentes de la muestra, cualquier interferencia no debe producir un error mayor al aceptado en precisión y exactitud.

La validación se realizó en base a lo establecido en la NOM-177-SSA1-2013, y la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C. Tomando en cuenta las características de desempeño establecidos en la tabla número 7.

Tabla 7. Características de desempeño y criterios de aceptación para métodos espectrofotométricos según la NOM-177-SSA1-2013 y la Guía de Validación del Colegio de QFB's.

Características de Desempeño	Criterios de Aceptación	Criterio de Evaluación
Linealidad del sistema	Coeficiente de correlación (r)	$r > 99$
	Coeficiente de determinación (r^2)	$r^2 > 98$
	IC (β_1) intervalo de confianza de la pendiente	(β_1) no debe incluir cero.
	Coeficiente de variación (CV)	CV < 2%
Precisión del sistema.	Coeficiente de variación (CV) del factor de respuesta	CV < 2%
Linealidad del método	Coeficiente de correlación (r)	$r > 99$
	Coeficiente de determinación (r^2)	$r^2 > 98$
	IC (β_0) intervalo de confianza de la ordenada al origen.	(β_0) debe incluir el cero
	IC (β_1) intervalo de confianza de la pendiente.	(β_1) debe incluir la unidad.
	IC(μ) Intervalo de confianza de la media ó Promedio aritmético de recobro	IC(μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético de recobro sea de 98-102%
	Coeficiente de variación (CV)	CV < 3% NOM CV _{y/x} < 2% QFB
Precisión	Coeficiente de variación (CV) del porcentaje cuantificado	CV < 2%

Características de Desempeño.	Criterios de Aceptación	Criterio de Evaluación
Exactitud	IC(μ) Intervalo de confianza de la media ó Promedio aritmético de % recobro	IC(μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo de 98-102 %
	CV del porcentaje de recobro.	CV<3% NOM
Repetibilidad y Reproducibilidad.	IC(μ) Intervalo de confianza de la media Promedio aritmético del % recobro	IC(μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo de 98-102%
	Coefficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro.	CV<2%
Influencia del filtro	Diferencia absoluta de los datos de solución filtrada y sin filtrar.	Diferencia absoluta <2%
Estabilidad de la muestra	Diferencia absoluta del porcentaje cuantificado en el análisis inicial y final.	Diferencia absoluta <3%
Límite de Detección y Cuantificación	Coefficiente de correlación(r^2)	$r^2 > 0.98$
	IC(b_1) intervalo de confianza de la pendiente	IC (b_1) debe incluir la unidad.
Selectividad	Se debe demostrar la selectividad para el fármaco ante los componentes de la muestra	Cualquier interferencia no debe producir un error mayor al aceptado en precisión y exactitud

MATERIAL
Y
METODOLOGÍA
EXPERIMENTAL

MATERIAL Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

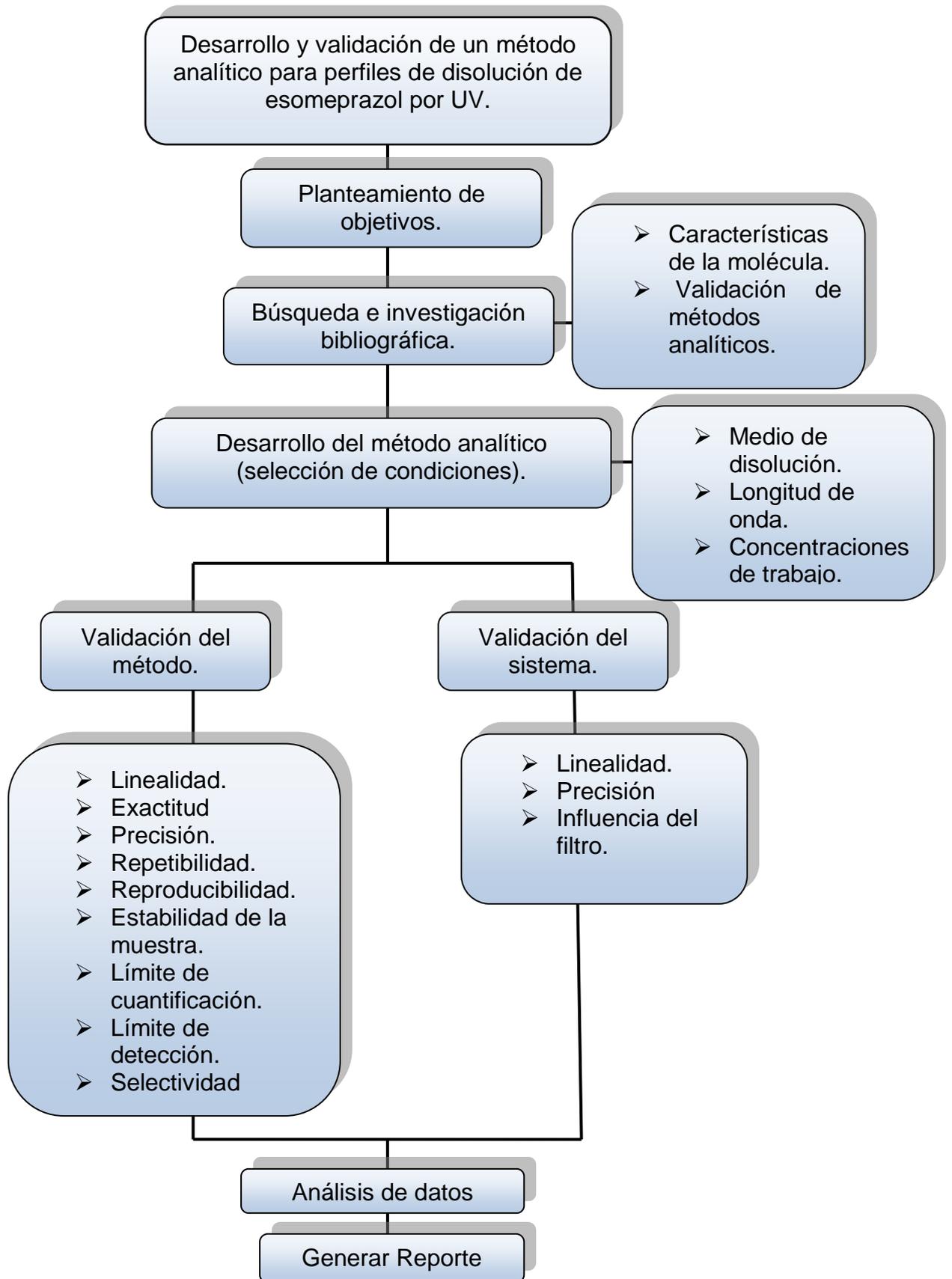


Figura 3. Diagrama general de trabajo.

UNAM FES CUAUTITLÁN MATERIAL Y METODOLOGÍA
EXPERIMENTAL

1. REACTIVOS, MATERIAL, INSTRUMENTOS Y EQUIPOS

Tabla 8. Producto analizado.

Producto	Marca	Lote	Pureza
NEXIUM-MUPS Tabletas de esomeprazol magnésico trihidratado 40 mg.	AstraZeneca.	72425	NA
Esomeprazol magnésico trihidrato, Materia prima.	Hetero	ET0020116	89.79%

Tabla 9. Reactivos y sustancias.

Reactivo/ Sustancia	Proveedor	Lote	Numero Cas
Fosfato monobásico de Potasio.	J.T. Baker	3246-05	77778-77-0
Hidróxido de sodio.	Macron Chemicals	7708-06	1310-73-2
Metanol.	J.T. Baker	9093-03	67-56-1

Tabla 10. Equipos e Instrumentos.

Nombre	Marca	Modelo	No. de inventario	No. de Serie
Balanza Analítica	Mettler- Toledo	AB204-S	UNAM 1908788	1119430155
Potenciómetro- conductímetro.	Mettler- Toledo	Seven Multi	UNAM 02228926	1227257138
Espectrofotómetro UV-VIS	Varian	Cary 100	UNAM 2077800	EL05043015
Sistema Milli-Q	Millipore	MQ Reference	UNAM 02323315	FOMA61689A
Disolutor Aparato 2 USP	Vankel	VK 7000	UNAM 02335153	146890998
Agitador Magnético.	IKA	Ika-Werke RO 10	UNAM 02382409	-

UNAM FES CUAUTITLÁN MATERIAL Y METODOLOGÍA
EXPERIMENTAL

Para la cuantificación de esomeprazol se utilizó esomeprazol magnésico trihidrato, por lo cual se realizaron los cálculos correspondientes para ajustar el peso de sal equivalente esomeprazol.

Tabla 11. Equivalencias de distintas sales de esomeprazol.

		Peso molecular (g/mol).						Peso molecular total	% Esomeprazol
		Esomeprazol	Esomeprazol	Magnesio	Agua	Agua	Agua		
Sal de Esomeprazol	Esomeprazol	345.416	-	-	-	-	-	345.41	1.0000
	Esomeprazol Magnésico	344.41	344.4	24.30	-	-	-	713.13	0.9659
	Esomeprazol Magnésico* 3H ₂ O	344.41	344.4	24.30	18	18	18	767.13	0.8979

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

2.1. DETERMINACIÓN DE LONGITUD DE ONDA.

En el desarrollo del método de análisis para la cuantificación de contenido disuelto de esomeprazol a partir de perfiles de disolución de tabletas se inicio por una investigación documental para conocer las características del analito.

Los perfiles de disolución se realizan en búfer de fosfatos pH 6.8 como lo indica la USP, por lo cual la determinación de la longitud de onda se realiza en este medio en la región ultravioleta de 200-400 nm. Para determinar la longitud de onda máxima se utilizó esomeprazol materia prima.

ESOMEPRAZOL MATERIA PRIMA

1. Pesar la materia prima equivalente a 25 mg de esomeprazol disolver con 4 ml de metanol manteniendo en agitación por 2 minutos, transferir a un matraz volumétrico de 100 ml y llevar a la marca de aforo con medio de disolución para tener una concentración de 250 µg/ml.
2. Tomar una alícuota de 4 ml, transferirla a un matraz volumétrico de 25 ml y llevar a la marca de aforo con medio de disolución.
3. Determinar el espectro de absorción de 200 a 400 nm utilizando como blanco medio.
4. Seleccionar longitud de onda máxima.

