



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE DISOLUCIÓN DE PRODUCTOS COMERCIALES EN
MÉXICO, CONTENIENDO MELATONINA.**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. JANET PÉREZ ALCÁNTARA

M en C. Juan Manuel Rodríguez

Departamento de Biofarmacia, laboratorio 112, conjunto E de la Facultad de Química.

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., junio 2018.



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

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE DISOLUCIÓN DE PRODUCTOS COMERCIALES EN
MÉXICO, CONTENIENDO MELATONINA.

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. JANET PÉREZ ALCÁNTARA



Ciudad de México, junio 2018.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por hacer posible el desarrollo de este proyecto de investigación, aportando sus instalaciones del conjunto E, laboratorio 112 y el conocimiento de todos los docentes en clases.

Al M en C. Juan Manuel Rodríguez por su apoyo y asesoría durante todo el proyecto.

A la Dra. Helgi Jung Cook por todas sus aportaciones, comentarios y apoyo que me dio desde el principio y durante toda mi estancia en el laboratorio, muchas gracias.

A mis compañeros del laboratorio 112, Sergio Soto y Williams Hernández, de quienes aprendí mucho, recibí todo su apoyo y compartí varios momentos claves durante el proyecto.

A mis colegas de toda la vida y amigos, quienes me inspiraron a entrar al programa de maestría y son ejemplo a seguir, Paulina Carmona, Bernardo Mendoza, Miguel Márquez, Tania González y Diana Vázquez.

A Edgar Mirafuentes, por compartir las emociones y altibajos que hay siempre en mi vida.

A los miembros del jurado por las valiosas aportaciones realizadas durante la revisión de este trabajo.

A CONACyT por el apoyo económico recibido a través de la beca otorgada de maestría 595237.

A mi mamá y a Jazmín por compartir el mismo propósito en la vida.

*“La felicidad es el significado y el propósito de la vida,
todo el objetivo y el fin de la existencia humana”*

Aristóteles

Abreviaturas y acrónimos

Abs	Absorbancia
MeCN	Acetonitrilo
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
cm	Centímetros
r	Coefficiente de correlación
r ²	Coefficiente de determinación
logP	Coefficiente de partición
CV%	Coefficiente de Variación
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección de Riesgos Sanitarios
AIC	Criterio de Akaike
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CC	Curva de Calibración
ANOVA	Del inglés Analysis of Variance
DOE	Del inglés Design of Experiments
HPLC	Del inglés High Performance Liquid Chromatography
IUPAC	Del inglés International Union of Pure and Applied Chemistry
USP	Del inglés United States Pharmacopeia
DE	Desviación Estándar
%DEA	Desviación Estándar Absoluta
%DAC	Diferencia Absoluta del porcentaje Cuantificado
%ERR	Error Relativo debido a la Regresión
STD	Estándar
exp	Experimental
Fr	Factor de respuesta
f ₂	Factor de similitud
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio
°C	Grados Celsius
g	Gramos
g/mol	Gramos por mol

NaOH	Hidróxido de sodio
L	Litros
λ	Longitud de onda
L1	Máximo valor de aceptación permitido en porcentaje
MEL	Melatonina
$C_{13}H_{16}N_2O_2$	Melatonina
μ L	Microlitros
μ g/mL	Microgramos por mililitro
mg	Miligramos
mg/mL	Miligramos por mililitro
mm	Milímetros
min	Minutos
M	Molar (mol/L)
nm	Nanómetros
%	Por ciento
%Ret	Porcentaje retenido
pred	Predicho
pba	Prueba
Ref	Referencia
RIS	Reglamento de Insumos para la Salud
rpm	Revoluciones por minuto
SS	Secretaría de Salud
SAF	Solución Amortiguadora de Fosfatos
tr	Tiempo de retención
t	Tiempo
tm	Tiempo de muestreo
UV	Ultravioleta
UC	Uniformidad de Contenido
VA	Valor de Aceptación
vel	Velocidad

Índice General

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	MARCO TEÓRICO.....	2
	2.1 Medicamentos Genéricos	2
	2.2 Disolución	3
	2.2.1 Factores que influyen en las pruebas de disolución	5
	2.2.2 Velocidad de Disolución.....	8
	2.2.3 Condiciones <i>sink</i>	8
	2.2.4 Perfil de disolución.....	9
	2.2.5 Modelos cinéticos de liberación.....	9
	2.2.6 Comparación de perfiles de disolución	11
	2.3 Tabletas Sublinguales.....	12
	2.3.1 Propiedades fisicoquímicas del fármaco necesarias para una tableta sublingual .	12
	2.3.2 Características de las tabletas sublinguales	12
	2.3.3 Pruebas de disolución en tabletas sublinguales	13
	2.4 Diseño de experimentos (DOE).....	14
	2.5 Melatonina.....	14
	2.5.1 Propiedades fisicoquímicas	15
	2.5.2 Propiedades farmacocinéticas	15
	2.5.3 Presentaciones farmacéuticas en México	16
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
4.	HIPÓTESIS	17
5.	OBJETIVO GENERAL	18
	5.1 Objetivos particulares.....	18
6.	PARTE EXPERIMENTAL.....	19
	6.1 Desarrollo y Validación del Método para cuantificar MEL en estudios de disolución	19
	6.1.1 Equipos e instrumentos.....	19
	6.1.2 Materiales	19
	6.1.3 Reactivos	20
	6.1.4 Control de calidad	20
	6.1.5 Validación del método analítico	23
	6.2 Productos bajo estudio	27
	6.3 Estudio de perfiles de disolución.....	28
	6.3.1 Preparación de los medios de disolución.....	28

6.3.2	Selección de las mejores condiciones de disolución empleando el Diseño de Experimento (DOE)	29
6.3.3	Evaluación de los perfiles de disolución de los productos bajo estudio.....	29
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
7.1	Desarrollo y Validación del Método para la cuantificación de MEL en estudios de disolución	33
7.1.1	Control de Calidad: Identidad, Valoración y UC	33
7.1.2	Validación del método analítico	35
7.2	Estudio de perfiles de disolución	41
7.2.1	Condiciones de disolución y DOE	41
7.2.2	Evaluación de perfiles de disolución de los productos bajo estudio.....	46
7.2.3	Modelado matemático de datos	49
8.	CONCLUSIONES	52
9.	PERSPECTIVAS	53
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	54

Índice de figuras

Figura 1. Representación esquemática de disolución	3
Figura 2. Esquema ilustrativo de los 5 principales pasos de la disolución de un fármaco en agua.....	4
Figura 3. Estructura química de la melatonina	15
Figura 4. Cromatogramas obtenidos en la prueba de identidad	36
Figura 5. Curva de calibración del fármaco (MEL)	37
Figura 6. Curva de calibración para evaluar linealidad del medicamento MT1.....	39
Figura 7. Curva de calibración para evaluar linealidad del medicamento MT2.....	39
Figura 8. Espectros de absorción del STD de MEL, MT1 y MT 2.....	41
Figura 9. Diagrama de Pareto para el DOE de MEL	44
Figura 10. Perfiles de disolución del DOE de MEL	45
Figura 11. Perfiles de disolución de los productos bajo estudio	47
Figura 12. Ajuste de los datos de disolución de los productos evaluados al modelo cinético de Weibull	51

Índice de tablas

Tabla 1. Soluciones para la Curva de calibración de MEL	24
Tabla 2. Medicamentos a analizar, tabletas sublinguales conteniendo 5 mg de MEL ..	28
Tabla 3. Condiciones para el DOE 2 ³	29
Tabla 4. Estudios de disolución del DOE 2 ³	30
Tabla 5. Resultados de identidad y valoración de los medicamentos bajo estudio	33
Tabla 6. Resultados de la prueba de valoración	34
Tabla 7. Resultados de la Uniformidad de Contenido de los productos bajo estudio ..	34
Tabla 8. Resultados de la validación con el fármaco: linealidad y precisión.....	35
Tabla 9. Resumen de los parámetros evaluados en la validación con el medicamento Melatonina: linealidad, precisión y exactitud	40
Tabla 10. Resultados de la reproducibilidad en el método.....	38
Tabla 11. Modelado de datos del DOE 2 ³	42
Tabla 12. Parámetros del ajuste al modelo de Weibull en el DOE.....	42
Tabla 13. %Disuelto de MEL predicho con la ecuación de Weibull a los 10 min	43
Tabla 14. ANOVA del diseño de experimento 2 ³	44
Tabla 15. Condiciones óptimas para la evaluación de los perfiles de disolución de productos conteniendo MEL.....	46
Tabla 16. %Disuelto del medicamento de referencia Benedorm®	47
Tabla 17. %Disuelto de los medicamentos prueba Melatonina y Sub-Z®	47
Tabla 18. Comparación de perfiles de disolución por f ₂ (Sub-Z®vs referencia).....	48
Tabla 19. Ajuste al mejor modelo cinético de disolución de los medicamentos bajo estudio	49
Tabla 20. Parámetros del ajuste al modelo cinético de Weibull de los productos estudiados	50

1. INTRODUCCIÓN

La melatonina es una hormona cuya síntesis se produce principalmente en la glándula pineal, su síntesis y secreción son controladas por las condiciones de luz y oscuridad, es empleada para el tratamiento del insomnio, así como en los casos en los que hay ruptura de los ciclos circadianos, como el cambio de husos horarios al viajar en avión (jet-lag) y para regular los patrones de sueño en adultos mayores. A la fecha, las presentaciones disponibles en México son: cápsulas de liberación controlada y tabletas sublinguales en dosis de 3 mg y 5 mg, así como tabletas de liberación inmediata en dosis de 3 mg.

Mientras que el uso de otras hormonas requiere de prescripción médica, la regulación de melatonina es bastante contradictoria; en Estados Unidos se considera un suplemento alimenticio, en Australia un fármaco que requiere prescripción médica, en Europa y México se comercializa de ambas formas.

En México, como medicamento, pertenece al grupo VI (su venta no requiere de receta médica) y la prueba que solicita la COFEPRIS para comprobar su intercambiabilidad, hasta la fecha, es prueba de perfil de disolución para las presentaciones de tabletas de liberación modificada, inmediata y tabletas sublinguales.⁽¹⁾

En la actualidad, la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos no cuenta con monografía para llevar a cabo las pruebas de control de calidad de las diferentes presentaciones farmacéuticas conteniendo melatonina, por lo que el presente proyecto de investigación se orientó a establecer las condiciones de disolución para evaluar las tabletas sublinguales conteniendo 5 mg de dicho fármaco, utilizando un método analítico espectrofotométrico validado previamente y ajustando los resultados a diferentes modelos cinéticos de disolución para explicar su comportamiento, haciendo uso de pruebas estadísticas a través de un diseño de experimento 2³, cuyas variables fueron tiempo de muestreo, medio de disolución (agua y solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8) y velocidad de agitación (50 y 75 rpm), lo que permitió definir cuál de los métodos tenía una mayor capacidad para discriminar entre productos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Medicamentos Genéricos

El Reglamento de Insumos para la Salud define *medicamento genérico* a la especialidad farmacéutica que contiene el mismo fármaco o sustancia activa y la misma forma farmacéutica, con igual concentración o potencia, que se administra por la misma vía de administración y al cual mediante las pruebas reglamentarias, ha comprobado que sus especificaciones farmacopéicas, perfiles de disolución o su biodisponibilidad y otros parámetros, según sea el caso, son equivalentes a las del medicamento de referencia; en el presente estudio también se hará referencia a los medicamentos genéricos como medicamentos prueba.

De igual manera, define un *medicamento de referencia* como aquél medicamento indicado por la Secretaría de Salud como tal, que cuenta con el registro de dicha dependencia, que se encuentra disponible comercialmente y el cual es seleccionado conforme a los criterios establecidos en las Normas.⁽²⁾

Los estudios de Biodisponibilidad y Bioequivalencia son importantes en el proceso de aprobación de un producto farmacéutico para su comercialización.⁽³⁾ En el desarrollo de un medicamento genérico, el estudio de bioequivalencia tiene como propósito demostrar la semejanza en el comportamiento *in vivo* y en la calidad farmacéutica entre este producto y el medicamento de referencia y con ello evitar que estos productos, provenientes de fuentes múltiples, realicen estudios preclínicos o clínicos de eficacia y seguridad, que ya fueron documentados por el medicamento innovador.⁽⁴⁾

Para formas farmacéuticas sólidas como comprimidos orales y sublinguales, se utilizan pruebas de disolución *in vitro*, las cuales se han convertido en un requerimiento obligatorio para asegurar la calidad de un producto o la uniformidad interlote, así como el buen desempeño del producto bajo estudio a pesar de determinados cambios que pueden llegar a presentar debido a su formulación, proceso y/o sitio de fabricación. Este tipo de estudios no predicen la eficacia terapéutica, sin embargo, son una herramienta cualitativa que proporciona información valiosa acerca de la biodisponibilidad de un fármaco, cuya disolución es un proceso cinético que representa el paso final de su liberación para su posterior absorción y efecto terapéutico.⁽⁵⁾

2.2 Disolución

De acuerdo con la IUPAC el término *disolución* se define como *la mezcla de dos fases con la formación de una nueva fase homogénea, es decir, la solución* (Figura 1a).⁽⁶⁾ Si se emplea esta definición en un sistema en el cual una de las fases es la forma farmacéutica sólida (por ejemplo, un comprimido oral o sublingual) y la otra fase es un líquido acuoso (como agua), el proceso en el cual se mezclan estas dos fases dando lugar a una nueva fase homogénea sería lo que se conoce como *disolución del fármaco* (Figura 1b), la cual está controlada por la afinidad entre la sustancia sólida (fármaco) y el disolvente (medio de disolución).

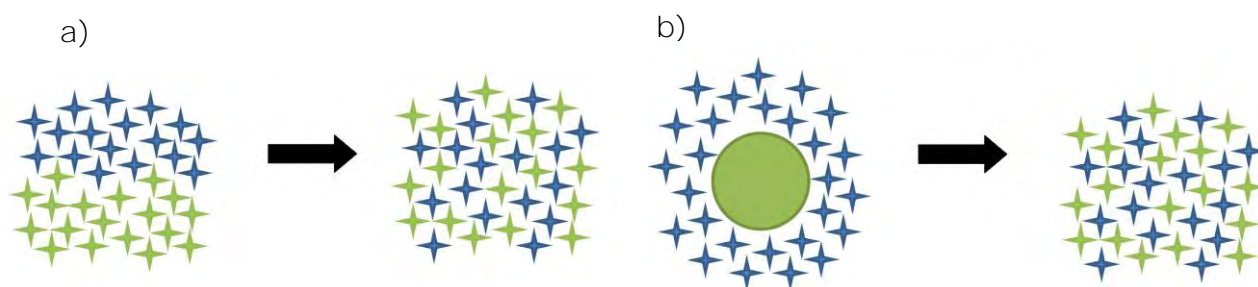


Figura 1. Representación esquemática de: a) Definición de disolución de acuerdo a la IUPAC, y b) disolución de un fármaco.⁽⁷⁾

Durante la disolución del fármaco ocurre una serie de fenómenos físicos que por lo regular se conforma por cinco principales pasos, los cuales se resumen a continuación (Figura 2):

1. Primero, la superficie de la forma farmacéutica sólida es humedecida con el medio (se tomó agua como ejemplo en la Figura 2a),
2. Después se da la ruptura de los enlaces de la estructura cristalina del fármaco (Figura 2b),
3. Para facilitar la solvatación (Figura 2c),
4. Y dar paso a la difusión de moléculas/iones/átomos de la superficie de la forma farmacéutica sólida hacia la capa de medio que rodea al sistema con fármaco acumulado (no hay agitación, Figura 2d),
5. Ya con el sistema bajo agitación, las moléculas/iones/átomos son transportadas por convección al medio de solución fuera de la capa que rodea al sistema para completar el proceso de disolución del fármaco en el medio (Figura 2e).

Si alguno de los pasos anteriores ocurre de una forma más lenta que los demás, será el *paso limitante de velocidad*; conociendo este paso se pueden discriminar los demás, simplificando así las ecuaciones del tratamiento matemático de los datos de disolución que permiten cuantificar la cantidad de fármaco disuelto de forma precisa.⁽⁷⁾

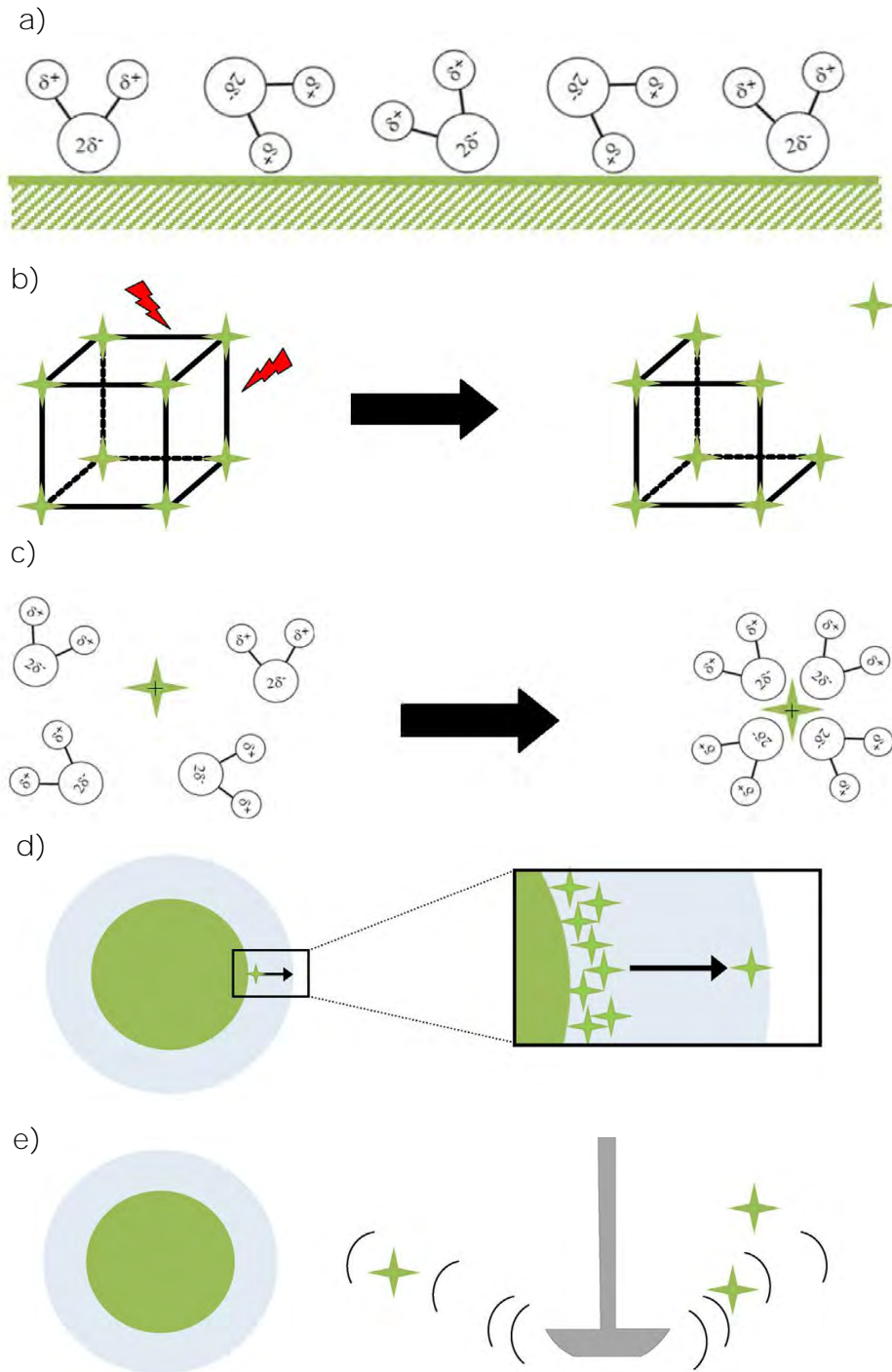


Figura 2. Esquema ilustrativo de los 5 principales pasos de la disolución de un fármaco en agua: a) La superficie del fármaco es humedecida con agua, b) Ruptura de los enlaces de la estructura (estructura cristalina en el ejemplo), c) Solvatación de iones/moléculas/átomos, d) Difusión de iones/moléculas/átomos hacia la capa de medio que rodea al sistema con fármaco acumulado (no hay agitación) y e) Convección gracias a la agitación del medio. ⁽⁷⁾

2.2.1 Factores que influyen en las pruebas de disolución ^{(8) (9)}

La eficacia de las distintas formas farmacéuticas depende en gran medida de la velocidad de disolución previa a su absorción y biodisponibilidad, por lo que las pruebas de disolución son de gran importancia en la industria farmacéutica, para ello se han identificado distintos factores que pueden influenciar o alterar la disolución de las formas farmacéuticas tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*, los cuatro principales son: factores atribuibles al fármaco, factores atribuibles al medicamento, factores atribuibles al equipo de disolución y factores atribuibles al medio de disolución.

2.2.1.1 Factores atribuibles al fármaco

Las propiedades fisicoquímicas del fármaco juegan un papel crucial si se busca modificar su velocidad de disolución, las primordiales son las siguientes:

- a) Polimorfismo. Las formas amorfas y los polimorfos metaestables son más solubles que sus formas cristalinas.
- b) Grado de hidratación de la molécula. Las formas anhidras son generalmente más solubles que las formas hidratadas.
- c) Área superficial o tamaño de partícula. A menor tamaño de partícula, el fármaco suele ser más soluble.
- d) Estado químico del fármaco. Las sales presentan mayor solubilidad. Asimismo, un fármaco ácido es más soluble en un medio básico, y un fármaco básico presenta mayor solubilidad en un medio ácido (debido a la carga eléctrica neta que presenta la molécula).

2.2.1.2 Factores atribuibles al medicamento

Formulación del medicamento

Durante la formulación de una forma farmacéutica la velocidad de disolución del fármaco se ve directamente afectada por la mezcla de éste con uno o varios excipientes, lo cual depende de cada laboratorio y formulador, los principales efectos de los excipientes son:

- a) Diluyentes. Sirven para ajustar el peso de las tabletas, conseguir una masa adecuada para comprimir, preferentemente deben ser hidrofílicos.
- b) Aglutinantes. Son materiales cohesivos capaces de ligar partículas de polvo y formar gránulos, logrando así producir tabletas con buena dureza y baja friabilidad.

- c) Desintegrantes. Facilitan la desintegración o disgregación de la tableta en agua o en jugo gástrico. Liberan al fármaco de la tableta, aumentando la porosidad. Si son de naturaleza hidrofílica, la disminución de cantidad decrece la biodisponibilidad.
- d) Lubricantes. Al ser comúnmente hidrofóbicos inhiben la penetración del agua a la tableta y por ende la disolución y desintegración.
- e) Tensoactivos. Disminuyen la tensión interfacial, incrementando el área superficial mejorando así la velocidad de disolución.
- f) Recubrimiento. Protegen al fármaco asegurando su estabilidad al no ser higroscópicos, ayudan a controlar el tiempo de desintegración.
- g) Soluciones amortiguadoras. Pueden mejorar la disolución, sin embargo, algunas pueden interactuar con el fármaco y precipitarlo.

Proceso de fabricación del medicamento

- a) Método de granulación. Cuanto menor sea el tamaño del gránulo y mayor la uniformidad en la fórmula, mayor será su velocidad de disolución.
- b) Fuerza de compresión en el proceso. Cuanto mayor sea esta fuerza, habrá mayor dureza y el tiempo de humectación será más prolongado. Las tabletas más porosas se humectarán fácilmente y la disolución del fármaco será más rápida.
- c) Humedad. Cuanto mayor sea la humedad durante la manufactura, mayor será la velocidad de disolución.

2.2.1.3 Factores atribuibles al equipo de disolución

- a) Verticalidad del vaso. Se mide en la parte interna y recta de los recipientes, y se toman dos medidas perpendiculares entre sí. Cada uno de los vasos debe estar colocado en su respectivo lugar según su numeración fija establecida.
- b) Altura del elemento de agitación. Fijar la distancia entre el fondo interior del vaso y la parte inferior del elemento de agitación (canastilla o paleta) en 25 ± 2.0 mm. Debe medirse para cada uno de los elementos de agitación colocado en su lugar establecido.
- c) Centrado del vástago. Una inclinación del elemento giratorio en exceso de 1.5° puede aumentar las velocidades de agitación de disolución de 2 a 25%.

2.2.1.4 Factores atribuibles al medio de disolución

- a) Agitación. La relación entre la intensidad de agitación y la velocidad de disolución varía considerablemente de acuerdo con el tipo de agitación que se usa, el grado de flujo laminar y la turbulencia que hay en el sistema, la forma y el diseño del agitador. En la prueba de disolución hay una tolerancia de 2 rpm o 4% (el que resulte mayor) en la velocidad de agitación.
- b) Temperatura. Dado que la solubilidad es dependiente de la temperatura, se debe mantener un control cuidadoso, dentro de un rango de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ de lo especificado, ya que, a mayor temperatura mayor solubilidad, para aquellos fármacos cuya disolución es un proceso endotérmico.
- c) Volumen. Con el fin de minimizar el efecto del gradiente de concentración, se debe asegurar que, durante la prueba el fármaco se encuentre en condiciones *sink*. También la evaporación se produce en los medios a partir de los 37°C a presión atmosférica común, por lo que deben mantenerse cerrados los vasos de disolución durante toda la prueba para evitar las pérdidas de volúmenes mayores al 1.0% de lo especificado.
- d) pH del medio. Este es un punto muy importante, pues dependiendo del pKa del soluto, el pH determinará la carga eléctrica de la molécula en la solución. El pH se debe mantener en un rango de ± 0.5 unidades de lo establecido.
- e) Presencia de sales. La adición de una sal que posea un ion común reduce la solubilidad de un electrolito a menos que forme un complejo de mayor solubilidad, por el contrario, la adición de una sal que no posea ningún ion común con el electrolito débilmente soluble aumenta la solubilidad.
- f) Gases disueltos. El aire disuelto en los medios puede formar burbujas que a su vez pueden recubrir la forma farmacéutica. Este recubrimiento puede afectar la disolución, alterando la liberación del principio activo, por lo que es muy importante desgasificar el medio de disolución.

2.2.2 Velocidad de Disolución

La *velocidad de disolución* se define como la cantidad de fármaco que se disuelve por unidad de tiempo en condiciones estandarizadas de la interfaz sólido/líquido, la temperatura y la composición del medio de disolución.

El proceso de disolución de un fármaco ha sido estudiado extensivamente y como resultado se han propuesto diferentes ecuaciones cuya finalidad es explicar dicho fenómeno, una de las más sencillas y en las que se basan la mayoría de los modelos es la que a continuación se presenta, la ecuación de Noyes-Whitney.

2.2.2.1 Ecuación de Noyes-Whitney

Los estudios hechos por Noyes y Whitney (1897) sobre la velocidad de disolución en muestras de sólidos, describieron un proceso en el cual el fármaco disuelto se difunde al medio de disolución de una región de alta concentración a una región de baja concentración. La *ecuación de Noyes-Whitney* (Ecuación 1) establece que la velocidad de disolución (dc/dt), es directamente proporcional a un gradiente de concentración ($C_s - C_t$), y la constante k es característica de su sistema o de las condiciones dadas de disolución.⁽¹⁰⁾

$$\frac{dc}{dt} = k(C_s - C_t) \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

$\frac{dc}{dt}$: velocidad de disolución

k : constante de disolución (1/tiempo)

C_s : concentración de saturación

C_t : concentración del fármaco en el medio a un tiempo t

2.2.3 Condiciones *sink*

El término *sink* se define como aquella condición en la que el volumen del medio debe ser cuando menos tres veces mayor que el volumen requerido para formar una solución saturada del fármaco⁽¹⁰⁾; para asegurarse de ello en la mayoría de las pruebas *in vitro* se emplea un gran volumen de medio de disolución o bien el medio es repuesto en forma constante con disolvente nuevo a una velocidad específica.

2.2.4 Perfil de disolución

Se le denomina *perfil de disolución* a la determinación experimental de la cantidad de fármaco disuelto a diferentes tiempos, en condiciones experimentales controladas, a partir de la forma farmacéutica. ⁽²⁾ Un estudio comparativo de perfiles de disolución es una herramienta importante para comparar la liberación del fármaco de diferentes productos conteniendo el mismo principio activo o bien de diferentes lotes de un mismo producto.

2.2.5 Modelos cinéticos de liberación

La disolución de un fármaco a partir de una forma de dosificación ha sido descrita mediante modelos cinéticos, en los cuales la cantidad de fármaco (Q) está en función del tiempo (t). Algunas definiciones analíticas de Q(t) comúnmente usadas son: orden cero, primer orden, Hixson-Crowell, Weibull, Higuchi y Korsmeyer-Peppas. ⁽¹¹⁾

Los modelos cinéticos de liberación son de gran importancia para predecir el mecanismo de liberación del fármaco, ya que dichos modelos describen la cantidad de fármaco disuelta de la forma de dosificación en función del tiempo.

2.2.5.1 Cinética de orden cero

La cinética de orden cero describe al sistema cuando la velocidad de disolución del fármaco es independiente de la concentración. La ecuación que describe a este modelo es (Ecuación 2):

$$Q_1 = Q_0 + K_0 t \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde

Q_1 : la cantidad de fármaco disuelta en el tiempo t

Q_0 : la cantidad inicial de fármaco inicial

t: tiempo

K_0 : la constante de liberación de orden cero

2.2.5.2 Cinética de primer orden

En la cinética de primer orden, la velocidad de disolución del fármaco depende de la concentración y se puede expresar con la siguiente ecuación:

$$Q_1 = Q_0 e^{-K_1 t} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde

Q_1 : la cantidad de fármaco liberado en el tiempo t

Q_0 : la cantidad liberada de fármaco en el tiempo cero

t : tiempo

K_1 : la constante de liberación de primer orden

La ecuación 3, se presenta generalmente en su forma logarítmica quedando como sigue (Ecuación 4):

$$\log Q_1 = \log Q_0 - K_1 t \quad (\text{Ecuación 4})$$

Las formas de dosificación que principalmente siguen este modelo son aquellas en las que el fármaco es soluble en agua y se encuentran en matrices porosas.