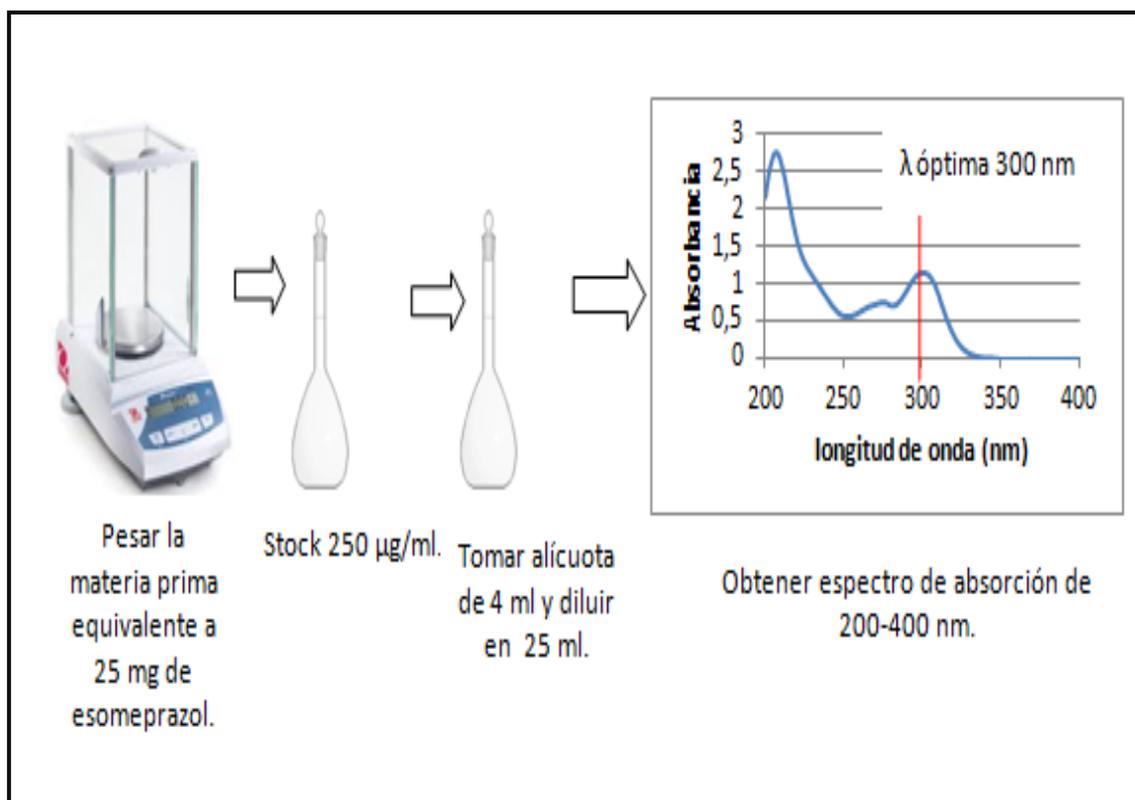


Figura 4. Diagrama para la determinación de longitud de onda de máxima absorción de esomeprazol en búfer de fosfatos pH 6.8.

2.2. VALIDACIÓN DEL SISTEMA.

LINEALIDAD.

Se realizó una curva de calibración del sistema con concentraciones de 8-40 µg/ml con 5 puntos de concentración utilizando búfer de fosfatos pH 6.8 como medio de disolución.

1. Pesar la materia prima equivalente a 40 mg de esomeprazol y disolver con 4 ml de metanol manteniendo en agitación por 2 minutos, transferir a un matraz volumétrico de 200 ml y llevar a la marca de aforo con medio de disolución. La solución stock obtenida será de 200 µg/ml de esomeprazol.
2. De la solución stock tomar alícuotas de 1, 2, 3, 4 y 5 ml y transferir cada una a un matraz volumétrico de 25 ml llevar a la marca de aforo con medio, realizar por triplicado. En la tabla número 12 se muestran las diluciones correspondientes.
3. Leer sistemas a 300 nm

Tabla 12. Diluciones para la curva de calibración del sistema.

Solución Stock	No. de Sistema	Vol. Alícuota (ml)	Vol. Aforo (ml)	Conc. final de sistema (µg/mL)
200 µg/ml	1	1	25	8
	2	2	25	16
	3	3	25	24
	4	4	25	32
	5	5	25	40

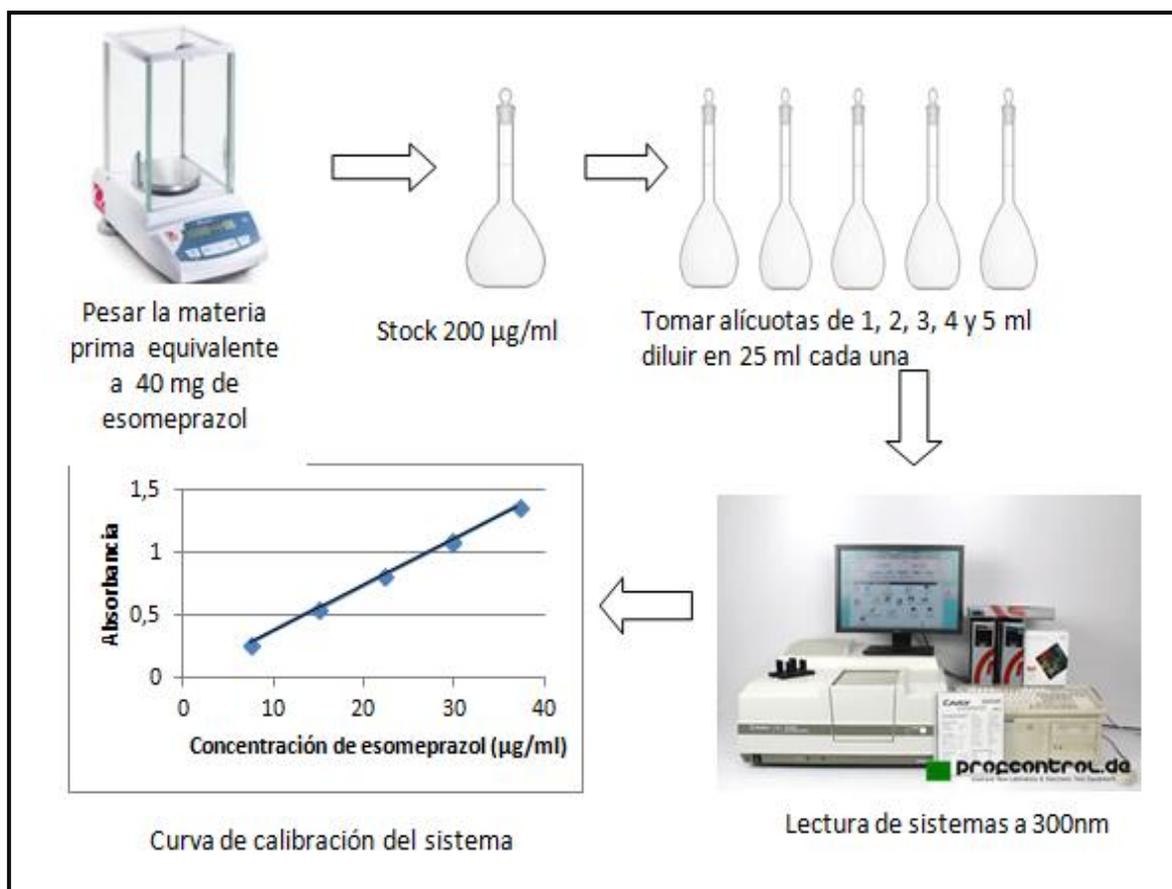


Figura 5. Diagrama para la curva de calibración del sistema.

PRECISIÓN.

La precisión se evaluó con tres niveles de concentraciones dentro de la curva por sextuplicado.

1. Pesar la materia prima equivalente a 25 mg de esomeprazol y disolver con 4 ml de metanol manteniendo en agitación por 2 minutos, transferir a un matraz volumétrico de 100 ml, y llevar a la marca de aforo con medio de disolución. La solución stock obtenida será de 250 µg/ml de esomeprazol.

UNAM FES CUAUTITLÁN MATERIAL Y METODOLOGÍA
EXPERIMENTAL

2. De la solución stock tomar alícuotas de 1, 2 y 3 ml y transferir cada una a un matraz volumétrico de 25 ml, llevar a volumen de aforo con medio, realizar por sextuplicado. La tabla número 13 muestra las diluciones correspondientes.
3. Leer cada sistema a 300 nm.

Tabla 13. Diluciones para evaluar precisión del sistema.

Solución Stock	No. de Sistema	Vol. Alícuota (ml)	Vol. Aforo (ml)	Conc. final de sistema (µg/mL)
250 µg/ml	1	1	25	10
	2	2	25	20
	3	3	25	30

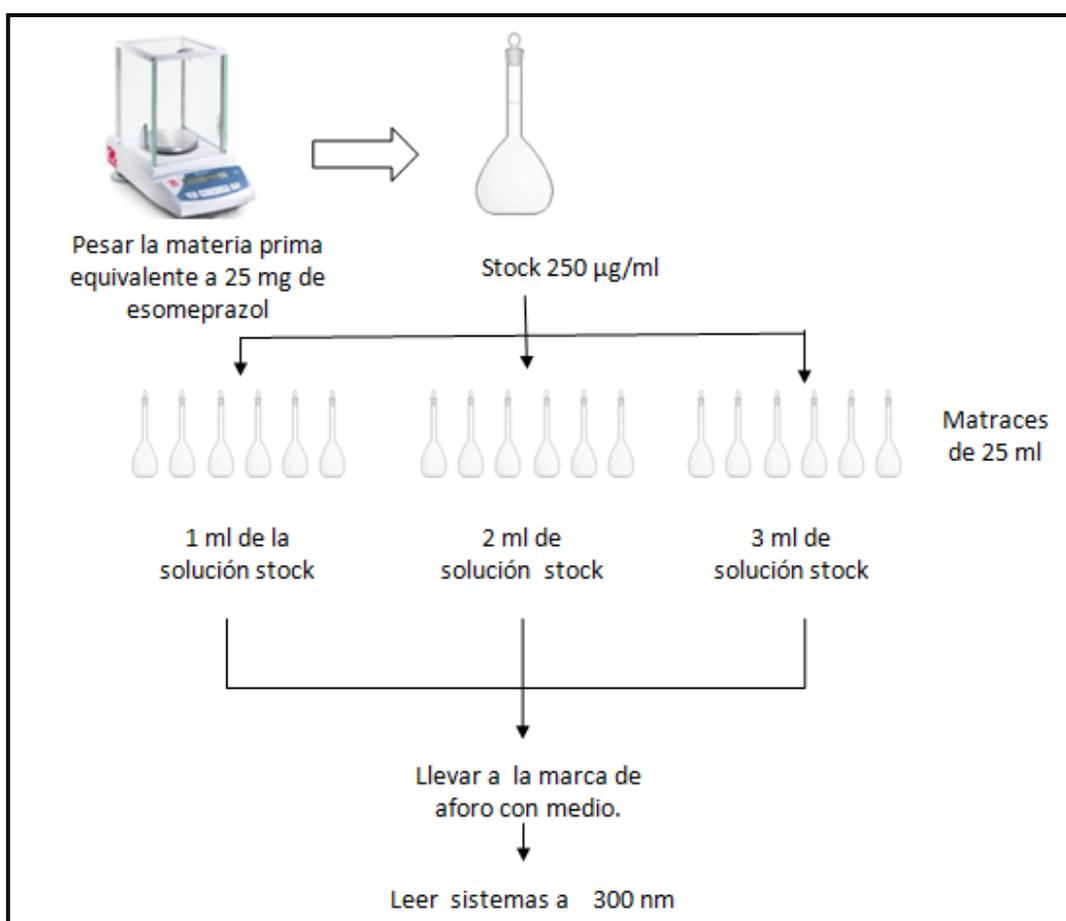


Figura 6. Diagrama para evaluar precisión del sistema.

INFLUENCIA DEL FILTRO.

Para demostrar que no existe adherencia del fármaco al filtro se utilizaron dos niveles de concentración los cuales se leyeron por sextuplicado antes y después de ser filtrados por vacío utilizando papel whatman 540.