2.2.5.3 Modelo de Weibull

El modelo de Weibull es una ecuación empírica, principalmente utilizada para la comparación de perfiles de liberación a partir de alguna matriz, puede ser aplicado a casi todos los tipos de perfiles de disolución; cuando se aplica a la disolución de fármacos o a la liberación de formas de dosificación, la ecuación de Weibull expresa la fracción acumulada de fármaco (m) en solución, al tiempo t , mediante la Ecuación 5:

$$m = 1 - e^{-\frac{(t-T_i)^\beta}{\alpha}} \quad (\text{Ecuación 5})$$

En esta ecuación, el parámetro α , define la escala de tiempo del proceso. T_i es el parámetro de localización que representa el tiempo de retraso antes del inicio del proceso de disolución o liberación y en la mayoría de los casos será cero, β es el parámetro de forma, que caracteriza a la curva como de forma exponencial ($\beta = 1$), forma sigmoidea, con una curvatura hacia arriba seguido de un punto de inflexión ($\beta > 1$), o de forma parabólica con una pendiente inicial y después de eso consistente con la exponencial ($\beta < 1$). Debido a que es un modelo empírico ayuda a describir las propiedades cinéticas de la disolución del fármaco. ⁽¹¹⁾

2.2.6 Comparación de perfiles de disolución

Para la comparación de perfiles de disolución se emplean modelos independientes como el factor de similitud (f_2) y el factor de diferencia (f_1).

2.2.6.1 Factor de Similitud (f_2)

El cálculo del factor de similitud es usado para comparar los perfiles de disolución de un producto de referencia y de prueba, el cual puede ser más exacto que depender de un solo punto, como en la prueba de disolución. El *factor de similitud* (f_2) es una medida de la similitud en porcentaje de fármaco disuelto entre dos curvas, se puede calcular con la ecuación 6:

$$f_2 = 50 * \log \left(\frac{100}{\sqrt{1 + \left(\frac{1}{n}\right) \sum_{t=1}^n (R_t - P_t)^2}} \right) \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde

t : tiempo

n : número de tiempos de muestreo

R_t : Promedio del % disuelto del medicamento de referencia en el tiempo t

P_t : Promedio del % disuelto del medicamento de prueba al tiempo t

Un valor de f_2 que se encuentra entre 50 y 100 indica similitud entre productos, se dice que dos perfiles son idénticos cuando $f_2 = 100$,⁽¹⁰⁾ para la comparación de perfiles de disolución se recomienda emplear 12 unidades de dosificación tanto para el producto prueba como el de referencia.

La comparación de perfiles por f_2 se lleva a cabo solamente si el CV% del porcentaje disuelto es menor o igual que el 20% para el primer tiempo de muestreo y menor o igual que el 10% para los tiempos subsecuentes.⁽²⁾ En el caso que tanto el medicamento de prueba como el medicamento de referencia se disuelvan 85% o más en 15 min o menos tiempo, en el medio de disolución, no es necesario emplear f_2 y los productos se clasifican como de muy rápida disolución.

2.3 Tabletas Sublinguales

Las tabletas sublinguales son formas farmacéuticas que se desintegran rápidamente en la cavidad oral (en este caso debajo de la lengua) utilizadas generalmente para lograr una acción rápida evitando el efecto del primer paso. Para su óptima formulación es necesario tomar en cuenta el mecanismo de absorción del fármaco, así como sus propiedades fisicoquímicas, los excipientes a usar, saborizantes, etc. ⁽¹²⁾

2.3.1 Propiedades fisicoquímicas del fármaco necesarias para una tableta sublingual

Las propiedades fisicoquímicas de un fármaco permiten saber con qué facilidad puede ser absorbido vía difusión pasiva a través de la membrana sublingual, la cavidad oral oscila entre valores de pH de 5.0 a 7.0, la cantidad de saliva es muy poca (flujo máximo de 1 mL/min) ⁽¹³⁾ en comparación a otros fluidos del tracto gastrointestinal, por lo que para una absorción eficiente se ha observado que las propiedades fisicoquímicas determinantes para la formulación de tabletas sublinguales son las siguientes:

- LogP: El mejor rango de $\log P$ es de 1 a 5, pues a valores mayores la solubilidad en la saliva no es suficiente como para obtener una concentración adecuada del fármaco para lograr su difusión a través de la capa lipídica.
- Peso molecular: Es preferible que el *peso molecular* del fármaco sea *menor a 500 g/mol*.
- pka: Es una propiedad en la cual se debe cuidar las especies predominantes en disolución en el rango de pH de la cavidad bucal del fármaco, se recomienda incluir un amortiguador que permita controlar la concentración de dichas especies para la absorción óptima del mismo. Los fármacos que no contienen grupos ionizables no se ven afectados por los cambios en el pH.
- Otros: A diferencia del tracto gastrointestinal, la cavidad oral tiene una superficie de absorción mucho más reducida, por lo que son recomendables fármacos cuyas dosis para surtir un efecto terapéutico sean pequeñas, de máximo 10 mg. ⁽¹²⁾

2.3.2 Características de las tabletas sublinguales

Debido al corto tiempo de residencia en la boca (máximo 30 min) es necesario que tanto la desintegración como la disolución de las tabletas sublinguales sean muy rápidas en la saliva para la posterior absorción del fármaco sin necesidad de líquidos adicionales para lograrlo.

Existen características físicas y mecánicas para una tableta como el tamaño, dureza, porosidad y humectabilidad que juegan un papel crucial a la hora de la desintegración. Una tableta pequeña

con baja dureza y alta porosidad se va a desintegrar más rápido que una con mayor tamaño o más dura. Sin embargo, una tableta con alta porosidad y baja dureza es más propensa a auto-desintegrarse, presentando problemas durante su empaque y manejo. Las tabletas sublinguales están diseñadas para promover la retención del principio activo debajo de la lengua, para evitar su deglución y para minimizar la variabilidad inter e intra individual.⁽¹²⁾

2.3.3 Pruebas de disolución en tabletas sublinguales

La prueba de disolución es parte del control de calidad *in vitro* que piden la mayoría de las farmacopeas a formas farmacéuticas sólidas como las tabletas sublinguales. Esta prueba ayuda a confirmar que la tableta libera la cantidad de principio activo declarada en su marbete en un volumen dado de medio de disolución dentro de un intervalo de tiempo designado; demuestra que la cantidad de principio activo está listo para su absorción después de su administración oral. En el caso específico de las tabletas sublinguales, la cantidad total del principio activo debe liberarse en cuestión de segundos, para una absorción máxima a través de las venas sublinguales en la circulación sistémica.⁽¹³⁾

La vía de administración sublingual no ha sido muy estudiada en comparación con la vía oral debido a que hay en existencia pocos productos en el mercado en forma de tabletas sublinguales, por lo que los métodos para pruebas de disolución se resumen a los utilizados con las tabletas convencionales, haciendo uso generalmente de los aparatos I y II de la USP, con volúmenes de disolución de 900 y 500 mL a una velocidad de 50 rpm, todas estas condiciones quedan a expensas de lo que indique la monografía del fármaco bajo estudio.^{(13) (14)}

En el caso de que algún fármaco no llegase a contar con una prueba de disolución publicada en alguna de las farmacopeas, se puede desarrollar una prueba con ayuda de un DOE, con el cual se espera establecer los factores críticos que influyen en la velocidad de disolución. El objetivo final es comprender los mecanismos de liberación y determinar si el método de disolución puede mostrar cambios en los factores de calidad críticos que pueden llegar a encontrarse al comparar perfiles de disolución de un mismo fármaco, con igual forma farmacéutica en productos de diferentes laboratorios.⁽¹⁴⁾

2.4 Diseño de experimentos (DOE)

El DOE juega un papel importante al estimar los efectos de diferentes variables simultáneamente en un experimento que se ha convertido en una herramienta científica al permitir al analista hacer cambios intencionales a un proceso o sistema con la finalidad de identificar y observar las razones por las cuales hay cambios en la respuesta.

En todo experimento, los resultados y las conclusiones provienen de una recolección larga y extenuante de datos, los cuales se usan para responder preguntas y proveer de información nueva que puede servir en el futuro para el planteamiento de nuevos experimentos mejorados y reducidos en costo y tiempo; para esto se debe tener bien definido el objetivo del experimento, así como la forma en la que se van a recolectar y tratar los datos; con el fin de lograr un exitoso DOE, Montgomery recomienda seguir los siguientes pasos en cada experimento:

1. Reconocer y escribir el planteamiento del problema.
2. Escoger los factores que se sospechen puedan afectar al problema y sus niveles.
3. Seleccionar las respuestas.
4. Escoger el diseño de experimentos que más se adapte al problema.
5. Llevar a cabo los experimentos, según el DOE.
6. Analizar los datos obtenidos.
7. Concluir y hacer las anotaciones pertinentes para futuras referencias.

Siguiendo los pasos anteriores es como un diseño puede llevar a tener un experimento con una mejor eficiencia, sin perder tiempo en estar probando hipótesis y haciendo estimados. ⁽¹⁵⁾

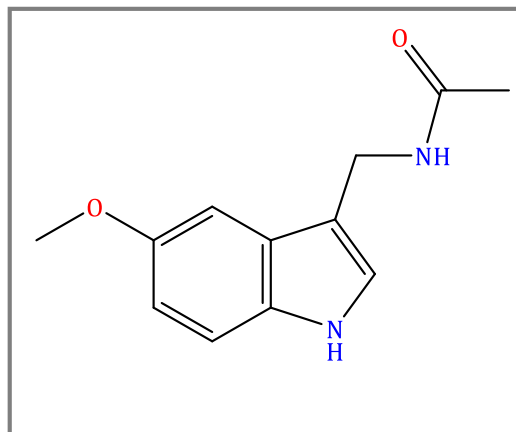
2.5 Melatonina

La Melatonina (MEL), *N*-[2-(5-metoxi-1*H*-indol-3-il)etil]acetamida (*Figura 3*), es una hormona que se encuentra en animales, plantas y hasta en organismos unicelulares ⁽¹⁶⁾; en mamíferos es producida por la glándula pineal, la cual se encuentra localizada en el centro del cerebro fuera de la barrera hematoencefálica. La secreción de melatonina se ve influenciada por la exposición a la luz/oscuridad, al haber oscuridad la secreción de dicha hormona aumenta y disminuye con la exposición a la luz, siendo así la responsable de la regulación del ritmo circadiano, algunos ejemplos de los usos de la melatonina son el tratamiento farmacológico del insomnio, la regulación de sueño de personas invidentes y en edad plena, regulación en personas que sufren del cambio rápido de varios husos horarios al viajar en avión (fenómeno conocido como jet-lag),

así como cuando se presenta la inversión de ritmos por trabajos nocturnos (rolar turnos), entre muchos otros usos. ⁽¹⁷⁾

2.5.1 Propiedades fisicoquímicas ⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾

- Peso molecular: 232.28 g/mol
- Nombre químico:
N-[2-(5-metoxi-1*H*-indol-3-il)etil]acetamida
- Fórmula: C₁₃H₁₆N₂O₂
- Aspecto: Sólido, polvo fino cristalino, color entre blanco y amarillo pálido.
- Punto de fusión: 116-118°C
- LogP (experimental): 1.6
- pka (predichos ChemAxon): 15.8
- Solubilidad en agua: 0.143 mg/mL



2.5.2 Propiedades farmacocinéticas

Absorción

La Melatonina se absorbe de forma rápida en la vía oral alcanzando concentraciones máximas en niveles plasmáticos después de los 20 a 60 minutos de su ingesta. ⁽²⁰⁾ Su vida media en plasma es corta, su biodisponibilidad es aproximadamente del 15% pues existe el efecto del primer paso y su absorción disminuye ante la presencia de alimentos. ⁽²¹⁾

Distribución

La unión de la melatonina a las proteínas plasmáticas *in vitro* es aproximadamente del 60%. Se une principalmente a la albúmina, a la glucoproteína ácida alfa1 y a las lipoproteínas de alta densidad. ⁽²¹⁾

Biotransformación y Eliminación

Los datos experimentales indican que el citocromo P450 participa en el metabolismo de la melatonina. El metabolito principal es la 6-sulfatoxi-melatonina (6-S-MT), que es inactivo. El lugar de biotransformación es el hígado. La excreción del metabolito es completa en las 12 horas siguientes a la ingestión. El tiempo de vida media (t_{1/2}) en circulación sanguínea es de 15 a 20

min. ⁽²²⁾ La eliminación tiene lugar por excreción renal de los metabolitos, el 89% en forma de conjugados sulfatados y glucurónicos de la 6-hidroximelatonina y el 2% en forma de melatonina (principio activo inalterado). ⁽²¹⁾

Para disminuir el efecto negativo que tiene la melatonina ante la presencia de alimentos como el efecto del primer paso y aprovechando que las dosis diarias necesarias para que tenga efecto terapéutico positivo son bajas (de 0.5 mg a 5 mg) ⁽²³⁾, se han desarrollado nuevas formulaciones que favorecen su biodisponibilidad como las tabletas sublinguales.

2.5.3 Presentaciones farmacéuticas en México

Las presentaciones farmacéuticas que se encuentran a la venta en México, actualmente, son las siguientes:

- Tabletas sublinguales de 3 y 5 mg (Benedorm® , Sub-Z® y Melatonina)
- Cápsulas de liberación prolongada de 3 y 5 mg (Cronocaps® y Melatonina)
- Tabletas de 3 mg (Revenox®)

A pesar de estar a la venta las tres diferentes presentaciones arriba mencionadas, en el listado actualizado de medicamentos de referencia de la COFEPRIS ⁽²⁴⁾, solo mencionan productos de referencia para las tabletas sublinguales y para las cápsulas de liberación prolongada, por lo tanto, las opciones se resumen a estas dos últimas para su posible estudio.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México la MEL se comercializa en tres diferentes presentaciones (tabletas, cápsulas de liberación prolongada y tabletas sublinguales). Para comprobar la intercambiabilidad entre tabletas sublinguales de melatonina la COFEPRIS solicita la prueba de perfil de disolución (B), siendo el medicamento referencia el producto Benedorm®⁽²⁰⁾. A la fecha, la FEUM no cuenta con monografía para llevar las pruebas de control de calidad, entre ellas el perfil de disolución. Por esta razón es importante desarrollar una prueba que permita discriminar entre productos para asegurar tanto la calidad de estos mismos de manera continua como su desempeño en la liberación del fármaco después de ciertos cambios que pueden llegar a tener como la formulación, el proceso, escalamiento y sitio de manufactura, que es lo que se propone el presente estudio.

4. HIPÓTESIS

El diseño de experimentos permitirá obtener datos reproducibles para definir una prueba de disolución, la cual será capaz de discriminar entre lotes de diferente velocidad de disolución de tabletas sublinguales de melatonina comercializadas en México, caracterizando apropiadamente la curva ascendente, el punto de inflexión y la fase de meseta, consiguiendo una propuesta sensible para el control de procesos de fabricación y cumplimiento de los requisitos establecidos en la NOM-177-SSA1-2013.

5. OBJETIVO GENERAL

Utilizar un diseño de experimentos para seleccionar las mejores condiciones que permitan evaluar los perfiles de disolución de algunos productos comerciales en México en presentación de tabletas sublinguales conteniendo 5 mg de melatonina, empleando diferentes condiciones de disolución.

5.1 Objetivos particulares

- Desarrollar y validar el método analítico para cuantificar melatonina en los medios de disolución de prueba: agua y solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8.
- Realizar un DOE que permita encontrar las condiciones óptimas para evaluar los perfiles de disolución de tabletas sublinguales en dosis de 5 mg, teniendo como factores la velocidad de agitación, diferentes tiempos de muestreo y medios de disolución.
- Evaluar el comportamiento de la liberación del fármaco mediante modelos cinéticos de disolución.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Desarrollo y Validación del Método para cuantificar MEL en estudios de disolución

6.1.1 Equipos e instrumentos

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Shimadzu LC10AT) acoplado a un detector UV-Visible (Shimadzu SPD-10AV).
- Espectrofotómetro UV-Visible (Shimadzu 1601).
- Balanza analítica (Sartorius Praxium 224-1S).
- Disolutor (Vankel VK7000-8).
- Potenciómetro (Thermo Orion Star A211).
- Centrífuga (Eppendorf 5416).
- Parrillas de calentamiento con agitación.
- Baño de ultrasonido (Cole-Parmer 08894-11).
- Micropipeta Eppendorf de 500-5000 μ L.
- Micropipeta Eppendorf de 1.0-10.0 mL.

6.1.2 Materiales

- Columna cromatográfica de 4.6 mm X 15 cm y tamaño de partícula de 5 μ m (ZORBAX Eclipse XDB C18, Agilent Technologies).
- Termómetro -1 a 260 °C (Brannan)
- Matraces volumétricos de 25, 50, 500, 1000, 2000 y 6000 mL.
- Celdas de cuarzo de 1 cm (Agilent).
- Portafiltros Swinnex de 25 mm.
- Cánulas de plástico.
- Filtros de teflón de 0.45 μ m de poro (Millipore).
- Tubos de ensaye 13 X 100 mm.
- Vasos de precipitados 100 y 250 mL.
- Probetas de 250, 500 y 1000 mL.
- Barras de agitación magnética.
- Espátulas.
- Mortero.
- Jeringas de plástico de 10 mL sin aguja.

6.1.3 Reactivos

- Estándar secundario de melatonina, pureza $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, lote SLBQ9501V).
- Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), grado reactivo (Cristal, J.T. Baker).
- Hidróxido de sodio (NaOH), grado reactivo (Lentejas, J.T. Baker).
- Ácido fosfórico (H_3PO_4), grado reactivo (J.T. Baker).
- Acetonitrilo (CH_3CN , MeCN), grado HPLC (J.T. Baker).
- Agua destilada (Elix-3, Millipore).
- Agua grado HPLC (Milli-Q, Millipore).

6.1.4 Control de calidad

Debido a la falta de una monografía en la FEUM y, dado que en la USP 38 la melatonina es considerada como suplemento dietético, la única prueba requerida en la monografía como control de calidad es la de valoración, por lo que el estudio se complementó realizando las siguientes pruebas: Identidad, Uniformidad de dosis y Valoración que se describen a continuación.

6.1.4.1 Identidad

La verificación de la identidad de la melatonina se llevó a cabo por medio del procedimiento de la valoración por CLAR, comparando el tiempo de retención de las muestras con el de la solución estándar.

Criterio de aceptación: El tiempo de retención del pico principal de la solución muestra corresponde al obtenido con el de la solución estándar.

6.1.4.2 Uniformidad de dosis

La uniformidad de dosis se demostró mediante el método de Uniformidad de Contenido, valorando 10 unidades individualmente usando el método de valoración reportado en la USP 38 para tabletas de melatonina. Se determinó el contenido de principio activo en cada una de las tabletas sublinguales como porcentaje de la cantidad declarada, relacionando el resultado con el obtenido en la solución estándar y se calculó el valor de aceptación de acuerdo al MGA 0299 de la FEUM. ⁽²⁵⁾

Solución muestra

De forma individual se colocaron las unidades en matraces de 50.0 mL, se disolvieron con 15 mL de fase móvil y posteriormente se llevaron al baño de ultrasonido por 20 min, se llevó al aforo con fase móvil, al final se filtró una porción de cada muestra con los portafiltros Swinnex a través de un filtro de 0.45 μm y se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos. La concentración final de cada solución es de 0.1 mg/mL.

Nota: Los matraces fueron protegidos de la luz con aluminio durante todo el tratamiento de la muestra. Para facilitar el filtrado de las muestras se tomaron alícuotas de aproximadamente 5 mL de cada muestra y se llevaban a la centrífuga a 300 rpm por 15 min.

Criterio de Aceptación: Las tabletas contienen no menos de 90.0% y no más de 110.0% de la cantidad declarada de melatonina ($\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$) y los valores de aceptación (VA) sean menores que $L1=15$.

6.1.4.3 Valoración

Solución amortiguadora (SAF pH 3.5)

Se pesaron 0.5 g de KH_2PO_4 , se disolvieron en 900 mL de agua grado HPLC y se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 1.0 L. Se ajustó con H_3PO_4 a un pH de 3.5 con ayuda del potenciómetro, se llevó al aforo con la misma agua y finalmente se filtró a través de una membrana de 0.45 μm .

Fase móvil

Se preparó una mezcla de MeCN y solución amortiguadora de fosfatos en una proporción 25:75, ambos fueron previamente filtrados de forma independiente a través de una membrana de 0.45 μm y la mezcla fue llevada al baño de ultrasonido por alrededor de 10 min.

Solución Estándar

Se pesaron 5.0 mg del STD de Melatonina, se transfirieron a un matraz volumétrico de 50.0 mL y se llevó al aforo con la fase móvil. La concentración final de esta solución es de 0.1 mg/mL.

Solución de aptitud del Sistema

Se tomó una alícuota de 1.5 mL de la Solución Estándar la cual se transfirió a un matraz de 25.0 mL y se llevó al aforo con la fase móvil. La concentración final de esta solución es de 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la cual se inyectó por sextuplicado.

Criterio de Aceptación: Los valores de coleo para cada pico deben ser menores que 2.5 y la desviación estándar relativa para cada réplica de inyección no debe ser mayor al 2%.

Solución muestra

Se pesaron 20 unidades de cada medicamento, se calculó su peso promedio y posteriormente con ayuda de un mortero con pistilo se trituraron hasta que se obtuvo un polvo fino. Se pesó lo equivalente a 5.0 mg de melatonina, se transfirió el polvo a un matraz de 50.0 mL, se disolvió con aproximadamente 15 mL de fase móvil y posteriormente se llevó al baño de ultrasonido por 20 min, se llevó al aforo con fase móvil, se filtró una porción de cada muestra con los portafiltros Swinnex a través de un filtro de 0.45 µm y se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos. La concentración final de cada solución es de 0.1 mg/mL.

Nota: Los matraces fueron protegidos de la luz con aluminio durante todo el tratamiento de la muestra. Para facilitar el filtrado de las muestras se tomaron alícuotas de aproximadamente 5 mL de cada muestra y se llevaban a la centrifuga a 300 rpm por 15 min.

Condiciones Cromatográficas

- ✓ Modo: HPLC
- ✓ Detector: UV 222 nm
- ✓ Columna: ZORBAX Eclipse XDB C18 4.6 mm X 15 cm, 5 µm
- ✓ Velocidad de flujo: 1.5 mL/min
- ✓ Volumen de inyección: 10 µL
- ✓ Fase móvil: MeCN: BF a pH 3.5 (25:75)

Para el cálculo del porcentaje de la cantidad declarada de MEL en la porción de tabletas tomada, se empleó la siguiente fórmula (*Ecuación 7*):

$$\%MEL = \left(\frac{A_m}{A_{STD}} \times \frac{C_{STD}}{C_m} \right) 100 \quad (\text{Ecuación 7})$$

Donde:

A_m = Área del pico de la Solución muestra.

A_{STD} = Área del pico de la Solución estándar.

C_{STD} = Concentración de MEL en la Solución estándar (mg/mL).

C_m = Concentración de MEL en la Solución muestra (mg/mL).

Criterio de Aceptación: Las tabletas contienen no menos de 90.0% y no más de 110.0% de la cantidad declarada de melatonina (C₁₃H₁₆N₂O₂).

6.1.5 Validación del método analítico

La NOM-177-SSA1-2013 establece que, para asegurar la validez de los resultados obtenidos en perfiles de disolución, la metodología analítica debe estar previamente validada. Se realizó la validación del método con el fármaco y con los medicamentos utilizando agua como medio de disolución.

Parámetros de validación con el fármaco

- ✓ Linealidad
- ✓ Precisión
- ✓ Estabilidad*
- ✓ Influencia del filtro*

Parámetros de validación con el medicamento

- ✓ Linealidad
- ✓ Exactitud
- ✓ Precisión
 - Reproducibilidad
 - Repetibilidad
- ✓ Selectividad*

*Resultados experimentales obtenidos por el grupo de trabajo del laboratorio 112 de Biofarmacia para el producto de referencia Benedorm[®] y el de prueba Sub-Z[®](datos no publicados).

6.1.5.1 Validación con el Fármaco

Preparación de la Curva de Calibración (CC)

Solución Stock de MEL (0.1 mg/mL)

Se pesó con exactitud 5.0 mg del estándar secundario de MEL, se transfirió cuantitativamente a un matraz de 50.0 mL y se llevó a la marca de aforo con agua destilada, esta solución contiene una concentración de 0.1 mg/mL equivalente a 100 µg/mL de melatonina.

Curva de Calibración (CC)

A partir de la solución Stock se realizaron las diluciones que se muestran en la Tabla 1 para preparar la CC, el rango de concentraciones seleccionado fue de 2 a 12 µg/mL, a las cuales se determinó su absorbancia a una longitud de onda de 222 nm usando como blanco agua destilada en el método espectrofotométrico.

Tabla 1. Soluciones para la Curva de calibración de MEL

Solución	Alicuota de Stock (mL)	Aforo final (mL)	Concentración final (µg/mL)
1	3.0	25.0	12
2	2.5	25.0	10
3	2.0	25.0	8
4	1.5	25.0	6
5	1.0	25.0	4
6	0.5	25.0	2

Parámetros de validación

Linealidad:

Se prepararon y analizaron dos CC. Se calculó su coeficiente de correlación (r), la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el error relativo debido a la regresión (%ERR), para este último se ocupó la ecuación 8:

$$ERR\% = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 8})$$

En donde:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - (m * \sum yx) - (b * \sum y)}{n - 2}}$$

$S_{y/x}$ = desviación estándar de la regresión

\bar{y} = promedio de la respuesta

x = concentración

y = respuesta

$n - 2$ = grados de libertad

m = pendiente

b = ordenada al origen

Criterio de Aceptación: $r \geq 0.99$ y ERR% no mayor al 2%.

Precisión:

Con los datos de las CC realizadas para linealidad se determinó el Factor respuesta (Fr) de cada nivel de concentración como indica la ecuación 9 para finalmente calcular el coeficiente de variación CV%.

$$Fr = \frac{Abs}{C_i} \quad (\text{Ecuación 9})$$

Donde:

Fr = Factor respuesta

Abs = Absorbancia

C_i = Concentración nominal de cada nivel de la CC

Criterio de Aceptación: CV% del Fr debe ser menor o igual que el 2%.

6.1.5.2 Validación con el Medicamento

La validación del medicamento se llevó a cabo solamente con el producto de Farmacias Similares *Melatonina*, pues los otros dos productos del mercado nacional (Benedorm® y Sub-Z®) fueron validados previamente por el grupo de trabajo del laboratorio 112 de Biofarmacia (datos no publicados); se demostró que el método para dichos productos era lineal, preciso y exacto en un intervalo de concentración de 1 a 12 µg/mL.

Para el análisis del medicamento *Melatonina* se pesaron con exactitud y de manera individual 20 tabletas sublinguales conteniendo 5 mg de MEL de cada lote (181223 y 181226), las cuales posteriormente se trituraron en un mortero hasta la obtención de un polvo fino y homogéneo. Con los datos del peso de las tabletas se calculó su peso promedio, se pesó el equivalente a 5 mg de MEL del polvo de las tabletas, se colocaron en un matraz de 50.0 mL, se disolvieron con 15 mL de agua destilada; la solución se sonicó por 20 min y se llevó a la marca de aforo. Esta solución tiene una concentración aproximada de 0.1 mg/mL.

La curva de calibración se realizó de la misma forma que en el apartado 6.1.5.1 Validación con el Fármaco (*Tabla 1*).

Parámetros de validación con el medicamento

Los parámetros que se evaluaron fueron: *linealidad, exactitud, precisión, reproducibilidad y selectividad*; a continuación, se describe la metodología que se siguió para la evaluación de dichos parámetros.

Linealidad

Se prepararon tres CC por día, durante dos días por cada lote de medicamento y se determinaron los valores de absorbancia a una longitud de onda de 222.0 nm.

A partir de los valores de absorbancia obtenidos se calcularon los siguientes parámetros: pendiente (m), coeficiente de correlación (r), ordenada al origen (b) y el error relativo debido a la regresión (%ERR), éste último con la Ecuación 8.

Criterio de Aceptación: El método debe demostrar una linealidad con al menos 5 puntos (incluyendo los puntos extremos, excluyendo el cero) por triplicado, con un $r \geq 0.99$ y un $ERR\% < 3\%$.

Exactitud

La exactitud del medicamento se evaluó con el cálculo de la Desviación Absoluta (% DEA) para cada nivel de la curva, mediante la concentración experimental cuantificada utilizando la ecuación 10:

$$\%DEA = \left| \frac{\text{Concentración nominal} - \text{Concentración experimental}}{\text{Concentración nominal}} \right| \times 100 \quad (\text{Ecuación 10})$$

Criterio de Aceptación: El % DEA no debe variar en más de 3% en cada nivel de concentración.

Precisión

La precisión fue evaluada mediante dos parámetros: repetibilidad y reproducibilidad.

Repetibilidad

Se calculó el CV% de los valores de absorbancia obtenidos de cada nivel de la curva, de las tres CC realizadas en un mismo día.

Criterio de Aceptación: El $CV\% \leq 3\%$.

Reproducibilidad

Se calculó el CV% de las concentraciones experimentales cuantificadas de cada nivel de la CC, de las tres CC realizadas durante dos días.

Criterio de Aceptación: El CV% global, del porcentaje cuantificado, debe ser menor o igual al 3%.

Selectividad

Se prepararon soluciones de 6 µg/mL (*Tabla 1*) utilizando cada uno de los lotes a estudiar del medicamento Melatonina y del STD de MEL. Para cada solución se realizó un barrido en el espectrofotómetro de UV-Vis de los 190 nm a los 400 nm. Se compararon visualmente los espectros obtenidos.

Este parámetro fue realizado con el medicamento de referencia (Benedorm®) y el de prueba SUB-Z® por el grupo de trabajo del laboratorio 112, se reportó que el método era selectivo en la longitud de onda seleccionada (222.0 nm) para dichos medicamentos (datos no publicados).

Criterio de aceptación: Cualquier interferencia no debe producir un error mayor al aceptado en precisión y exactitud, que es de 3%.

6.2 Productos bajo estudio

Para llevar a cabo el estudio se seleccionaron productos conteniendo melatonina, en presentación de tabletas sublinguales y dosis de 5 mg. Se encontró que en México se venden tres diferentes marcas: BENEDORM®, MELATONINA (de venta en Farmacias Similares) y SUB-Z®; sin embargo, se detectó que tanto las tabletas sublinguales BENEDORM® como MELATONINA provenían del mismo laboratorio e incluso contaban con el mismo número de registro sanitario, aun así, se prosiguió con el estudio de los tres medicamentos, los cuales fueron adquiridos directamente en la farmacia. En la Tabla 2 se resumen los datos relevantes de los productos analizados.

El producto con clave BEN DOE fue utilizado para seleccionar las mejores condiciones para realizar los perfiles de disolución de los productos cuyas claves son: BEN 1, BEN 2, MT 1, MT 2, SUB 1 y SUB 2.