UNAM FES CUAUTITLÁN MATERIAL Y METODOLOGÍA
EXPERIMENTAL

1. Pesar la materia prima equivalente a 25 mg de esomeprazol disolver con 4 ml de metanol manteniendo en agitación por 2 minutos, transferir a un matraz volumétrico de 50 ml, y llevar a la marca de aforo con medio de disolución. La solución stock obtenida será de 500 µg/ml.
2. De la solución stock tomar alícuotas de 2 ml y 8 ml, transferir cada una a un matraz volumétrico de 100 ml llevar a volumen de aforo con medio.
3. Leer 6 alícuotas de cada sistema a 300 nm.
4. De cada sistema tomar 6 alícuotas y filtrar por vacío utilizando papel whatman 540 cada una, leer cada alícuota.

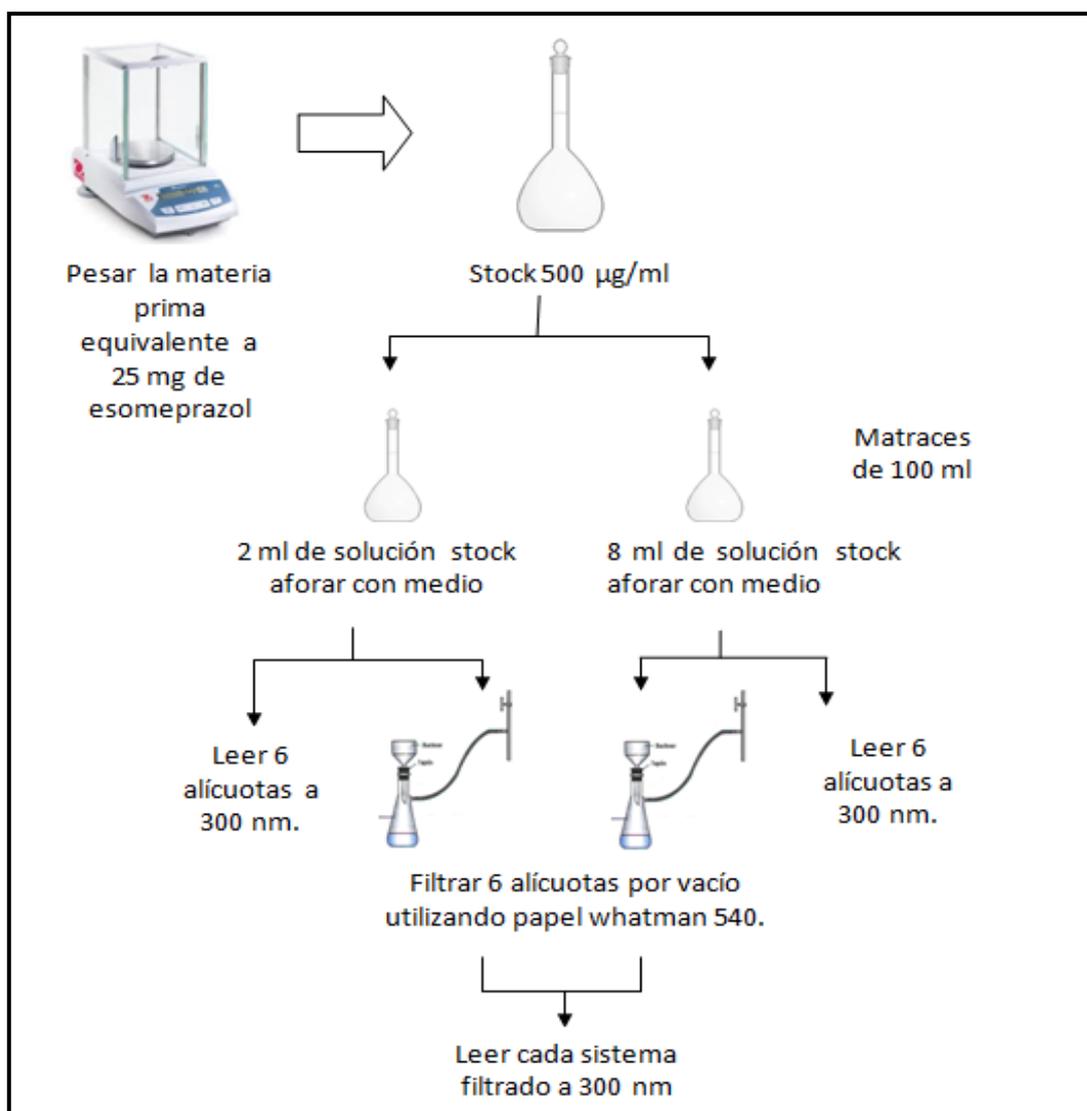


Figura 7. Diagrama para evaluar influencia del filtro.

2.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

LINEALIDAD

Se realizó una curva de calibración del método de 10-50 µg/ml de concentración con 5 puntos de concentración utilizando búfer de fosfatos pH 6.8 como medio de disolución.

Para la linealidad del método se tomaron cinco niveles de concentración, realizándolo por triplicado.

1. Para la solución stock pesar la materia prima equivalente a 62.5 mg de esomeprazol disolver con 5 ml de metanol manteniendo en agitación por 5 minutos, transferir a un matraz volumétrico de 50 ml y llevar a la marca de aforo con medio. La solución obtenida será de 1250 µg/ml.
2. De la solución stock tomar alícuotas de 2, 4, 6, 8 y 10 ml llevar transferir cada una a un matraz volumétrico de 50 ml. La tabla número 14 muestra las diluciones correspondientes.

Tabla 14. Diluciones para las soluciones stock de la curva de calibración del método.

Solución stock	No. de sistema	Volumen de alícuota (ml)	Volumen de aforo (ml)	Conc. final del sistema. (µg/ml)
1250 µg/ml	1	2	50	50
	2	4	50	100
	3	6	50	150
	4	8	50	200
	5	10	50	250

3. Colocar 1 tableta de esomeprazol en 900 ml de medio en el aparato 2 USP a 75 rpm, 37.5 °C por 50 minutos, filtrar el medio a vacío utilizando papel whatman 540 una vez terminado el tiempo de la prueba.
4. En matraces volumétricos de 25 ml adicionar el mismo volumen 5 ml de cada uno de los sistemas indicados en la tabla no 14 (concentraciones 50, 100, 150, 200 y 250 µg/ml) y adicionar 5 ml de medio filtrado proveniente del aparato 2 USP, llevar a la marca de aforo con medio. Realizar por triplicado.
5. Preparar un blanco adicionando 5 ml de medio proveniente del aparato 2 USP en un matraz volumétrico de 25 ml y llevar a la marca de aforo con medio.
6. Leer cada sistema en el espectrofotómetro a 300 nm.

UNAM FES CUAUTITLÁN MATERIAL Y METODOLOGÍA
EXPERIMENTAL

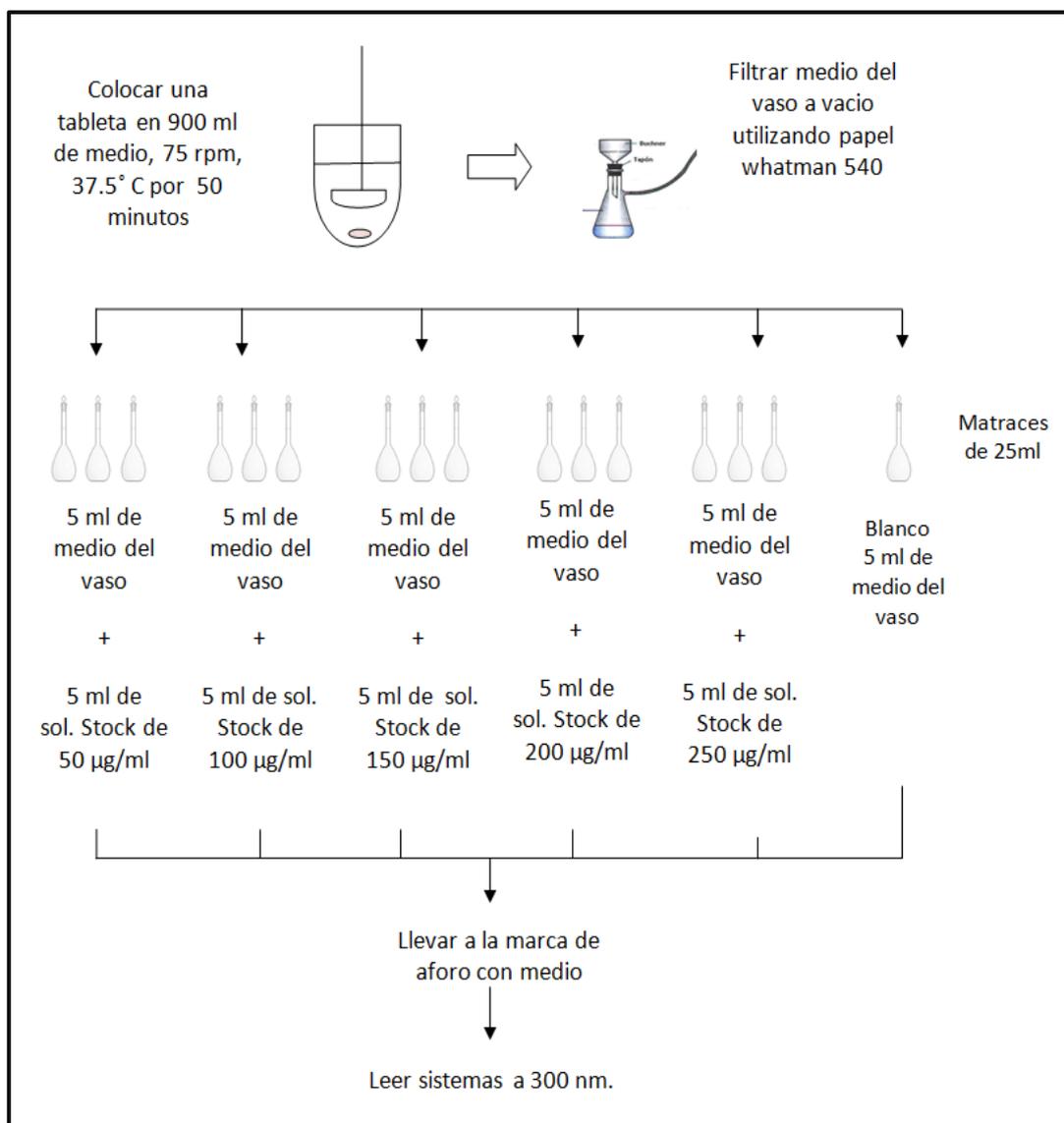


Figura 8. Diagrama para la curva de calibración del método.

EXACTITUD Y PRECISIÓN.

Para evaluar exactitud y precisión del método se tomaron tres niveles de concentración, realizándolo por sextuplicado.

1. Para la solución stock pesar la materia prima equivalente a 62.5 mg de esomeprazol disolver con 4 ml de metanol manteniendo en agitación por 5 minutos, transferir a un matraz volumétrico de 50 ml y llevar a la marca de aforo con medio. La solución obtenida será de 1250 µg/ml.
2. De la solución stock tomar alícuotas de 2, 4 y 6 ml llevar transferir cada una a un matraz volumétrico de 50 ml. La tabla número 15 muestra las diluciones correspondientes.

UNAM FES CUAUTITLÁN MATERIAL Y METODOLOGÍA
EXPERIMENTAL

Tabla 15. Diluciones para las soluciones stock de exactitud y precisión del método.