Tabla 2. Medicamentos a analizar, tabletas sublinguales conteniendo 5 mg de MEL

Producto	Lote	Fecha de caducidad	Clave	No. de registro	Laboratorio
BENEDORM®	193348	Feb-2019	BEN DOE	389M98 SSA IV	<i>Laboratorios Servet, S.A. de C. V.</i>
	133683	Feb-2018	BEN 1		
	172404	Sep-2018	BEN 2		
MELATONINA	181223	Nov-2018	MT 1		
	181226		MT2		
SUB-Z®	16G0058	Jul-2018	SUB 1		
	16G0060		SUB 2	VI	

6.3 Estudio de perfiles de disolución

6.3.1 Preparación de los medios de disolución

Fosfato monobásico de potasio 0.2 M (KH₂PO₄ 0.2 M)

Pesar con exactitud 27.22 g de KH₂PO₄, colocarlo en un matraz de 1.0 L, disolver en un volumen mínimo de agua y llevar a la marca de aforo.

Hidróxido de sodio 0.2 M (NaOH 0.2 M)

En un matraz de 1.0 L, disolver 8 g de NaOH en agua; llevar a volumen con el mismo disolvente.

Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 (SAF pH 6.8)

Para 1.0 L de solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8, colocar 250 mL de la solución de KH₂PO₄ 0.2 M y 118.25 mL de la solución de NaOH 0.2M, llevar a la marca de aforo con agua destilada.

Desgasificación del medio de disolución

Se siguió el procedimiento dictado en la FEUM, undécima edición. El cual consiste en calentar el medio de disolución a 45°C e inmediatamente filtrar a vacío a través de un filtro con tamaño de poro de 0.45 µm con agitación vigorosa.

6.3.2 Selección de las mejores condiciones de disolución empleando el Diseño de Experimento (DOE)

Con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas para llevar a cabo los perfiles de disolución, se empleó el DOE del tipo 2³, en el cual cada variable (tiempo de muestreo, medio de disolución y velocidad) contó con dos niveles (+ y -) diferentes. En la Tabla 3 se resumen las condiciones experimentales del DOE.

Tabla 3. Condiciones para el DOE 2³

Variable	Condición fija	Variable DOE	Nivel menor (-)	Nivel mayor (+)
Aparato USP	<i>II (Paletas)</i>	Tiempo de muestreo (tm) A	<i>tm 1</i>	<i>tm 2</i>
Volumen del medio	<i>500 ± 5 mL</i>		<i>1, 4, 8, 12, 16 y 20 min</i>	<i>2, 6, 10, 14, 18 y 20 min</i>
Volumen de alícuota en muestreo	<i>5 mL, sin reposición de medio</i>	Medio B	<i>Agua destilada</i>	<i>SAF pH 6.8</i>
Temperatura del medio	<i>37 ± 0.5 °C</i>	Velocidad de agitación C	<i>50 rpm</i>	<i>75 rpm</i>

En la *Tabla 4* se especifican las condiciones de cada uno de los ocho experimentos (estudios de disolución) que se realizaron. En cada caso se evaluaron 6 unidades del producto de referencia (Benedorm®). Las alícuotas de muestreo se filtraron con ayuda de filtros de teflón con tamaño de poro de 0.45 µm y se depositaron en tubos de ensayo forrados con aluminio para su posterior lectura al espectrofotómetro a una longitud de onda de 222.0 nm. Como blanco de reactivo se utilizó el medio de disolución correspondiente a cada experimento.

6.3.3 Evaluación de los perfiles de disolución de los productos bajo estudio

Los perfiles de disolución se llevaron a cabo analizando 12 unidades de dosificación de cada lote del producto de referencia (Benedorm®) así como de sus medicamentos de prueba (Melatonina y Sub-Z®) conteniendo 5 mg de MEL.

Se empleó el aparato II a 50 rpm con un volumen de 500 ± 5 mL de agua destilada a 37 ± 0.5 °C. Se tomaron muestras de 5 mL a los siguientes tiempos de muestreo: 2, 4, 6, 8, 12 y 20 min, se filtraron a través de un filtro de teflón, con tamaño de poro de 0.45 µm y se depositaron en

tubos de ensayo forrados con aluminio para su lectura al espectrofotómetro a una longitud de onda de 222.0 nm. Como blanco se usó agua destilada.

Tabla 4. Estudios de disolución del DOE 2³

Experimento / Variable	A tm	B Medio	C Velocidad de agitación
1	- tm 1	- Agua destilada	- 50 rpm
2	+ tm 2	- Agua destilada	- 50 rpm
3	- tm 1	+ SAF pH 6.8	- 50 rpm
4	+ tm 2	+ SAF pH 6.8	- 50 rpm
5	- tm 1	- Agua destilada	+ 75 rpm
6	+ tm 2	- Agua destilada	+ 75 rpm
7	- tm 1	+ SAF pH 6.8	+ 75 rpm
8	+ tm 2	+ SAF pH 6.8	+ 75 rpm

6.3.3.1 Determinación del porcentaje disuelto

La concentración de MEL en cada una de las muestras se calculó mediante la interpolación de los datos de absorbancia en la ecuación de la recta de la CC preparada el mismo día de la realización del perfil de disolución, empleando la siguiente ecuación (*Ecuación 11*):

$$X_i = \frac{Y_i - A}{B} \quad (\text{Ecuación 11})$$

en donde

X_i = concentración de MEL al i-ésimo tiempo de muestreo (mg/mL)

Y_i = absorbancia de la muestra al i-ésimo tiempo de muestreo

A = ordenada al origen

B = pendiente de la CC

Se calcularon los miligramos de MEL disuelta en el volumen de muestra tomada al i -ésimo tiempo de muestreo utilizando la fórmula siguiente

$$E_i = (X_i)(V)(Fd) \quad (\text{Ecuación 12})$$

donde

E_i = mg disueltos de MEL en el volumen de la alícuota tomada al i -ésimo tiempo,

V = volumen de alícuota tomada (5 mL).

Fd = factor de dilución

Para determinar los miligramos de melatonina disueltos al i -ésimo tiempo de muestreo en el total de volumen del vaso, se empleó la fórmula:

$$V_i = V_0 - [(n - 1)V]$$
$$D_i = (X_i)(V_i)(Fd) + \sum_{i=0}^{n-1} E_i \quad (\text{Ecuación 13})$$

donde

D_i = mg de MEL disueltos al i -ésimo tiempo de muestreo en el total de medio

X_i = concentración de MEL en mg/mL al i -ésimo tiempo de muestreo

Fd = factor de dilución

E_i = mg de MEL disueltos en el volumen de muestra tomada al i -ésimo tiempo de muestreo

V_i = volumen de medio de disolución al i -ésimo tiempo de muestreo (mL)

V_0 = volumen inicial del medio de disolución (500 mL)

n = número de extracciones

V = volumen de muestra tomada (5 mL).

Finalmente, se calculó el porcentaje de melatonina disuelto a cada tiempo

$$\%Disuelto = \frac{D_i}{Dosis} \times 100\% \quad (\text{Ecuación 14})$$

donde

D_i = mg de MEL disueltos al i -ésimo tiempo de muestreo

$Dosis$ = dosis reportada de melatonina en el marbete (5 mg).

6.3.3.2 Modelado matemático y comparación de perfiles de disolución

Con los datos obtenidos de los perfiles de disolución de los medicamentos bajo estudio se llevó a cabo la comparación entre ellos usando el factor de similitud f_2 , los perfiles se consideraron similares cuando el valor de f_2 era mayor a 50.

Para el modelado de datos se utilizó la macro de Excel DDSolver, con el cual se compararon los modelos de orden cero, primer orden y de Weibull. Para decidir qué modelo se ajustaba más a los datos se usaron criterios estadísticos como el valor del coeficiente de determinación (r^2) más cercano a 1 y el Criterio de Akaike cuyo valor fuera el menor entre los tres distintos modelos.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Desarrollo y Validación del Método para la cuantificación de MEL en estudios de disolución

7.1.1 Control de Calidad: Identidad, Valoración y UC

En las Tablas 5, 6 y 7 se muestran los resultados para las pruebas de control de calidad realizadas a los medicamentos bajo estudio.

Tabla 5. Resultados de identidad y valoración de los medicamentos bajo estudio

Producto	Identidad	Valoración	Dictamen	
	tr (min) tr _{STD MEL} = 3.533 min	Contenido de MEL (90.0% - 110.0%)		
Referencia	BEN 1	3.459	93.5	CUMPLE
	BEN 2	3.454	93.1	CUMPLE
	MT 1	3.455	91.1	CUMPLE
	MT 2	3.464	90.8	CUMPLE
	SUB 1	3.456	94.2	CUMPLE
	SUB 2	3.465	95.0	CUMPLE

Para la prueba de valoración, se encontró que todos los lotes de los productos estudiados cumplen con el criterio de aceptación, pues su contenido promedio quedó dentro del rango de 90.0% - 110% de lo indicado en el marbete (5 mg).

Se valoró un producto por día (ambos lotes de cada uno) y dentro de esta prueba se evaluó la Aptitud del sistema, inyectando una solución de estándar por sextuplicado para cada día, con una concentración de 6 µg/mL; el sistema mostró ser apto para el análisis de MEL al haber cumplido con el criterio de aceptación, ya que durante los tres días se obtuvo un factor de coleo menor que 2.5 y la desviación estándar relativa del tr y el área del pico característico de MEL (CV%) fue menor al 2%, como se puede ver a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados de la prueba de valoración

Día	1	2	3	Dictamen
Factor Coleo < 2.5	1.193	1.189	1.196	CUMPLE
tr (min)	3.590	3.609	3.502	CUMPLE
CV% < 2%	0.082	0.157	0.212	
Área	234237.7	239733.2	232303.5	CUMPLE
CV% < 2%	0.180	0.703	0.536	

De manera gráfica en la *Figura 4* se pueden observar los cromatogramas típicos de soluciones de los medicamentos conteniendo MEL (0.1 mg/mL) cuyos tr del pico principal corresponde al mostrado por la solución del estándar, por lo tanto, *los productos cumplen con la prueba de identidad.*

Tabla 7. Resultados de la Uniformidad de Contenido de los productos bajo estudio

Tableta	%Contenido de MEL					
	BEN 1	BEN 2	MT 1	MT 2	SUB 1	SUB 2
1	92.8	93.3	95.7	94.7	97.4	94.3
2	96.7	95.4	97.6	97.5	98.0	92.4
3	92.9	92.9	93.9	95.8	100.0	93.0
4	98.5	95.2	95.8	94.7	109.0	99.2
5	94.0	95.2	95.6	95.0	95.4	97.5
6	96.7	96.0	96.9	95.7	98.5	92.3
7	96.0	90.4	95.0	93.6	97.3	98.6
8	93.1	94.5	92.3	94.8	93.2	100.8
9	94.7	92.9	100.0	97.5	98.7	93.4
10	95.0	94.3	94.7	96.5	96.6	92.8
VA	8.06	8.47	7.84	5.99	10.1	10.8
Dictamen VA < L1=15	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE

En la Tabla 7 se muestra el porcentaje de contenido de melatonina de cada una de las 10 tabletas analizadas individualmente para cada producto, se encontró que todas cumplen con estar dentro del criterio de aceptación de 90.0% - 110.0% del contenido declarado, de igual forma todos los Valores de Aceptación (VA) calculados para cada producto quedaron por debajo del máximo valor de aceptación permitido en porcentaje (L1=15) por lo que *la variación de los contenidos individuales de todos los productos bajo estudio resultó estar dentro de los límites establecidos.*

7.1.2 Validación del método analítico

7.1.2.1 Validación con el fármaco: Linealidad y Precisión

En la *Tabla 8* se resumen los resultados obtenidos para evaluar la linealidad y precisión del método, se obtuvo un coeficiente de correlación (r) mayor a 0.99, un error debido a la regresión (ERR%) menor al 2% y el coeficiente de variación por parte de los Fr (CV% Fr) fue menor al 2.0%. La CC del fármaco (*Figura 5*) mostró una respuesta (Absorbancia) directamente proporcional a la concentración de MEL en el intervalo de trabajo establecido (2 – 12 µg/mL).

Dichos resultados indican que *el método analítico es lineal y preciso* de acuerdo con lo establecido en la NOM-117-SSA1-2013.

Tabla 8. Resultados de la validación con el fármaco: linealidad y precisión

Parámetro	Criterio de Aceptación	CC		Dictamen
		Día 1	Día 2	
Linealidad	$r \geq 0.99$	0.9999	1.0000	CUMPLE
	$ERR\% \leq 2.0\%$	0.8	0.7	CUMPLE
Precisión	$CV\% Fr \leq 2\%$	1.3	1.9	CUMPLE

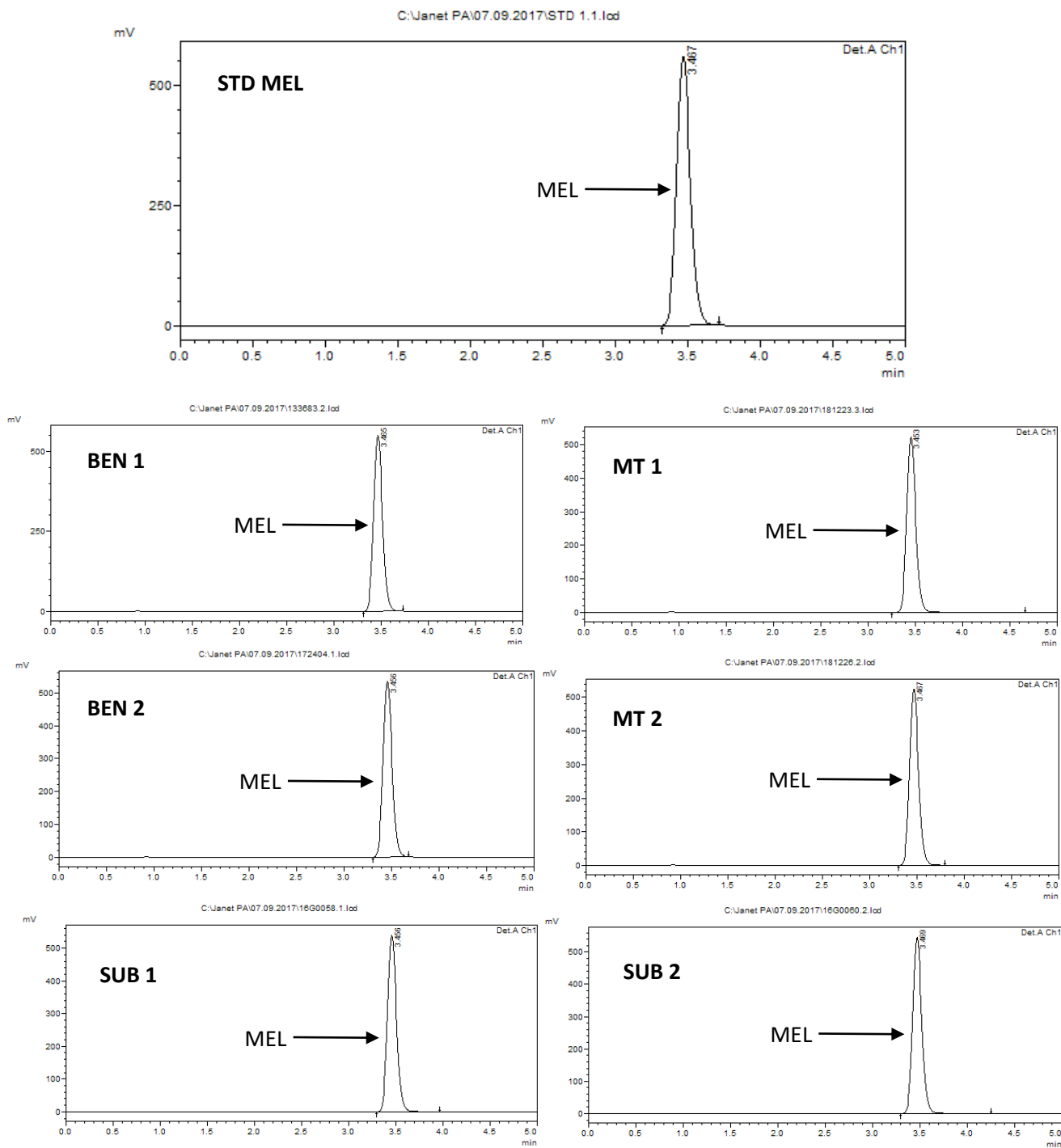


Figura 4. Cromatogramas obtenidos en la prueba de identidad para el STD de MEL y los medicamentos.

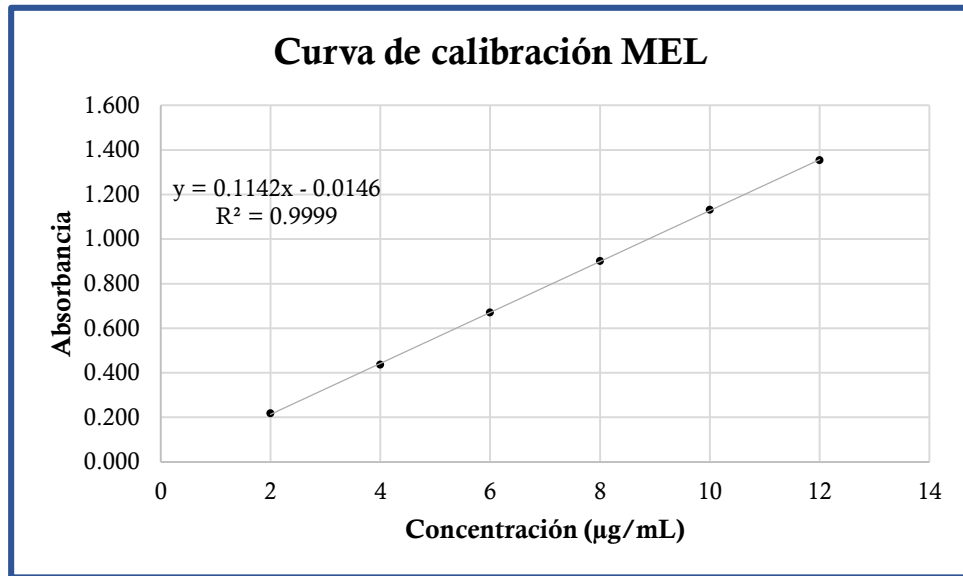


Figura 5. Curva de calibración del fármaco (MEL)

Estabilidad e influencia del filtro

Estos parámetros fueron realizados por el grupo de trabajo del laboratorio 112 de Biofarmacia como apoyo a este proyecto (datos no publicados); *se demostró la estabilidad de la melatonina* en soluciones de 1 y 12 µg/mL en agua, *tanto a temperatura ambiente como en refrigeración*; se observó que a temperatura ambiente la %DAC respecto a la respuesta inicial fue menor al 3% hasta las 4 horas (el %DAC obtenido fue de 0.96% y 0.11% para las soluciones de 1 µg/mL y 12 µg/mL, respectivamente), mientras que en refrigeración lo fue hasta las 72 horas (el %DAC obtenido fue de 2.24% y 1.73% para las soluciones de 1 µg/mL y 12 µg/mL, respectivamente).

Para la influencia del filtro se encontró que el porcentaje retenido (%Ret), tanto para el nivel bajo de concentración (2 µg/mL) como para el alto (8 µg/mL) fue de 0.962% y 0.099% respectivamente, ambos menores al 2%, lo que indica que la *adherencia del fármaco al filtro es baja* y que los filtros de teflón de 0.45 µm son adecuados para realizar los perfiles de disolución.

7.1.2.2 Validación con el medicamento

Linealidad, Precisión y Exactitud

En la *Figura 6, 7* y en la *Tabla 10* se demuestra la linealidad del método analítico y los resultados obtenidos los dos días de la validación del método utilizando ambos lotes del medicamento de prueba Melatonina (MT 1: 181223 y MT 2: 181226). La validación con el medicamento de referencia Benedorm® y el de prueba Sub-Z® se realizó por el grupo de trabajo del laboratorio 112 de Biofarmacia (datos no publicados).

Para todos los productos se observó que el método fue lineal ya que en todas las CC realizadas se obtuvo un coeficiente de correlación (r) mayor a 0.99 y un ERR% menor al 3%. El método fue repetible ya que el CV% del porcentaje cuantificado no fue mayor al 3% en cada día para cada nivel de concentración, y es un método exacto ya que el valor de la DEA% fue menor al 3% para cada concentración nominal de la curva (*Tabla 10*). De igual forma el método es reproducible ya que como se muestra en la *Tabla 9* el CV% global de los datos de exactitud del método (concentración experimental) fue menor al 3%.

Es por lo anterior que el método cumplió con todos los parámetros analíticos establecidos por la NOM-177-SSA1-2013, para llevar a cabo la evaluación de perfiles de disolución. ⁽²⁾

Tabla 9. Resultados de la reproducibilidad en el método

Producto	Concentración (µg/mL)	Concentración recuperada de MEL (µg/mL)			
		Precisión		Reproducibilidad	
		Día 1	Día 2	CV%	Criterio CV% global ≤ 3%
MT 1	2.0	2.047	1.986	2.7	CUMPLE
	4.0	3.898	3.953	1.9	CUMPLE
	6.0	5.964	6.031	1.6	CUMPLE
	8.0	8.163	8.185	2.3	CUMPLE
	10.0	9.975	9.859	0.8	CUMPLE
	12.0	11.958	11.999	0.6	CUMPLE
MT 2	2.0	1.963	2.054	2.6	CUMPLE
	4.0	3.889	4.022	1.0	CUMPLE
	6.0	6.106	5.986	0.7	CUMPLE
	8.0	8.195	7.859	0.3	CUMPLE
	10.0	9.882	10.004	0.9	CUMPLE
	12.0	11.958	12.082	0.6	CUMPLE

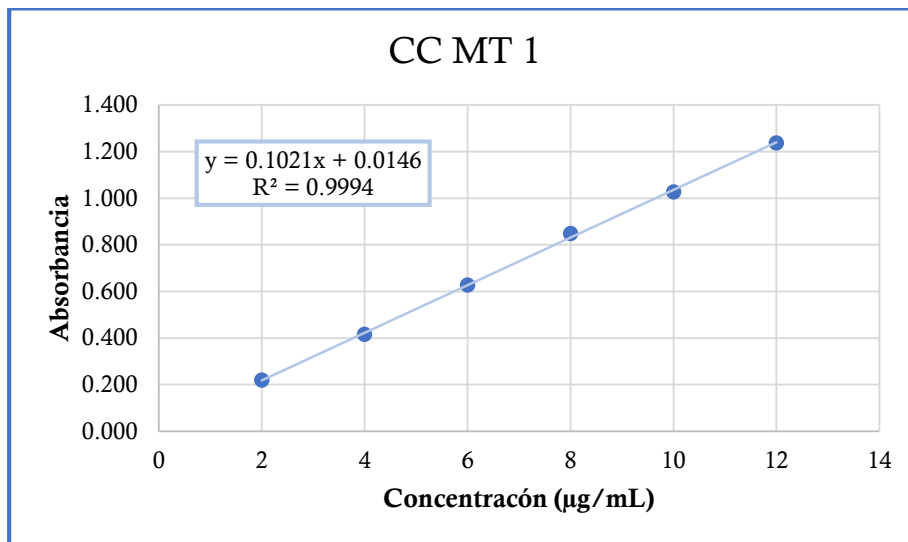


Figura 6. Curva de calibración para evaluar linealidad del medicamento MT1

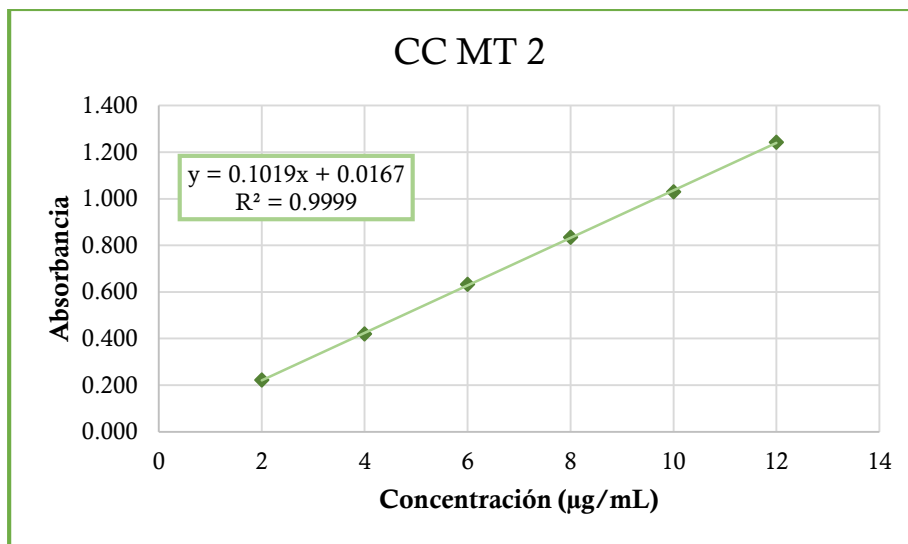


Figura 7. Curva de calibración para evaluar linealidad del medicamento MT

Tabla 10. Resumen de los parámetros evaluados en la validación con el medicamento Melatonina: linealidad, precisión y exactitud

Producto	Días	Concentración (µg/mL)	Concentración recuperada de MEL (µg/mL)				Precisión		Exactitud
			Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	Repetibilidad		
							DE	CV% ≤ 3%	% DEA < 3%
MT 1	Día 1	2.0	2.026	2.036	2.068	2.047	0.022	1.1	2.4
		4.0	3.915	3.921	3.857	3.898	0.035	0.9	2.6
		6.0	5.968	5.951	5.973	5.964	0.011	0.2	0.6
		8.0	8.177	8.146	8.165	8.163	0.016	0.2	2.0
		10.0	9.949	9.992	9.983	9.975	0.022	0.2	0.3
		12.0	11.964	11.954	11.954	11.958	0.006	0.0	0.4
	Linealidad	$r \geq 0.99$	0.9997	0.9998	0.9996	CUMPLE			
		ERR% < 3%	1.5	1.3	1.7				
	Día 2	2.0	2.034	1.949	1.937	1.986	0.053	2.7	0.7
		4.0	3.953	3.946	3.959	3.953	0.006	0.2	1.2
		6.0	5.989	6.063	6.041	6.031	0.038	0.6	0.5
		8.0	8.152	8.181	8.223	8.185	0.036	0.4	2.3
		10.0	9.747	9.917	9.915	9.859	0.097	1.0	1.4
		12.0	12.125	11.944	11.927	11.999	0.110	0.9	0.0
Linealidad	$r \geq 0.99$	0.9992	0.9996	0.9995	CUMPLE				
	ERR% < 3%	2.3	1.6	1.8					
MT 2	Día 1	2.0	1.973	1.986	1.953	1.963	0.016	0.8	1.8
		4.0	3.877	3.900	3.890	3.889	0.012	0.3	2.8
		6.0	6.122	6.076	6.119	6.106	0.025	0.4	1.8
		8.0	8.176	8.202	8.207	8.195	0.017	0.2	2.4
		10.0	9.909	9.834	9.902	9.882	0.041	0.4	1.2
		12.0	11.943	12.000	11.929	11.958	0.038	0.3	0.4
	Linealidad	$r \geq 0.99$	0.9995	0.9994	0.9994	CUMPLE			
		ERR% < 3%	1.9	2.0	2.0				
	Día 2	2.0	2.103	2.030	2.006	2.054	0.051	2.5	2.7
		4.0	4.047	4.018	4.001	4.022	0.023	0.6	0.6
		6.0	5.867	6.025	6.065	5.986	0.104	1.7	0.2
		8.0	7.812	7.851	7.916	7.859	0.053	0.7	1.8
		10.0	10.070	10.001	9.941	10.004	0.065	0.6	0.0
		12.0	12.100	12.075	12.072	12.082	0.016	0.1	0.7
Linealidad	$r \geq 0.99$	0.9994	0.9998	0.9999	CUMPLE				
	ERR% < 3%	2.0	1.2	1.0					

Selectividad

En la *Figura 8* se observa la superposición de los espectros de absorción del STD de MEL con los dos lotes del medicamento, con lo que se puede concluir que *no existen interferencias y por lo tanto el método analítico para cuantificar melatonina en agua usando una longitud de onda en el espectrofotómetro de 222.0 nm es selectivo.*

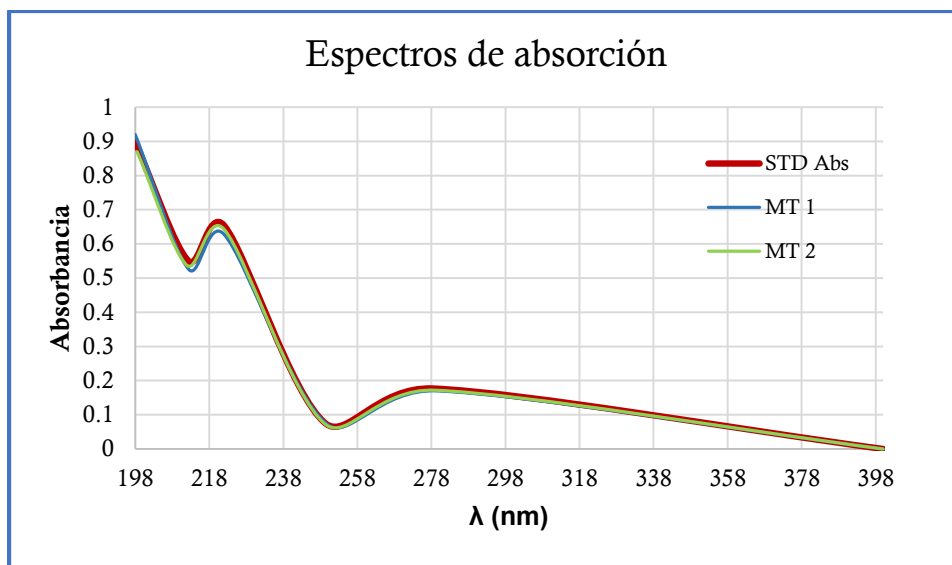


Figura 8. Espectros de absorción del STD de MEL y los medicamentos MT1 y MT 2

7.2 Estudio de perfiles de disolución

7.2.1 Condiciones de disolución y DOE

7.2.1.1 Modelado de datos del DOE

Previo al análisis del DOE se ajustaron los datos obtenidos a diferentes modelos de disolución (*Tabla 11*) con ayuda de la macro para Excel DDSOLVER; se encontró que los estimados de coeficiente de determinación, así como los valores de Akaike fueron mejores (r^2 mayor y AIC menor) al utilizar la expresión de Weibull (Ecuación 5).

Los resultados del ajuste de los datos de disolución a la función de Weibull del producto analizado en el DOE (BEN DOE) se muestran en la *Tabla 12* haciendo un análisis cualitativo de los datos, se observó que para todos los experimentos β fue menor a 1, esto significa que la curva no cambió su forma en ninguno de los experimentos, la cual es parabólica con una pendiente inicial pronunciada y después sigue un comportamiento consistente con una exponencial⁽¹¹⁾; los valores obtenidos de α y Td mostraron un aparente efecto por parte del medio

de disolución y la velocidad, pues en los experimentos donde se dejaron fijas dichas variables se tuvieron valores semejantes en estos parámetros, excluyendo así algún efecto por parte del t_m hacia el experimento.