Solución stock	No. de sistema	Volumen de alícuota (ml)	Volumen de aforo (ml)	Conc. final del sistema. (µg/ml)
1250 µg/ml	1	2	50	50
	2	4	50	100
	3	6	50	150

3. Colocar 1 tableta de esomeprazol en 900 ml de medio en el aparato 2 USP a 75 rpm, 37.5 °C por 50 minutos, filtrar el medio a vacío utilizando papel whatman 540 una vez terminado el tiempo de la prueba.
4. En matraces volumétricos de 25 ml adicionar el mismo volumen 5 ml de cada uno de los sistemas indicados en la tabla no 15 (concentraciones 50, 100 y 150 µg/ml) y adicionar 5 ml de medio filtrado proveniente del aparato 2 USP, llevar a la marca de aforo con medio. Realizar por sextuplicado.
5. Preparar un blanco adicionando 5 ml de medio proveniente del aparato 2 USP a un matraz volumétrico de 25 ml y llevar a la marca de aforo con medio.
6. Leer cada sistema en el espectrofotómetro a 300 nm.

UNAM FES CUAUTITLÁN MATERIAL Y METODOLOGÍA
EXPERIMENTAL

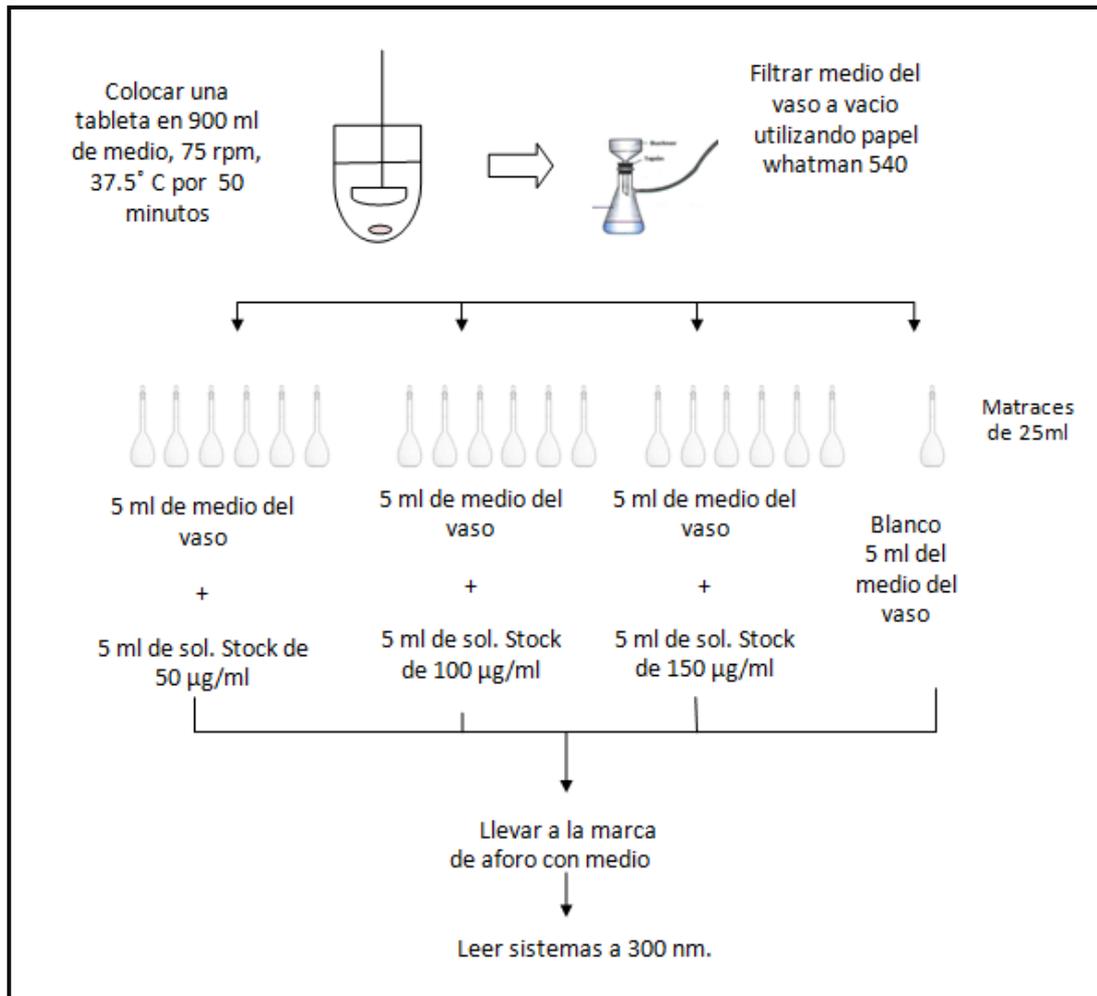


Figura 9. Diagrama para exactitud y precisión del método.

REPETIBILIDAD.

Repetibilidad se evaluó mediante determinaciones independientes, en diferentes días por un solo analista utilizando el mismo método e instrumentos. Se utilizó el mismo procedimiento seguido para evaluar exactitud y precisión, realizado por triplicado.

REPRODUCIBILIDAD.

Reproducibilidad se evaluó mediante determinaciones independientes, en diferentes días por diferente analista utilizando el mismo método e instrumentos. Se utilizó el mismo procedimiento seguido para evaluar exactitud y precisión, realizado por triplicado.

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN.

Son posibles varios enfoques para determinar el límite de detección. En este caso se calcularon en base a la desviación estándar de la respuesta y la pendiente. [52]

De la curva de calibración del método, se tomaron dos parámetros: la pendiente (b_1) y la desviación estándar del intercepto (S_{b_0}).

El límite de detección puede expresarse como:

$$LD = \frac{3.3 \times S_{b_0}}{b_1}$$

El límite de cuantificación puede expresarse como:

$$LQ = \frac{10 \times S_{b_0}}{b_1}$$

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

1. Determinar el peso promedio de las tabletas, pulverizar utilizando un mortero.
2. Pesar el polvo de tableta equivalente a 50 mg de esomeprazol y disolver con 5 ml de metanol manteniendo en agitación por 5 minutos y adicionando 20 ml de medio.
3. Filtrar a vacío utilizando papel filtro whatman 540, transferir la solución a un matraz volumétrico de 100 ml, llevar a la marca de aforo con medio.
4. Tomar tres alícuotas de 20 ml y transferir cada una a un matraz volumétrico de 100 ml, llevar a la marca de aforo con medio. Someter cada sistema a una condición diferente, temperatura ambiente y luz, temperatura ambiente sin luz y refrigeración (7.5°C).
5. Leer cada sistema a 300 nm a los siguientes tiempos: 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300, 360 y 1440 minutos (24 horas).

UNAM FES CUAUTITLÁN MATERIAL Y METODOLOGÍA
EXPERIMENTAL

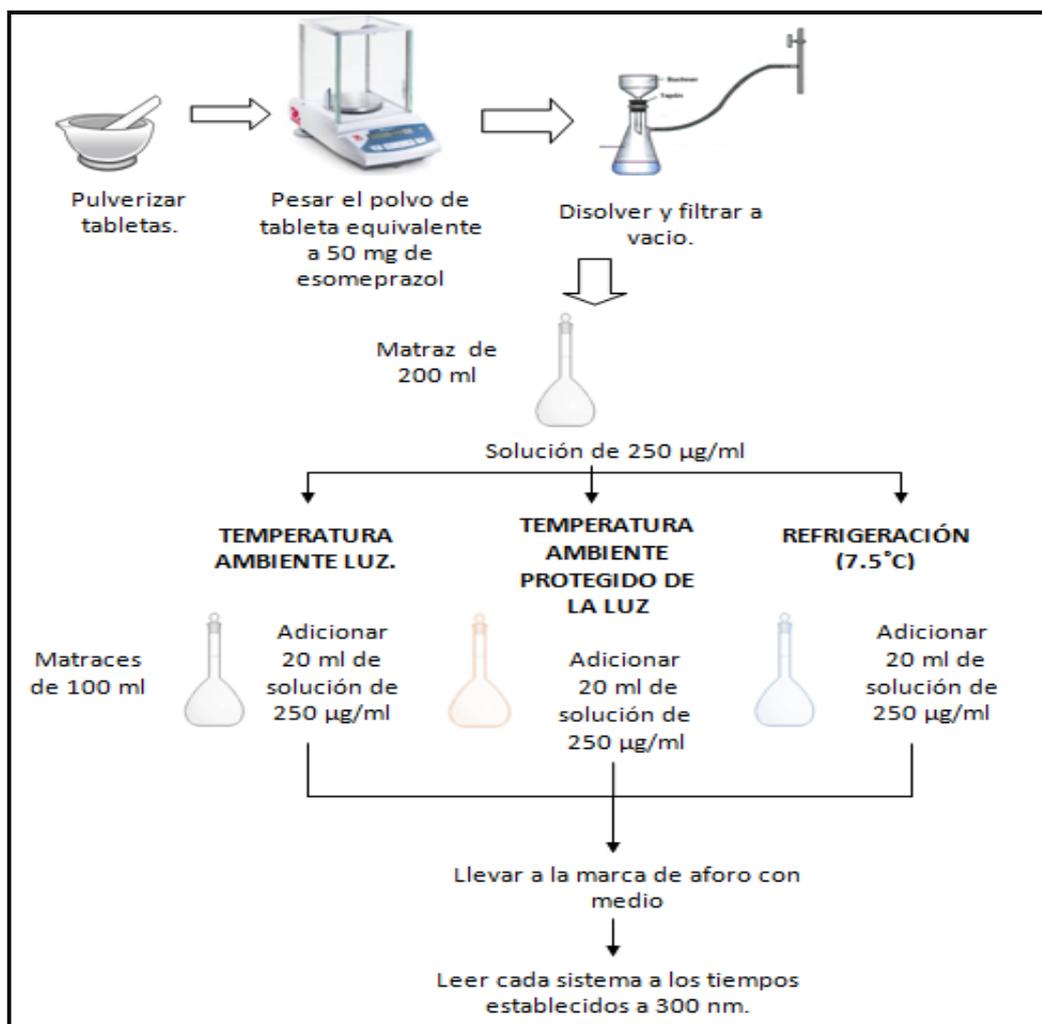


Figura 10. Diagrama para evaluar estabilidad de la muestra.

SELECTIVIDAD

Se evalúa estableciendo las posibles sustancias presentes, adicionando cantidades conocidas de éstas, solas o combinadas a la muestra para evaluar su respuesta bajo las mismas condiciones de análisis. Se pueden realizar placebos del producto. En este caso se desconocen los excipientes de la tableta por lo cual se evalúo de la siguiente manera.

Preparar dos sistemas de la misma concentración dentro de la curva partiendo de materia prima y de tableta para cada uno, obtener su espectro de absorción en la región ultravioleta.

La NOM-177-SSA1-2013 indica que cuando un método es exacto y preciso se considera selectivo

RESULTADOS

Y

DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. SELECCIÓN DE LONGITUD DE ONDA.

En la figura número 11 se muestra el comportamiento espectrofotométrico de esomeprazol en búfer de fosfatos a una concentración de 40.12 $\mu\text{g/ml}$.