Tabla 11. Modelado de datos del DOE 2³

Experimento Variables (t_m /Medio/vel)	Modelos					
	Orden cero		Primer orden		Weibull	
	r^2	AIC	r^2	AIC	r^2	AIC
1 (---)	0.1464	63.5831	0.9305	43.0904	0.9939	28.4694
2 (+--)	0.2299	62.6694	0.9085	44.7666	0.9790	30.5704
3 (-+-)	0.3449	61.2433	0.9435	42.9619	0.9965	24.5502
4 (++-)	0.3495	59.9201	0.9056	46.1424	0.9989	13.8033
5 (--+)	-0.7096	68.4385	0.9836	33.8604	0.9991	16.1096
6 (+-+)	-0.2565	66.8536	0.9936	29.4927	0.9998	7.1331
7 (-++)	-0.1744	66.7055	0.9947	27.8423	0.9978	19.3439
8 (+++)	-0.2445	66.8372	0.9954	26.8377	0.9970	24.0923

Tabla 12. Parámetros del ajuste al modelo de Weibull en el DOE

Experimento Variables (t_m /Medio/vel)	α	β	T_d (min)
1 (---)	1.619	0.632	2.417
2 (+--)	1.637	0.599	2.273
3 (-+-)	2.305	0.626	3.790
4 (++-)	2.205	0.521	4.449
5 (--+)	0.598	0.309	0.232
6 (+-+)	0.821	0.450	0.649
7 (-++)	1.178	0.815	1.199
8 (+++)	0.903	0.683	0.843

7.2.1.2 Análisis del diseño experimental

Para poder comprobar las conjeturas anteriores fue necesario llevar a cabo un análisis estadístico de los datos; debido a que una de las variables fue el t_m , no se contó con un t_m control, es decir, no hubo un tiempo que en ambos niveles se repitiera, sin embargo, gracias al ajuste que tuvieron los datos a la ecuación de Weibull se pudo predecir la cantidad disuelta a un tiempo determinado, el cual fue de 10 min (*Tabla 13*), y así se pudo realizar el análisis de varianza (ANOVA, con un nivel de confianza del 95%), el cual mostró (*Tabla 14 y Figura 9*) que la velocidad ($P = 0.000$) fue la variable que más efecto tuvo sobre los perfiles de disolución, seguida del medio de disolución ($P = 0.069$) y finalmente como respuesta a la variación de estas dos variables simultáneamente, la interacción entre ambas (BC) resultó ser estadísticamente significativa ($P = 0.0007$), como se esperaba en la sección anterior el t_m no mostró tener efecto alguno en el DOE y tampoco la interacción entre las tres variables (ABC).

Tabla 13. %Disuelto de MEL predicho con la ecuación de Weibull a los 10 min

Experimento Variables (t_m /Medio/vel)	Vaso						DE
	%Disuelto predicho a los 10 min						
	1	2	3	4	5	6	
1 (---)	92.0	89.1	92.8	92.6	99.9	76.1	7.88
2 (+--)	87.1	96.6	95.1	83.4	97.7	79.0	7.78
3 (-+-)	76.2	81.2	87.6	90.3	85.0	84.9	4.96
4 (++-)	75.4	78.3	81.0	77.6	83.7	74.1	3.54
5 (--+)	98.1	98.6	97.7	96.2	95.5	92.5	2.27
6 (+-+)	101.7	97.5	95.7	103.0	103.0	98.0	3.14
7 (-++)	99.9	100.0	99.2	98.6	99.9	98.5	0.68
8 (+++)	96.3	99.8	99.6	99.9	99.9	99.5	1.41

Tabla 14. ANOVA del diseño de experimento 2³(alfa = 5%)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Valor P
A:tm	7.88941	1	7.88941	0.36	0.5539
B:Medio	179.568	1	179.568	8.11	0.0069
C:Velocidad	2025.4	1	2025.4	91.49	0.0000
AB	58.7419	1	58.7419	2.65	0.1112
AC	69.9384	1	69.9384	3.16	0.0831
BC	298.402	1	298.402	13.48	0.0007
ABC	2.38521	1	2.38521	0.11	0.7444
Total error	885.53	40	22.1382		
Total (corr.)	3527.86	47			

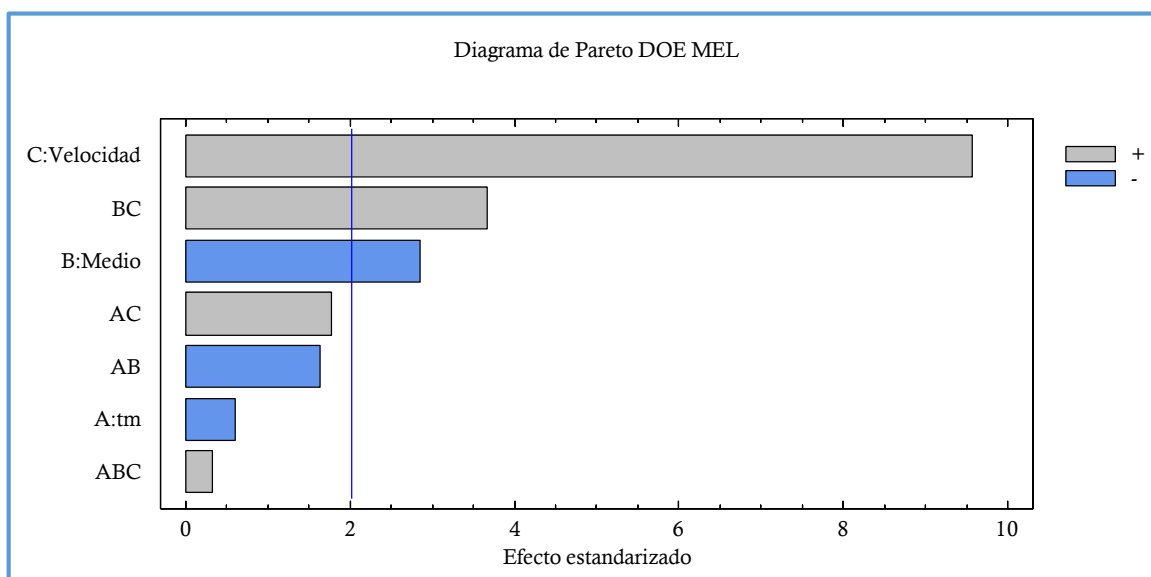


Figura 9. Diagrama de Pareto para el DOE de MEL

El haber ajustado los datos de disolución a un modelo, ayudó en gran parte a poder encontrar las mejores condiciones para evaluar el comportamiento de la disolución de productos sublinguales conteniendo melatonina. Debido a que el tm no mostró afectar el desempeño de los perfiles de disolución, se definieron nuevos tiempos de muestreo para tener una mejor caracterización de la curva ascendente de los perfiles de disolución al analizar los diferentes lotes de los medicamentos (Tabla 15).

Otro de los aspectos a resaltar es que gracias al DOE se eligió como medio de disolución al agua, tanto por los resultados que arrojó la optimización del experimento al hacer el análisis estadístico

en STATGRAPHICS, como por la comparación visual de los ocho perfiles de disolución de los experimentos realizados (Figura 10).

Al comparar los perfiles obtenidos con agua como medio de disolución (Figura 10), se puede observar que a cualquier velocidad (50 y 75 rpm) se logró una completa disolución del producto, sin embargo, a 50 rpm la caracterización de la curva ascendente y la fase de meseta fue mucho mejor, pues sus puntos se encuentran distribuidos entre dichas fases y la inflexión. Los perfiles resultantes al usar SAF como medio de disolución a una velocidad de 50 rpm del medicamento BEN DOE tuvieron una velocidad de disolución más lenta comparado con las demás condiciones sin importar el tm que se ocupara, el máximo porcentaje disuelto a los 20 min fue de 92.8% para tm1 y de 88.7% para tm2, al aumentar la velocidad a 75 rpm en el mismo medio, se observó que el medicamento logró una completa disolución aumentando a la vez la velocidad de su disolución, lo que dio lugar a que el perfil de disolución no contara con los puntos necesarios para una correcta caracterización de la curva ascendente, pues la mayoría de los puntos quedaban en la meseta; así la SAF a pH 6.8 se descartó como posible medio de disolución.

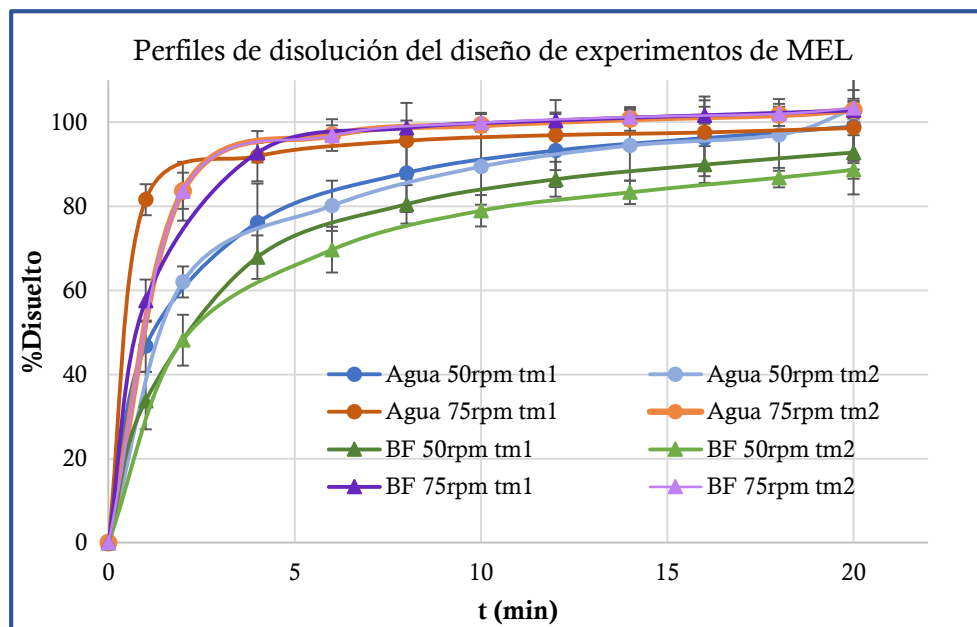


Figura 10. Perfiles de disolución del DOE de MEL

Con base en esta información se eligieron las condiciones óptimas para evaluar los perfiles de disolución de las tabletas sublinguales de los medicamentos bajo estudio conteniendo 5 mg de MEL, las cuales se resumen en la siguiente tabla (*Tabla 15*):

Tabla 15. Condiciones óptimas para la evaluación de los perfiles de disolución de productos conteniendo MEL

Variable	Condición
Aparato	II de la USP (Paletas)
Velocidad	50 rpm
Medio de disolución	Agua
Temperatura	37 ± 0.5 °C
Volumen del medio	500 mL
Alícuota de muestreo	5 mL sin reposición del medio
tm	2, 4, 6, 8, 12 y 20 min

7.2.2 Evaluación de perfiles de disolución de los productos bajo estudio

En la *Figura 11* se presentan los perfiles de disolución de los productos bajo estudio. En ella se pueden apreciar las diferencias en el comportamiento de disolución de los productos en relación a los lotes del innovador (BEN 1 y BEN 2). Ambos lotes del producto innovador mostraron un perfil característico, correspondiente a una completa disolución (*Tabla 16*) y a la más rápida velocidad; mientras que ninguno de los otros productos mostraron una completa disolución quedando por debajo del 100% de principio activo disuelto a los 20 min (*Tabla 17*), tanto el medicamento de prueba Melatonina como el innovador se disolvieron más del 85% a los 12 minutos, por lo que se clasificaron como de muy rápida disolución y no fue necesario aplicar la prueba de f_2 , esto era de esperarse pues ambos productos son elaborados por el mismo laboratorio, el hecho de que se disuelva más del 85% en menos de 15 min indica que para este producto el paso limitante es el vaciado gástrico. Por otro lado el producto de prueba Sub-Z[®] no logró la completa disolución en el medio, para los dos lotes de este producto (SUB 1 y SUB 2) se logró disolver un máximo de 85.9 ±2.35% y 88.6 ±5.47% , respectivamente, a los 20 min (*Tabla 17*), por lo que no pudo ser clasificado como producto de muy rápida disolución y se le aplicó la prueba de f_2 , para ambos lotes el valor de f_2 fue menor a 50 (*Tabla 18*) por lo tanto, *el producto SUB-Z[®] no es similar al producto innovador.*

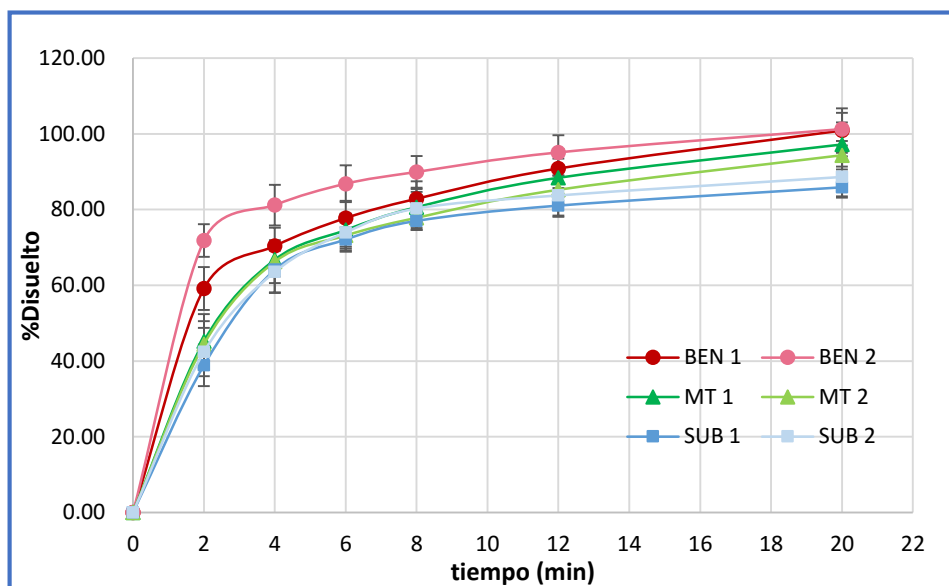


Figura 11. Perfiles de disolución de los productos bajo estudio

Tabla 16. %Disuelto del medicamento de referencia Benedorm®

tm (min)	Producto de Referencia			
	BEN 1		BEN 2	
	%Disuelto ± DE n = 12	CV%	%Disuelto ± DE n = 12	CV%
0	0.00	0.00	0.00	0.00
2	59.2 ± 5.6	9.5	71.8 ± 4.3	6.0
4	70.4 ± 4.9	6.9	81.2 ± 5.4	6.6
6	77.8 ± 4.6	5.88	86.8 ± 4.9	5.6
8	82.9 ± 4.6	5.60	90.0 ± 4.2	4.7
12	90.9 ± 5.2	5.71	95.1 ± 4.6	4.8
20	100.9 ± 5.9	5.83	101.3 ± 4.3	4.3

Tabla 17. %Disuelto de los medicamentos prueba Melatonina y Sub-Z®

tm (min)	Productos de prueba							
	MT 1		MT 2		SUB 1		SUB 2	
	%Disuelto ± DE n = 12	CV%	%Disuelto ± DE n = 12	CV%	%Disuelto ± DE n = 12	CV%	%Disuelto ± DE n = 12	CV%
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	45.2 ± 7.2	15.9	44.4 ± 6.1	13.7	38.9 ± 5.5	14.1	42.4 ± 6.4	15.1
4	66.8 ± 4.4	6.6	66.2 ± 5.7	8.6	64.1 ± 5.9	9.2	63.5 ± 5.6	8.8
6	74.6 ± 4.4	5.9	73.2 ± 3.5	4.7	72.1 ± 3.2	4.4	74.0 ± 4.8	6.5
8	80.6 ± 4.0	5.0	77.8 ± 3.2	4.2	77.0 ± 2.3	3.0	80.3 ± 5.1	6.4
12	88.4 ± 5.1	5.7	85.2 ± 3.7	4.3	81.1 ± 3.0	3.7	83.8 ± 5.3	6.4
20	97.2 ± 5.9	6.0	94.4 ± 3.7	4.0	85.9 ± 2.4	2.7	88.6 ± 5.5	6.2

Tabla 18. Comparación de perfiles de disolución por f_2 (Sub-Z® vs referencia)

Comparación de perfiles de disolución			
Producto de prueba	%Disuelto a los 20 min \pm DE (n = 12)	f_2	Similitud Ref vs Pba
SUB 1	85.9 \pm 2.4	40.7	RECHAZADO
SUB 2	88.6 \pm 5.5	44.1	RECHAZADO

Una posible razón por la cual los perfiles de disolución del producto Sub-Z ® no presenten similitud con los del producto innovador (Benedorm ®) puede ser la cantidad y composición de los excipientes al momento de formular cada uno de los productos antes mencionados o el origen de la materia prima, ya que al momento de hacer la prueba de valoración y triturar las tabletas de los medicamentos se presentó mayor dificultad al triturar el producto de referencia que el Sub-Z ® y la apariencia del polvo de éste último era más fino y color amarillo claro, a diferencia del polvo de las tabletas del medicamento Benedorm ® que era blanco completamente.