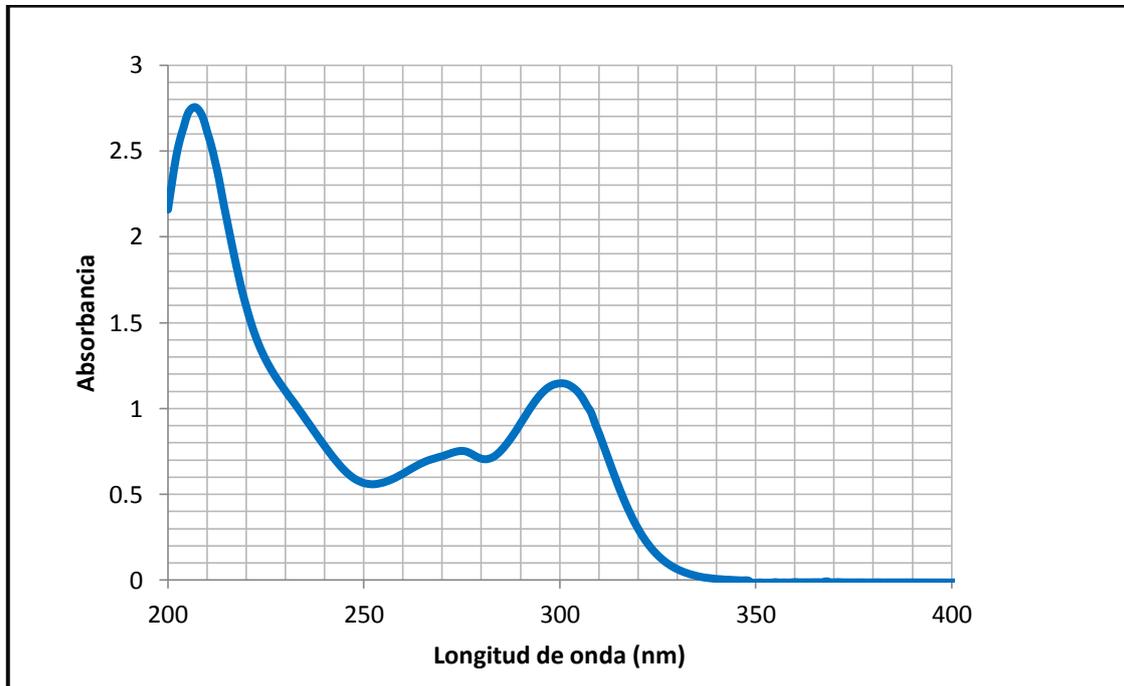


Figura 11. Espectro de absorción de esomeprazol a una concentración de 40.12 $\mu\text{g/ml}$ en la región ultravioleta en búfer de fosfatos pH 6.8.

En diversas fuentes se reporta una longitud de onda para esomeprazol entre 300 y 302 nm. En este caso se observa un pico a 300 nm, por lo cual todas las lecturas se determinarían a esta longitud.

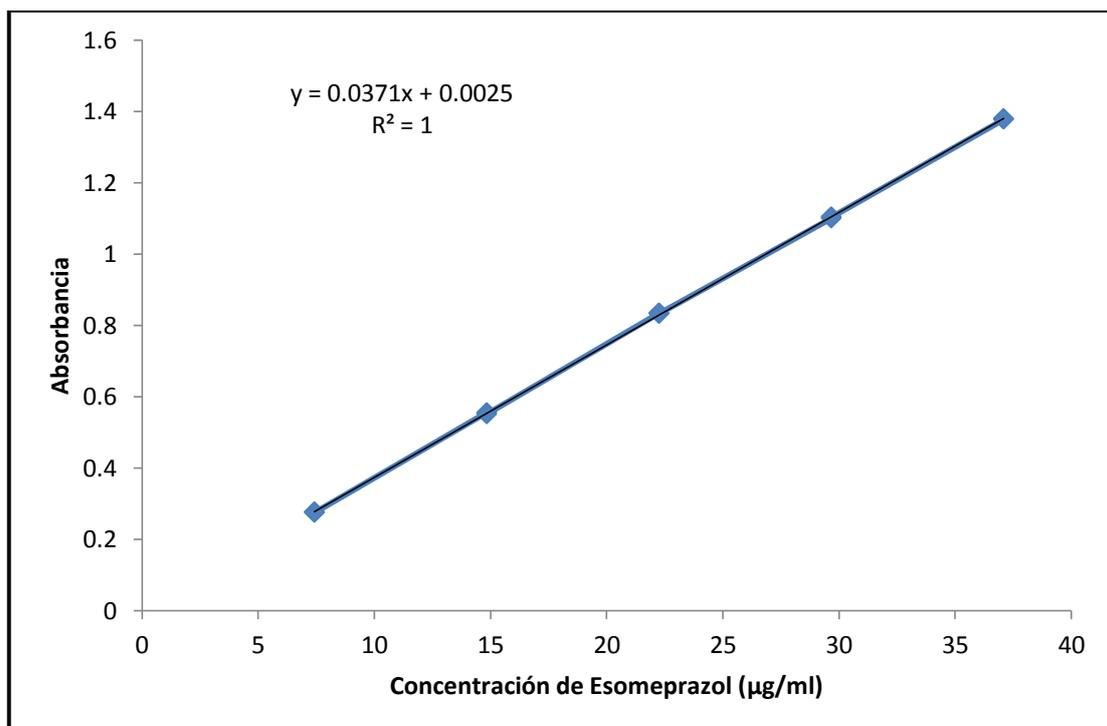
2. RESULTADOS VALIDACIÓN SISTEMA.

LINEALIDAD.

La linealidad del sistema se evaluó utilizando 5 niveles de concentración intervalo de de 8 a 40 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 16. Resultados linealidad del sistema.

Sistema	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia	Constante de proporcionalidad
1	8.0272	0.3011	0.0375
		0.3017	0.0376
		0.3009	0.0375
2	16.0545	0.6003	0.0374
		0.5913	0.0368
		0.6021	0.0375
3	24.0817	0.8963	0.0372
		0.8992	0.0373
		0.8979	0.0373
4	32.1089	1.1913	0.0371
		1.1974	0.0373
		1.1981	0.0373
5	40.1361	1.4927	0.0372
		1.4915	0.0372
		1.4947	0.0372
		Promedio	0.0373
		S	0.0002
		CV	0.5125 %

Figura 12. Curva de calibración del sistema para esomeprazol de 8-40 $\mu\text{g/ml}$ en búfer de fosfatos.

En la figura número 12 se observa que existe una relación directamente proporcional entre la concentración y la respuesta del analito.

Tabla 17. Resultados del análisis de regresión para linealidad del sistema.

Parámetro a Evaluar	Valor Obtenido
r	1
r ²	1
CV	0.5125 %
Intercepto (b ₀)	0.0028
IC (b ₀)	-0.0011 a 0.0066
Pendiente (b ₁)	0.0371
IC (b ₁)	0.0370 a 0.0373

La linealidad del sistema cumple con los requisitos establecidos por la NOM-177-SSA1-2013 y la guía de validación del colegio de QFB. El coeficiente de variación (CV) obtenido es menor a 2 %, el coeficiente de determinación (r²) es mayor a 0.98.

Se realizó un análisis de varianza con un 95% de confianza para determinar los intervalos de confianza de la pendiente y del intercepto. El valor del intercepto es de 0.003 el cual está comprendido dentro del intervalo que va de -0.0011 a 0.0066, con esto se puede afirmar estadísticamente que la recta pasa por el origen pues los límites deben ser un valor negativo y uno positivo, el intercepto debe quedar dentro de este límite. El valor de la pendiente es diferente de 0.

Tabla 18. Análisis de varianza para linealidad del sistema.

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	F	Valor Crítico de F
Regresión	1	2.6662	2.6662	312338.1341	7.2792E-30
Residuos	13	0.0001	0.0000		
Total	14	2.6663			

Además se realizó un análisis de varianza para la regresión, con el cual es posible decir que el sistema que se utiliza para la determinación de esomeprazol es lineal. Para esto fue necesario plantear las siguientes hipótesis.

Hipótesis:

H₀: No existe una relación lineal entre la concentración de esomeprazol adicionado y la respuesta obtenida.

H_a: Existe un relación lineal entre la concentración de esomeprazol adicionado y la respuesta obtenida

El criterio de aceptación o rechazo de hipótesis es el siguiente:

Si F calculada < F crítica no se rechaza H₀.

Si F calculada > F crítica se rechaza H₀.

En la tabla número 18 de análisis de varianza de linealidad del sistema se observa que F calculada es mayor que F crítica por lo tanto se rechaza H₀ y se dice que existe relación lineal entre la concentración de esomeprazol y la respuesta analítica en el rango de concentraciones de 8.02 a 40.13 µg/ml.

PRECISIÓN.

Tabla 19. Resultados de precisión del sistema.

Concentración (µg/ml)	Abs.	Constante de proporcionalidad
9.98	0.3746	0.0375
	0.3773	0.0378
	0.3718	0.0372
	0.3797	0.0380
	0.3731	0.0374
	0.3725	0.0373
19.97	0.7595	0.0380
	0.7573	0.0379
	0.7538	0.0377
	0.7590	0.0380
	0.7610	0.0381
	0.7608	0.0381
29.95	1.1473	0.0383
	1.1476	0.0383
	1.1438	0.0382
	1.1438	0.0382
	1.1470	0.0383
	1.1426	0.0310
Promedio global		0.0004
S		0.0379
CV		0.9236 %

El valor del coeficiente de variación de la constante de proporcionalidad es de 0.9236 % cumple con el criterio de aceptación menor a 2% por lo cual el sistema se considera preciso, considerando que la dispersión entre la serie de mediciones realizadas bajo las condiciones establecidas es mínima.

INFLUENCIA DEL FILTRO.

Tabla 20. Resultados de la influencia del filtro.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Sin Filtrar		Filtrado con papel Filtro Whatman 540	
	10.52	42.09	10.52	42.09
Abs.	0.4044	1.5895	0.4006	1.5849
	0.4046	1.5894	0.4032	1.5889
	0.4042	1.589	0.4059	1.5894
	0.4057	1.5889	0.4021	1.5891
	0.4055	1.5887	0.4048	1.5902
	0.4058	1.5893	0.4017	1.5905
Promedio	0.4050	1.5891	0.4030	1.5888
S	0.0007	0.0003	0.0020	0.0020
CV	0.1757 %	0.0198 %	0.4954 %	0.1275 %
Diferencia absoluta	-0.4897 %	0.0755 %		

Se evaluaron los filtros utilizados en la validación del método con dos niveles de concentración 10.52 y 42.09 $\mu\text{g/ml}$, se observa que la diferencia absoluta para las dos concentraciones es menor al 2% con lo que podemos decir que no existe adherencia del fármaco al filtro.

3. RESULTADOS VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

LINEALIDAD.

La linealidad del método se evaluó utilizando 5 niveles de concentración intervalo de 9.98 a 49.92 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 21. Resultados linealidad del método.

Concentración adicionada ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración recuperada ($\mu\text{g/ml}$)	% recuperado	Error absoluto
9.98	9.9089	99.2411	-0.7589
	9.9572	99.7246	-0.2754
	10.0886	101.0410	1.0410
19.97	19.9358	99.8321	-0.1679
	19.9706	100.0067	0.0067
	20.0055	100.1813	0.1813
29.95	29.7293	99.2500	-0.7500
	29.8232	99.5634	-0.4366
	29.8285	99.5813	-0.4187
39.94	40.0164	100.1948	0.1948
	39.9171	99.9463	-0.0537
	39.9118	99.9328	-0.0672
49.92	49.7589	99.6709	-0.3291
	49.6785	99.5097	-0.4903
	49.8045	99.7622	-0.2378
Promedio global		99.8292	
S		0.4422	
CV		0.4430 %	

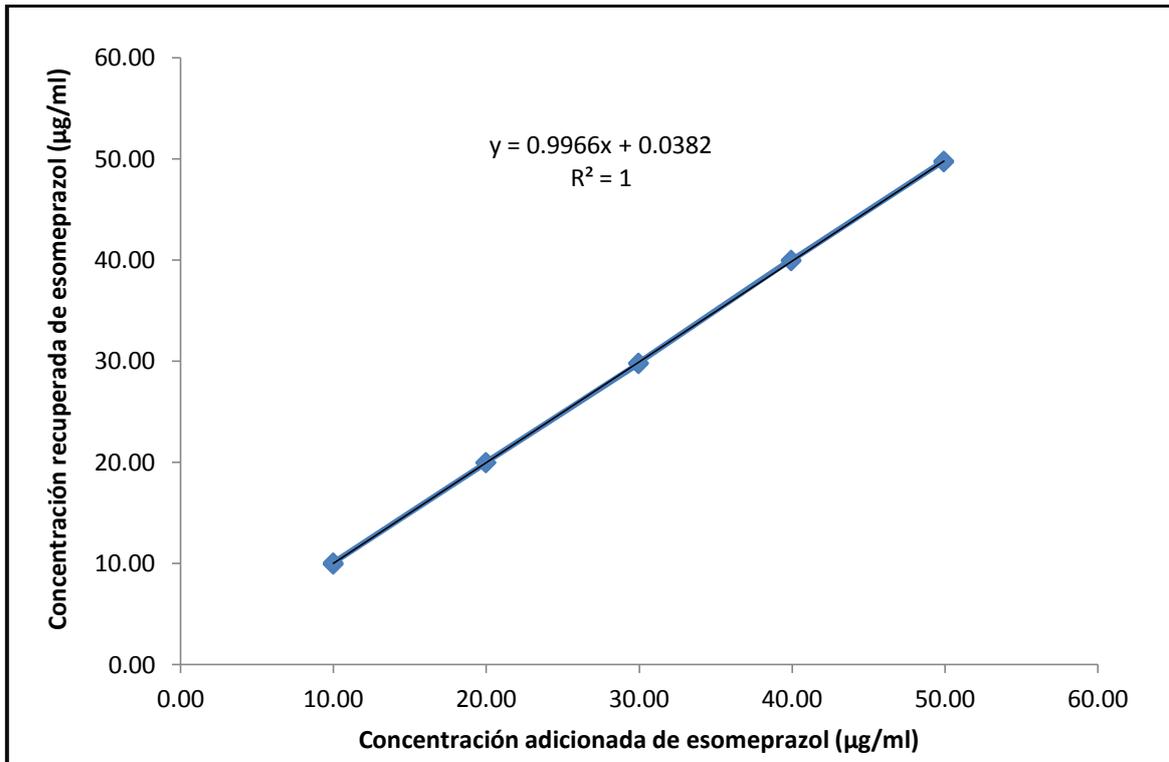


Figura 13. Curva de calibración del método para esomeprazol de 10-50 µg/ml en búfer de fosfatos

En la figura número 13 se observa que existe una relación directamente proporcional entre la concentración adicionada y la concentración recuperada de analito.

La linealidad del método cumple con los requisitos establecidos por la NOM-177-SSA1-2017 y la guía del colegio de QFB's. El coeficiente variación (CV) obtenido es menor a 2 %, el coeficiente de determinación (r^2) es mayor a 0.98.

Tabla 22. Resultados de análisis de regresión para linealidad del método.

Parámetro a evaluar	Valor obtenido
r	1
r^2	1
CV	0.4430 %
Intercepto b_0	0.0382
IC (b_0)	-0.0835 a 0.1599
Pendiente b_1	0.9966
IC (b_1)	0.9929 a 1.0002

Se realizó un análisis de varianza con un 95% de confianza para determinar los intervalos de confianza de la pendiente y del intercepto. El valor del intercepto es de 0 y los límites van de -0.1678 a 0.1678, se puede afirmar estadísticamente que la recta pasa por el origen. El valor de la pendiente incluye la unidad.

Tabla 23. Análisis de varianza para linealidad del método.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	2970.2352	2970.2352	343203.1840	3.94524E-30
Residuos	13	0.1125	0.0087		
Total	14	2970.3477			

Además se realizó un análisis de varianza para la regresión, con el cual es posible decir que el método que se utiliza para la determinación de esomeprazol es lineal. Para esto fue necesario plantear las siguientes hipótesis.

Hipótesis:

H₀: No existe una relación lineal entre la concentración de esomeprazol adicionado y la concentración recuperada.

H_a: Existe un relación lineal entre la concentración de esomeprazol adicionado y la concentración recuperada.

El criterio de aceptación o rechazo de hipótesis es el siguiente:

Si $F_{calculada} < F_{crítica}$ no se rechaza H_0 .

Si $F_{calculada} > F_{crítica}$ se rechaza H_0 .

En la tabla número. 23 de análisis de varianza de linealidad del método se observa que $F_{calculada}$ es mayor que $F_{crítica}$ por lo tanto se rechaza H_0 y se dice que existe relación lineal entre la concentración de esomeprazol adicionada y la concentración recuperada en el rango de concentraciones de 19.98 a 49.92 $\mu\text{g/ml}$.

EXACTITUD Y PRECISIÓN.

Tabla 24. Resultados exactitud y precisión del método.

Concentración adicionada (µg/mL)	Concentración recuperada (µg/mL)	% recuperado	Error absoluto
9.02	8.9003	98.6495	-1.3505
	8.9452	99.1475	-0.8525
	8.8712	98.3272	-1.6728
	8.9346	99.0303	-0.9697
	8.8527	98.1221	-1.8789
	8.9161	98.8253	-1.1747
18.04	18.0569	100.0705	0.0705
	18.1547	100.6125	0.6125
	18.0331	99.9386	-0.0614
	18.0913	100.2609	0.2609
	18.0543	100.0558	0.0558
	17.9089	99.2501	-0.7499
27.07	26.7959	99.0010	-0.9990
	26.8594	99.2354	-0.7646
	26.9572	99.5968	-0.4032
	26.9254	99.4796	-0.5204
	26.8779	99.3038	-0.6962
	26.8276	99.1182	-0.8818
Promedio global		99.3347	
S		0.6653	
CV		0.6698 %	

El valor del coeficiente de variación global es de 0.6698 %, cumpliendo con el criterio de aceptación menor al 2% por lo cual el método se considera preciso.

La exactitud se evaluó con el porcentaje de recobro que debe ser de 98-102%, en este caso el porcentaje recuperado de los tres niveles cumple lo establecido con un promedio de 99.3347 %.

REPETIBILIDAD.**Tabla 25. Resultados repetibilidad del método.**

		% Recuperación de Concentración					
Analista	Día	Concentración (µg/ml)			Promedio	S	CV %
		9	18	27			
1	1	99.1475	100.0705	99.5968	99.5311	0.5062	0.5086
		99.0303	100.2609	99.4796			
		98.8253	100.0558	99.3038			
	2	98.1606	99.1270	99.6474	99.0356	0.6803	0.6869
		98.0714	99.2608	99.4595			
		98.2795	99.4987	99.8060			
Promedio global				99.2833			
S				0.6351			
CV				0.6397 %			

Para determinar si el método es repetible el coeficiente de variación global debe ser menor al 2%, los coeficientes de variación por día e individuales cumplen con la especificación por lo cual se puede decir que el método es repetible en diferentes días.

Además el promedio del porcentaje de recobro global es de 99.2833 % cumpliendo con el intervalo de 98-102%

REPRODUCIBILIDAD.**Tabla 26. Resultados reproducibilidad del método.**

		% Recuperación			Promedio	S	CV %
Analista	Día	Concentración (µg/ml)					
		9	18	27			
1	1	99.1475	100.0705	99.5968	99.5301	0.5066	0.5090
		99.0303	100.2609	99.4796			
		98.8253	100.0558	99.3038			
	2	98.1606	99.1270	99.6474	99.0345	0.6789	0.6856
		98.0714	99.2608	99.4591			
		99.2795	99.4987	99.8060			
2	1	98.9134	100.3671	99.7357	99.7297	0.8710	0.8734
		98.0029	100.0587	101.0573			
		99.5595	100.0581	99.8140			
	2	100.053	99.4744	99.6965	99.4685	0.5391	0.5420
		98.7213	99.5613	99.9090			
		99.4316	99.6627	99.7062			
Promedio				99.4407			
S				0.6856			
CV				0.6894 %			

Para determinar si el método es reproducible el coeficiente de variación global debe ser menor al 2%, en la tabla número. 26 se observa que los coeficiente de variación para cada analista en días diferentes así como el coeficiente global cumplen con la especificación, por lo tanto se puede decir que el método es reproducible entre analistas diferentes.

Ademas el promedio del porcentaje de recobro global es de 99.44407% cumpliendo con el intervalo de 98-102%.

LÍMITE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.

Se utilizaron los parámetros determinados para la curva de calibración del método para determinar el límite de detección y cuantificación utilizando las ecuaciones mencionadas anteriormente.

Tabla 27. Parámetros de la curva de calibración utilizados para determinar Límite de detección y Límite de Cuantificación.

Parámetro a Evaluar	Valor Obtenido
R	1
r ²	1
CV	0.4430 %
Ordenada al origen (b ₀)	0.0382
Pendiente (b ₁)	0.9966
Desviación estándar del intercepto (sb ₀)	0.0017

$$LD = \frac{(3.3 \times 0.0017)}{0.9966} = 0.0056 \text{ } \mu\text{g/ml de esomeprazol.}$$

$$LQ = \frac{(10 \times 0.0017)}{0.9966} = 0.0171 \text{ } \mu\text{g/ml de esomeprazol.}$$

El límite de detección obtenido teóricamente es de 0.0056 $\mu\text{g/ml}$ de esomeprazol, mientras que el de cuantificación es de 0.0171 $\mu\text{g/ml}$ de esomeprazol.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

Los resultados de estabilidad de la muestra fueron evaluados a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ a tres diferentes condiciones (temperatura ambiente sin protección de la luz, temperatura ambiente protegido de la luz, refrigeración 7°C) por un periodo de tiempo de 24 horas.

Tabla 28. Resultados estabilidad de la muestra a tres diferentes condiciones.

	Condición		
	Temperatura ambiente, luz (26°C)	Temperatura ambiente protegido de la luz. (26°C)	Refrigeración (7°C)
Tiempo (min)	% Recuperado	% Recuperado	% Recuperado
15	100.82	100.65	100.92
30	101.76	100.64	101.64
45	101.35	100.89	101.71
60	100.64	100.49	101.04
90	101.02	100.18	101.31
120	101.07	100.03	100.39
150	101.11	101.51	101.88
180	100.86	99.33	101.06
210	100.51	99.16	100.39
240	99.69	98.76	100.39
300	99.65	98.92	101.00
360	99.01	98.84	99.72
promedio	100.6222	99.9508	100.954
S	0.7946	0.9223	0.7414
CV	0.7897 %	0.9228 %	0.6354 %
(24 horas)	93.49	94.46	99.27
Promedio	100.0735	99.5290	100.8256
S	2.1198	1.7585	0.7419
CV	2.1182 %	1.7668 %	0.7358 %

Para validar un método analítico debe demostrarse en qué medida los analitos se mantienen estables durante todo el procedimiento de análisis.