Otro aspecto a resaltar que concuerda con la diferencia en la composición de excipientes entre los productos fue al momento de filtrar las alícuotas del muestreo así como de la prueba de validación, pues los filtros de teflón quedaban muy saturados con pocos mililitros filtrados del producto Benedorm® y había que cambiarlos varias veces en una misma alícuota, contrario a lo anterior, con el producto de prueba Sub-Z® un filtro bastaba para filtrar una sola alícuota y quedaba sin saturarse, haciendo más fácil dicha tarea.

7.2.3 Modelado matemático de datos

Al ajustar los datos a los diferentes modelos de disolución con ayuda de la macro de Excel DDSOLVER (*Tabla 18*), se encontró que los estimados de coeficiente de determinación, así como los valores de Akaike fueron mejores (r^2 mayor y más cercana a 1 y AIC con menor valor) al utilizar el modelo de Weibull.

Tabla 19. Ajuste al mejor modelo cinético de disolución de los medicamentos bajo estudio

Producto	Modelos					
	Orden cero		Primer orden		Weibull	
	r^2	AIC	r^2	AIC	r^2	AIC
BEN 1	-0.1198	64.35	0.9421	42.98	0.9910	29.20
BEN 2	-0.5233	67.04	0.9568	40.60	0.9959	25.87
MT 1	0.0782	62.85	0.9613	37.78	0.9942	26.93
MT 2	0.0503	62.60	0.9540	39.48	0.9941	27.14
SUB 1	-0.0212	62.55	0.9274	43.33	0.9776	36.08
SUB 2	-0.0291	62.91	0.9438	39.97	0.9887	31.48

La *Tabla 19* muestra los resultados del ajuste de los datos de disolución a la función de Weibull de los productos bajo estudio, se observó que para todos los productos β fue menor a 1, lo que significa que la curva tiene una forma parabólica con una pendiente inicial pronunciada y después sigue un comportamiento consistente con una exponencial⁽⁷⁾, los valores del intervalo de tiempo en el que el 62.3% de las moléculas se encuentran en solución (T_d) son consistentes con la gráfica y datos obtenidos en los perfiles de disolución, pues para el producto de referencia (BEN 1 y BEN 2) es mucho menor comparado con los otros productos, indicando que la velocidad de disolución de este producto es mayor. Para el producto de prueba Sub-Z® el T_d resultó ser el más extenso en comparación con los otros productos, lo cual no es extraño pues no llegó a la completa disolución en la prueba de perfiles de disolución tardando más de 15 min en disolverse el 85%, por lo que no se consideró como un producto de muy rápida disolución.

Tabla 20. Parámetros del ajuste al modelo cinético de Weibull de los productos estudiados

Producto	α	β	r^2	Td (min)
BEN 1	1.788	0.580	0.9910	2.76
BEN 2	1.161	0.503	0.9959	1.38
MT 1	2.773	0.733	0.9942	3.84
MT 2	2.601	0.663	0.9941	4.07
SUB 1	2.634	0.613	0.9776	4.70
SUB 2	2.637	0.655	0.9887	4.36

En la *Figura 12* se muestran los perfiles de disolución de cada par de lotes por cada producto, la mayoría casi empalmados con la línea del ajuste al modelo de Weibull, mostrando así que el modelo elegido describe el proceso de disolución, por último, se aprecia cómo la forma de la recta coincide con los valores de β reportados en la tabla anterior y la descripción reportada en la literatura ($\beta < 1$).⁽¹¹⁾

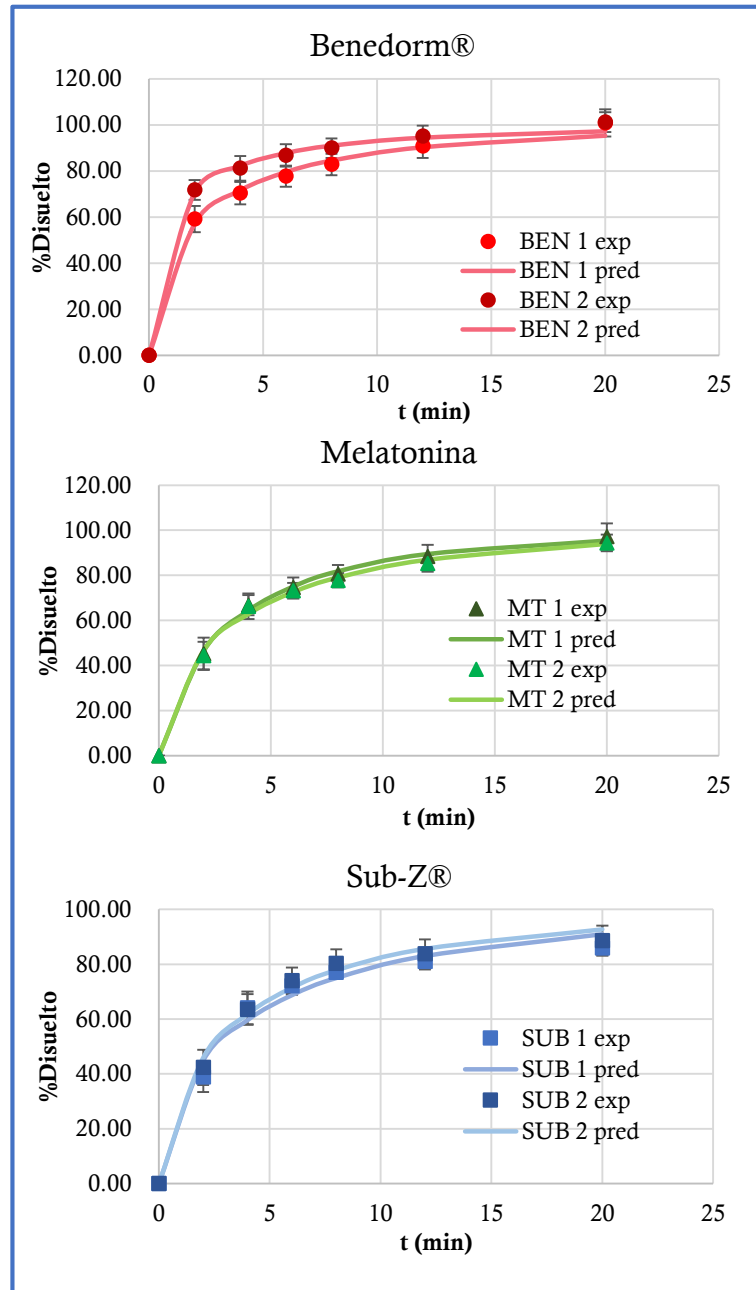


Figura 12. Ajuste de los datos de disolución de los productos evaluados al modelo cinético de Weibull

8. CONCLUSIONES

- Se evaluaron dos lotes de cada uno de los tres diferentes productos que están a la venta en México de tabletas sublinguales conteniendo 5 mg de MEL, realizando la prueba de intercambiabilidad que pide la COFEPRIS para este fármaco (Prueba B), aún con la falta de monografía en la FEUM.
- Se desarrolló y validó un método analítico espectrofotométrico para cuantificar MEL en agua, el cual fue lineal, preciso y exacto; por lo que puede ser utilizado para la cuantificación de MEL en tabletas sublinguales de 5 mg, por lo que se podría considerar como una propuesta ante la FEUM para incluirla en una futura monografía del fármaco.
- Los factores que resultaron estadísticamente significativos al momento de analizar el DOE fueron la velocidad de agitación y el medio de disolución, junto con una interacción binaria entre ellas, conocerlos ayudó a la optimización del experimento y al final seleccionar las mejores condiciones para el análisis de los perfiles de disolución.
- Todos los resultados obtenidos de los perfiles de disolución tuvieron un mejor ajuste al modelo cinético de Weibull.

9. PERSPECTIVAS

- Proponer las condiciones obtenidas ante la FEUM como prueba de perfil de disolución en tabletas sublinguales conteniendo melatonina.
- Realizar las pruebas faltantes para lograr completar la monografía de melatonina, no sólo de las tabletas sublinguales, sino para las tres formas farmacéuticas que se venden en México.
- Llevar a cabo un estudio *in vivo* para establecer si las diferencias obtenidas *in vitro* tienen un impacto en la biodisponibilidad del producto.

10. BIBLIOGRAFÍA

- 1. COFEPRIS.** ACUERDO que determina el tipo de prueba para demostrar intercambiabilidad de medicamentos genéricos y se definen los criterios que deberán aplicárseles. [En línea] 2017. [Citado el: 15 de Marzo de 2018.] http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5497684&fecha=19/09/2017.
- 2. Salud, Secretaria de.** *Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable.* Estados Unidos Mexicanos : s.n., 2013.
- 3. Shargel, L., Yu, Andrew B. C.** *Applied Biopharmaceuticals and Pharmacokinetics.* 7th. Unites States of America : M. G. H. Education, 2016.
- 4. EMA, European Medicines Agency.** Guideline of the Investigation of Bioequivalence. London : s.n., 2010.
- 5. Patrick Sinko J., Singh Yashveer.** *Martin's Physical • SinkoMartin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences: Physical Chemical and Biopharmaceutical Principles in the Pharmaceutical Sciences.* 6th. USA : Lippincott Williams & Wilkins., 2011.
- 6. IUPAC.** *Orange Book: IUPAC Compendium of Chemical Terminology.* 2nd. Oxford : Blackwell Scientific Publications, 1997. pág. 83. ISBN 0-9678550-9-8.
- 7. Mathematical modeling of drug dissolution. J. Siepmann, F. Siepmann.** Lille, France : Elsevier, 2013, International Journal of Pharmaceutics, Vol. 453, págs. 12-24.
- 8. Factors Influencing the dissolution testing of drugs. Ghayas, Sana, Sheraz, Muhammad Ali y Anjum, Fakhshheena.** Pakistan : Journal Health Research, 2013, Vol. 1, págs. 1-11.
- 9. A Mechanistic Approach to Understanding the Factors Affecting Drug Absorption: A Review of Fundamentals. Martinez, Marilyn N. y Amidon, Gordon L.** s.l. : Journal of Clinical Pharmacology, 2002, Vol. 42, págs. 620-643.
- 10. Leon Shargel, Susana Wu-Pong, B.C. Yu Andrew.** *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics.* 5th. USA : McGraw Hill Medical Publishing Division, 2005.
- 11. Modeling and comparison of dissolution profiles. P. Costa, L. J. M. Sousa.** s.l. : European Journal Pharmaceutical Sciences, 2001, Vol. 13, págs. 123-133.
- 12. Sublingual Tablets and the Benefits of the Sublingual Route of Administration. Arshad Bashir Khan, Tarun Kingsley, Preeta Caroline.** 3, India : Journal of Pharmaceutical Research, 2017, Vol. 16, págs. 257-267.
- 13. Dissolution Testing of Sublingual Tablets: A Novel In Vitro Method. Ousama Rachid, Mutasem Rawas-Qalaji, F. Estelle R. Simons, Keith J. Simons.** 2, s.l. : American Association of Pharmaceutical Scientists, June de 2011, Vol. 12, págs. 544-552.

14. **Grey, Vivian.** American Pharmaceutical Review. *Hot Topics in Dissolution Testing*. [En línea] 3 de Mayo de 2012. [Citado el: 14 de Junio de 2018.]
<https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/111762-Hot-Topics-in-Dissolution-Testing/>.
15. **G. E. P. Box, W. G. Hunter, and J. S. Hunter.** *Statistics for Experimenters*. . New York : John Wiley & Sons, Inc., 1978.
16. *The melatonin hypothesis- a survey. News letter.* **Lerchi, Alexander.** 2002, Vol. 10, págs. 1-7.
17. **Asociación Psiquiátrica Mexicana, A.C. (APM).** *Consenso y Guía de práctica clínica de la asociación psiquiátrica mexicana para el tratamiento del insomnio*. 2010. pág. 12. Vol. 128.
18. *Drugbank en línea* . [En línea] [Citado el: 25 de Enero de 2018.]
<https://www.drugbank.ca/drugs/DB01065>.
19. *Pubchem*. [En línea] [Citado el: 25 de Enero de 2018.]
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/896#section=Top>.
20. *Dissolution of Intact, Divided and Crushed Circadin Tablets: Prolonged vs. Immediate Release of Melatonin.* **Hui Ming Chua, Nathalie Havet Richer, Magda Swedrowska, Stephen Ingham, Stephen Tomlin, Ben Forbes.** 2, London UK : MDPI Pharmaceutics, January de 2016, Vol. 8, pág. 11.
21. **EMA. Anexo I.** Ficha técnica o resumen de las características del producto (Cicardin) . [En línea] [Citado el: 17 de November de 2017.]
http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/Referrals_document/flolan_30/WC500129816.pdf.
22. **Drost, Gregorio Tskow.** *Perspectivas clínicas y experimentales en el uso de la hormona melatonina como antioxidante celular*. Barquisimeto : s.n., 2005.
23. *Melatonin for the prevention and treatment of jet lag.* **Andrew Herxheimer, Keith J. Petrie.** [ed.] Cochrane Database of Systematic Reviews. 3, s.l. : John Wiley & Sons. Ltd., 2009, pág. 20.
24. **Listado actualizado de Medicamentos de COFEPRIS.** [En línea] [Citado el: 12 de Diciembre de 2017.]
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/239164/LMR_2017-10_V004.pdf.
25. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.* Undécima. México : Secretaria de Salud, 2014. Vol. I y II.
26. **Comisión de Evaluación de Medicamentos.** *Modelo de informe de evaluación. Melatonina (insomnio primario en mayores de 55 años)*. Servei de Salut Govern de les illes Balears : GÈNESIS-SEFH., 2008. págs. 1-14.
27. **Parra, Javier Garjón.** Meltonina para los transtornos del sueño. *Boletín de Información Farmacoterapéutica de Navarra*. Enero-Marzo de 2014, Vol. 22, 1, pág. 12.