Al analizar la misma muestra sometida a tres diferentes condiciones se determinó el porcentaje de recobro, el cual debe ser de 98-100% y se calculó el coeficiente de variación que debe ser menor al 3%.

La muestra a temperatura ambiente sin protección de la luz a las 24 horas presenta un porcentaje de recuperación bajo, de 93.49 %, mientras que a las 6 horas (360 minutos) el porcentaje recuperado es de 99.01% y el CV de 0.7897 % por lo tanto se puede decir que la muestra a esta condición es estable al menos por 6 horas.

La muestra a temperatura ambiente protegida de la luz a las 24 horas tiene un porcentaje de recuperación bajo de 94.46 % mientras que a las 6 horas el

porcentaje recuperado es de 98.84 % y tiene un CV de 0.9228 %, por lo que se puede decir que la muestra a esta condición es estable al menos por 6 horas.

Mientras que la muestra en refrigeración presenta un porcentaje de recuperación aceptable a las 24 horas, de 99.27 % y un CV de 0.7358 %, por lo que se puede decir que la muestra a esta condición es estable al menos por 24 horas.

SELECTIVIDAD.

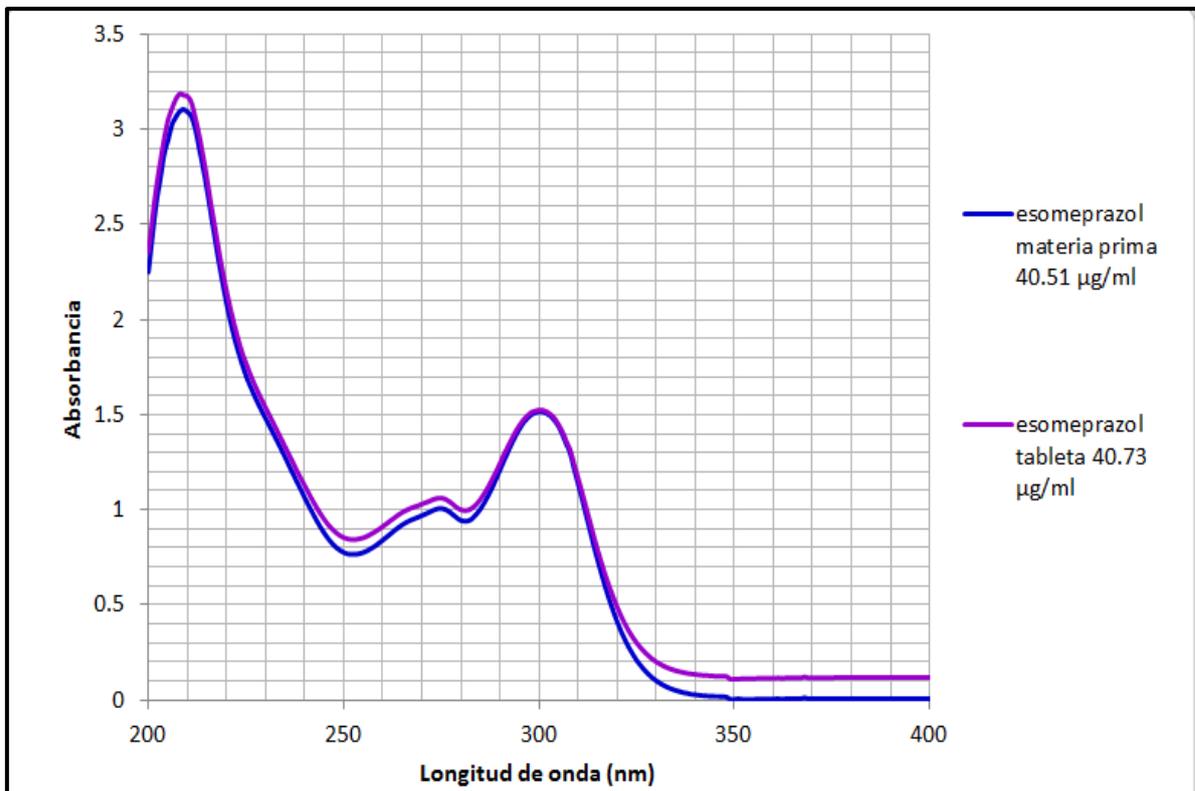


Figura 14. Espectros de absorción de esomeprazol obtenidos a partir de materia prima y tableta.

Se utilizaron concentraciones de 40.51 µg/ml preparado a partir de esomeprazol materia prima y 40.73 µg/ml preparado a partir de la tableta, se les realizó un espectro de absorción en la región ultravioleta, debido a la pequeña diferencia de concentración se espera un cambio en la absorbancia pero la longitud máxima de absorción de la concentración preparada con tableta se mantiene en 300 nm, no hubo cambio con respecto a la obtenida con esomeprazol materia prima. Se puede considerar que el método es específico debido a que los excipientes presentes en la tableta de esomeprazol magnésico trihidrato (NEXIUM) no interfieren en la respuesta analítica de esomeprazol.

Este parámetro se relaciona con el grado en que otras sustancias interfieren en la identificación y cuantificación de los analitos de que se trate. Mide la capacidad del método para identificar/cuantificar los analitos en presencia de otras sustancias, endógenas o exógenas, en una muestra de la matriz en las condiciones exigidas por el método. La validación debe garantizar el buen funcionamiento del método, y que éste distingue los efectos de las impurezas, las sustancias que reaccionan entre sí, etc., que podrían estar presentes en la matriz.^[53]

El método demostró ser exacto y preciso por lo tanto se considera selectivo, como lo indica la NOM-177- SSA1-2013.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Mediante la investigación documental fue posible conocer las características del analito que permitieron establecer las condiciones de tratamiento de la muestra.

A través de la obtención del espectro de absorción en búfer de fosfatos en la región ultravioleta fue posible determinar la longitud de absorción máxima en 300 nm, a la cual se realizaron todas las determinaciones.

Se desarrolló un método analítico para cuantificar esomeprazol en muestras provenientes de perfiles de disolución de tabletas mediante espectrofotometría ultravioleta y se validó según lo establecido en la NOM-177-SSA1-2013 y la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos.

Para el sistema se demostraron los siguientes parámetros:

- Lineal en un rango de concentraciones de 8-40 $\mu\text{g/ml}$ de esomeprazol.
- Preciso en niveles de 10, 20 y 30 $\mu\text{g/ml}$
- Se demostró que no existe adherencia del fármaco al filtro de papel whatman 540 utilizado.

Para el método se demostraron los siguientes parámetros:

- Lineal en un rango de concentraciones de 10-50 $\mu\text{g/ml}$ de esomeprazol.
- Preciso y exacto en niveles de 9, 18 y 27 $\mu\text{g/ml}$ de esomeprazol.
- Repetible entre días y reproducible entre analistas.
- Con los datos de la curva del método se determinó el límite de cuantificación 0.0171 $\mu\text{g/ml}$ y el límite de detección 0.0056 $\mu\text{g/ml}$.
- Estabilidad de la muestra en tres diferentes condiciones: a temperatura ambiente sin protección de la luz es estable por al menos 6 horas, a temperatura ambiente protegido de la luz es estable por al menos 6 horas y en refrigeración al menos por 24 horas.
- Selectivo a esomeprazol ante los componentes de la muestra.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Bhesaniya, K., Baluja, S. (2013). Solubility of Esomeprazole Magnesium Trihydrate in Alcohols at Temperatures from 298.15 to 318.15 K. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 87(13), pp. 2187–2190.
2. Soledad Rodríguez, B. (2009). La validación en la industria. Editorial.
3. PAHO. (2002) Validación de Métodos Analíticos. Consultado 2 de abril del 2017 de <http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13ModuloVALIDACIONdeMetodosFisicoquicos.pdf>.
4. Eurofins. (SF). Desarrollo y validación de métodos analíticos. Consultado 2 de abril del 2017 de <http://www.eurofins.es/media/1069/bi-ct07-espdesarrolloyvalidaciondemetodosanaliticosbiocidasbptv5.pdf>.
5. Hernández Ballesteros, B.A. (2014). Validación del método analítico por HPLC para levogenestrel 1.5mg grageas. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana.
6. Klein Sandra. (2011). Biorelevant Dissolution, Concepts and application. Institute of Biopharmacy and Pharmaceutical Technology Ernst Moritz Arndt University Greifswald, Germany. Consultado el 2 de abril del 2017 de <http://www.aaps.org/uploadedFiles/Content/SectionsandGroups/FocusGroups/InVitroReleaseandDissolutionTesting/Resources/IVRDTFGKlein2011.pdf>.
7. Fuentes Noriega, Inés. (sf). Estudios de disolución. Recuperado el 2 de abril del 2017 de <http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/disolucion24662.pdf>.
8. FDA. (2000). Estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia para productos farmacéuticos administrados oralmente consideraciones generales-guía para la industria. Consultado 18 abril 2017 de <https://www.fda.gov/drugs/guidance/complianceregulatoryinformation/guidances/ucm201469.html>.
9. Martínez Martínez, Adriana. (S.F). Intercambiabilidad. Cofepris. Consultado 2/ noviembre/2016 de <http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/RegistroSanitario.Medicamentos/ESTRUCTURA%20DE%20EXPEDIENTES/12%20INTERCAMBIABILIDAD>.
10. Mark G Papich. (2016), Saunders Handbook of Veterinary Drugs (Fourth Edition), Recuperado 30/ octubre/2016 de <http://www.sciencedirect.com>. Pbid .unam.mx:8080 /science/article/pii/B9780323244855002497P.369.
11. Moffat, Anthony C; Osselto, M David; Widdop, Brian. (2011). Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. Pharmaceutical press categoría ciencias farmacéuticas health medicine. 1820p.
12. USP 38. The United States Pharmacopeia. NF 33 (2015). volumen 2.
13. USP 38. The United States Pharmacopeia. NF 33 (2015). volumen 3.
14. Potthast, H., Cha, E., Bastian, Barbel, Moller, Helga. (2002). Omeprazole: Commercial pharmaceuticals in a comparison Reference. *American chemical society*, 147(3). pp 24-28.
15. Sci Finder. (2017). Esomeprazol. Recuperado el 2 de febrero 2017 de <https://scifinder-casorg.pbidi.unam.mx:2443/SciFinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>.
16. Balkrishana D. Tiwari, Omkar N. Shikare, Amruta M. Sontakke. (2014) Bioequivalence study overview. *Journal of pharmaceutical and scientific innovation*, 3(5). pp 421-424.

17. Hayam M., Loffy., Sawsan M. Amer., Hala E. Zaazaa , Noha S. Mostafa.(2015) A comparative study of the novel spectrophotometric methods versus conventional ones for the simultaneous determination of Esomeprazole magnesium trihydrate and Naproxen in their binary mixture. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*,151,pp 538–546.
18. Santaji Uttam N.,Vangala Ranga R., Dantu Durga R. y Nagendra kumar M.(2012). A validated stability indicating ultra performance liquid chromatographic. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*,57.pp 109-114.
19. Palavai Sripal R.,Kishore Kumar H y Shakil SAIT.(2013). Complexity in estimation of esomeprazol and its Related Impurities'. Stability in Various Stress Conditions in Low-Dose Aspirin and Esomeprazole Magnesium Capsule.*Scientia Pharmaceutica*.81.pp 475-492.
20. Camillo B.,Lisa F., Valentina V., Paolo C., Gaia C., Lisa E.,Carmelo S., Francesca B., Ruggero B., Elisabetta B.,Alessandra R.,(2016). Esomeprazole immediate release tablets gastric mucosa ex vivo permeation, absorption and antisecretory activity in conscious rats.*Journal of Controlled Released*.239.pp203-210
21. CIMUN.(S.F). ¿Qué tipo de forma farmacéutica es la presentación MUPS?, ¿qué significan sus siglas? ¿La presentación MUPS para el esomeprazol permite disolverse en agua?. Universidad Nacional Autónoma de Colombia. Recuperado 3-marzo-2017 de [http://www.ciencias.unal.edu.co/un-ciencias/data-file/cimun/noticias/Pregunta %20esomeprazol%20MUPS pdf](http://www.ciencias.unal.edu.co/un-ciencias/data-file/cimun/noticias/Pregunta%20esomeprazol%20MUPS.pdf).
22. FDA (2007). Food and drug administration center for drug evaluation and research. Office of New Drug Quality Assessment, for Nexium-mups (esomeprazole Magnesium).
23. Aztra Zeneca. (SF) Nexium, Granulado. Consultado 14 marzo 2017 de <http://www.medicamentos.com.mx/DocHTML/31502.htm>.
24. Truven Health Analytics. (2016). Esomeprazol. Micromedex. Recuperado 30/octubre/2016 de [http://www.micromedexsolutions.com/pbidi.unam.mx:8080/micromedex2/librarian/CS/1F0484/NDPR/evidenceexpert/NDP/evidenceexpert/DUPLICATIONSHIELDSYNC/5EA269/NDPG/evidenceexpert/ND_B/evidenceexpert/NDAppProduct/evidenceexpert/NDT/evidenceexpert/PFActionId/evidenceexpert](http://www.micromedexsolutions.com/pbidi/unam.mx:8080/micromedex2/librarian/CS/1F0484/NDPR/evidenceexpert/NDP/evidenceexpert/DUPLICATIONSHIELDSYNC/5EA269/NDPG/evidenceexpert/ND_B/evidenceexpert/NDAppProduct/evidenceexpert/NDT/evidenceexpert/PFActionId/evidenceexpert).
25. Carretero, Marian. (2013). Esomeprazol, medicamentos de vanguardia. *Actualidad Científica*.22, (7).pp116-118.
26. Vademecum (2014). Nexium.consultado 14/marzo/2017 de <http://mx.Pr.vademecum.com/producto.php?producto=7814>.
27. Connors K.A. (1980). Curso De Análisis Farmacéutico.2 edición. Editorial reverté .España. capítulo espectroscopia de absorción p195-215.
28. Owen, Tony. (2000). Fundamentos de espectroscopia uv-visible moderna conceptos básicos. *Agilent Technologist*. Alemania.
29. Neira Miguel.(2010). Fundamentos de espectrofotometría. Recuperado el 27 abril 2017 de [file:///C:/Users/m/Downloads/GuiaTP2Quimical I 2010.pdf](file:///C:/Users/m/Downloads/GuiaTP2QuimicalI2010.pdf).
30. Stephen L. Upstone. (2000). Ultraviolet/Visible Light Absorption Spectrophotometry in Clinical Chemistry Encyclopedia of Analytical Chemistry.,PerkinElmer Inc., Seer Green, UK

31. Averell, S.M. (2004) Introduction to the Validation of a Dissolution Apparatus Dissolution Technologies. Senior Technical Services Scientist, Technical Services Dept. Dissolution Technologies.
32. Aulton Michael. E. (2004). Farmacia la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. 2 edición. Elsevier, España P18.
33. Alfonso R, Genaro. (2003). Remington; Farmacia. Vol.1 p .Editorial panamericana, Buenos Aires .p766
34. Ciprian Hernández, MR. (2005). El proceso de disolución y los factores que lo influyen como herramientas en el desarrollo de medicamentos genéricos en formas farmacéuticas sólidas de liberación inmediata. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química.
35. Baena, Y., L.F. Ponce D, L. (2008). Importancia y fundamentación del sistema de clasificación Biofarmacéutica, como base de la exención de estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia. *Revista colombiana de químicos farmacéuticos*, 37(01). pp18-32
36. USP 38 The United States Pharmacopeia. NF 33 (2015). volumen 1. Pruebas Físicas <1088> Evaluación *in vivo-in vitro*. p 1177.
37. Saavedra I., Iturriaga V., Ávila L., Quiñones L. (2011). Estudios de bioexención (in vitro) para establecer equivalencia de medicamentos. *Cuad Med Soc.* 51(2) pp.66-79.
38. Tiwary, AK., Bharti Y Subheet J. (SF). Dissolution, Pharmaceutical Sciences Encyclopedia: Drug Discovery, *Development, and Manufacturing*.
39. Secretaría de Salud. NORMA Oficial Mexicana NOM- 177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad. DOF publicado el 6 de mayo del 2013.
40. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2011). Undécima edición. Vol. I .p. 2398.
41. USP 38 The United States Pharmacopeia. NF 33 (2015). volumen 2 <1092> procedimiento de disolución: desarrollo y validación.
42. USP 38 The United States Pharmacopeia. NF 33 (2015). volumen 1. Pruebas Físicas <717> Disolución.
43. Brown. W. (2005). Apparatus 4 Flow Through Cell: Some Thoughts on Operational Characteristics. *Dissolution Technologies*. pp28-30.
44. Medina López, Raúl; Hurtado, Martina; Cortes, Rosa; Domínguez, Adriana. (2012). Disolución comparativa de indometacina en cápsulas utilizando los aparatos 1 y 4 USP. *Revista Mexicana de ciencias Farmacéuticas*, 43(3), pp72-80.
45. Joseph W. E., Daren T., Walter W. H. y Stippler Erika S. (2012). Development of Performance Verification Test for USP Apparatus 4. *Pharm Res. Springer*. pp. 345-351.
46. Singha, H.Y. Aboul-Eneinb. (2006). Advantages of USP Apparatus IV (Flow-through Cell Apparatus in Dissolution Studies. *Journal of the Iranian Chemical Society*. 3(3). pp220-22

47. Guía de validación de métodos analíticos. Editada por el colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos México.
48. USP 38 The United States Pharmacopeia. NF 33 (2015). volumen 1. <1225 > Validación de métodos analíticos.
49. J. Ermer and J. H. McB. Miller. (2005). Method in validation pharmaceutical analysis. A Guide to Best Practice WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
50. Mercado Servid, Ana Lilia. (2001). Perspectiva de la validación en México. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional autónoma de México, Facultad de química.
51. OMS. (1998). Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación.
52. ICH Q2R1. (1996). VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY. Consultado el 1 de mayo del 2017 de http://www.ich.org/fileadmin/PublicWeb_Site/ICHProducts/Guidelines/Quality/Q2R1/Step4/Q2R1Guideline.pdf
53. UNODC. (2010). Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. Recuperado el 1 de mayo del 2017 de https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf

ANEXO 1. CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN PARA LINEALIDAD DEL MÉTODO.

Para el cálculo de la concentración recuperada se resto la respuesta proporcionada por el blanco a cada sistema. Con la diferencia obtenida se cuantifico utilizando un estándar.

El blanco contenía únicamente medio del vaso y la respuesta obtenida fue 0.3422. El estándar se preparó a una concentración de 39.9386 µg/ml y la respuesta de 1.4889.

Tabla 29. Resultados para obtener la concentración recuperada en linealidad del método.

Conc. adicionada (µg/ml)	Abs. sistema	Abs de concentración adicionada (abs. obtenida - abs. del blanco)	Constante de proporcionalidad	Conc. recuperada (µg/ml)	% recuperado
9.9846	0.7116	0.3694	0.0370	9.9089	99.2411
	0.7134	0.3712	0.0372	9.9572	99.7246
	0.7183	0.3761	0.0377	10.0886	101.0410
19.9693	1.0854	0.7432	0.0372	19.9358	99.8321
	1.0867	0.7445	0.0373	19.9706	100.0067
	1.0880	0.7458	0.0373	20.0055	100.1813
29.9539	1.4505	1.1083	0.0370	29.7293	99.2500
	1.4540	1.1118	0.0371	29.8232	99.5634
	1.4542	1.1120	0.0371	29.8285	99.5813
39.9386	1.8340	1.4918	0.0374	40.0164	100.1948
	1.8303	1.4881	0.0373	39.9171	99.9463
	1.8301	1.4879	0.0373	39.9118	99.9328
49.9232	2.1972	1.8550	0.0372	49.7589	99.6709
	2.1942	1.8520	0.0371	49.6785	99.5097
	2.1989	1.8567	0.0372	49.8045	99.7622
		Promedio	0.0372		99.8292
		S	0.0002		0.4422
		CV	0.5376 %		0.4430 %

Por ejemplo:

Diferencia de absorbancia:

$$0.7116 - 0.3422 = 0.3694$$

Cuantificación con std.

$$0.3694 \left(\frac{39.9386 \text{ µg/ml}}{1.4889} \right) = 9.9088 \text{ µg/ml} \quad 9.9089 \text{ µg/ml} \left(\frac{100\%}{9.9846 \text{ µg/ml}} \right) = 99.2411 \%$$

ANEXO 2. CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN PARA EXACTITUD Y PRECISIÓN DEL MÉTODO.

El blanco contenía únicamente medio del vaso y la respuesta obtenida fue 0.3264. El estándar se preparó a una concentración de 37.3928 µg/ml y la respuesta de 1.4335

Tabla 30. Resultados para obtener la concentración recuperada en exactitud y precisión del método.

Conc. adicionada (µg/mL)	Abs. sistema	Abs de concentración adicionada (abs. obtenida - abs. del blanco)	Constante de proporcionalidad	Conc. recuperada (µg/mL)	% recuperado
9.0221	0.6631	0.3367	0.0373	8.9003	98.6495
	0.6648	0.3384	0.0375	8.9452	99.1475
	0.6620	0.3356	0.0372	8.8712	98.3272
	0.6644	0.3380	0.0375	8.9346	99.0303
	0.6613	0.3349	0.0371	8.8527	98.1221
	0.6637	0.3373	0.0374	8.9161	98.8253
18.0442	1.0095	0.6831	0.0379	18.0569	100.0705
	1.0132	0.6868	0.0381	18.1547	100.6125
	1.0086	0.6822	0.0378	18.0331	99.9386
	1.0108	0.6844	0.0379	18.0913	100.2609
	1.0094	0.6830	0.0379	18.0543	100.0558
	1.0039	0.6775	0.0375	17.9089	99.2501
27.0663	1.3401	1.0137	0.0375	26.7959	99.0010
	1.3425	1.0161	0.0375	26.8594	99.2354
	1.3462	1.0198	0.0377	26.9572	99.5968
	1.3450	1.0186	0.0376	26.9254	99.4796
	1.3432	1.0168	0.0376	26.8779	99.3038
	1.3413	1.0149	0.0375	26.8276	99.1182
		Promedio	0.0376		99.3347
		S	0.0003		0.6653
		CV	0.7978 %		0.6698 %

Por ejemplo:

Diferencia de absorbancia:

$$0.6631 - 0.3264 = 0.3367$$

Cuantificación con std.

$$0.3367 \left(\frac{37.3928 \mu\text{g/ml}}{1.4335} \right) = 8.9003 \mu\text{g/ml} \quad 8.9003 \mu\text{g/ml} \left(\frac{100\%}{9.0221 \mu\text{g/ml}} \right) = 98.6495 \%$$