



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR PIOGLITAZONA EN
ESTUDIOS DE DISOLUCIÓN EN MEDIO
BIORRELEVANTE.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

CHRISTOPHER ALFREDO BARRERA OCHOA

ASESOR

M. en C. JUAN MANUEL RODRÍGUEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Alfredo Rafael Garzón Serra**
VOCAL: **Profesor: Ricardo Rodríguez Sáenz**
SECRETARIO: **Profesor: Juan Manuel Rodríguez**
1er. SUPLENTE: **Profesor: Alejandro Martínez González**
2° SUPLENTE: **Profesor: Juan Luis Gutiérrez Velázquez**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, FACULTAD DE QUÍMICA.
CONJUNTO E, EDIFICIO DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE BIOFARMACIA (L-112).**

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Juan Manuel Rodríguez

SUSTENTANTE:

Christopher Alfredo Barrera Ochoa

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO POR LA GRANDEZA DE SU HISTORIA, SU LEGADO Y LA GENEROSIDAD CON LA QUE ME HA PERMITIDO CRECER DESDE MI INGRESO HASTA EL INSTANTE EN EL QUE ESCRIBO ESTAS LÍNEAS.

A LA FACULTAD DE QUÍMICA POR SER NO SÓLO PROVEEDORA DE CONOCIMIENTO, EN QUÍMICA Y EN LA VIDA, SINO POR SER UN SEGUNDO HOGAR QUE TENDRÉ SIEMPRE PRESENTE.

AL M. EN C. JUAN MANUEL RODRÍGUEZ POR INCLUIRME DENTRO DE SU EQUIPO DE TRABAJO Y GUIARME DURANTE EL DESARROLLO DEL PRESENTE PROYECTO.

AL EQUIPO DEL LABORATORIO 112 DE BIOFARMACIA; ESPECIALMENTE A CAROLINA RODRÍGUEZ Y RICARDO ARANA POR LAS INCONTABLES HORAS DE APOYO COLECTIVO, LAS DESGRACIAS COMPARTIDAS, LA COMPLICIDAD Y POR HACER SIEMPRE DE LA ACTIVIDAD MÁS DEMANDANTE UN ESPACIO DE SONRISAS.

DEDICATORIA

A la vida por el impulso de desordenar calendarios dejando claro que la única certeza está en el cambio; las variables se han combinado de forma particular y gracias a ello este documento existe.

A mis padres: Alfredo Barrera por heredarme la tenacidad, la fuerza y las ganas de no conformarme; y Jeannett Ochoa por ser el pilar que me soporta, se enorgullece aunque me haya equivocado y que contagia el deseo de soñar (que el tuyo no lo frene nadie). A ambos por que les debo todo, tal cual.

A mi familia y a mi familia extendida (mis amigos) quienes en diferentes tiempos pero siempre en pie de guerra me demuestran que el cariño desinteresado existe. Saben quienes son, saben que los amo y que son esa fuerza que me empuja cuando me asalta la inercia.

A los que sólo estaban unidos a mi camino por una costura temporal pero de quienes he aprendido lecciones invaluable de la vida, del amor (al mundo, a la profesión, a mi mismo) y de siempre decidir la felicidad ante todo.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Objetivo principal	2
1.2. Objetivos secundarios	2
2. Marco teórico	3
2.1 Disolución	3
2.1.1. Disolución del principio activo	3
2.1.2. Metodologías de disolución	4
2.1.2.1. Aparato USP 1	6
2.1.2.2. Aparato USP 2	7
2.1.2.3. Aparato USP 3	7
2.1.2.4. Aparato USP 4	9
2.1.3. Modelos matemáticos y teoría de disolución	10
2.2. Perfiles de disolución	15
2.2.1. BCS	16
2.2.2. Comparación de perfiles de disolución	17
2.3. Bioexención	19
2.4. Medios de disolución biorrelevantes	19
2.4.1. Tipos de BRM	21
2.4. IVIVC	24
2.5.1. Deconvolución numérica: método de Nelson-Wagner	26

2.6. Pioglitazona	27
2.6.1. La Diabetes Mellitus en México	27
2.6.2. Pioglitazona: Identificación y propiedades fisicoquímicas	28
2.6.2.1. Influencia del pH en la solubilidad de PIO	29
2.6.3. Farmacodinamia	30
2.6.4. Farmacocinética	30
2.6.5. Métodos analíticos	32
2.6.5.1. Disolución compendial por espectrofotometría UV	32
2.6.5.2. Valoración compendial por HPLC-UV	32
2.6.5.3. Métodos analíticos no compendiales	33
2.7. Validación de un método analítico para estudios de disolución	35
3. Materiales, insumos e instrumentos	37
3.1. Reactivos y disolventes	37
3.2. Consumibles	37
3.3. Insumos cromatográficos	37
3.4. Equipos e instrumentos	37
3.5. Productos farmacéuticos analizados	38
4. Metodología	38
4.1. Desarrollo de la cuantificación	39
4.1.1. Primer acercamiento: condiciones compendiales	39
4.1.2. Segundo acercamiento: diseño de experimentos	40
4.2. Desarrollo del método de disolución	42

4.2.1. Estudios preliminares: Aparato USP 2	42
4.2.2. Estudios preliminares: Aparato USP 3	43
4.2.3. Estudio de pérdida y remanente	45
4.3. Validación del método analítico	46
4.3.1. Validación con el fármaco	46
4.3.2. Validación con el medicamento	48
4.4. Tratamiento de datos	49
4.4.1. Desarrollo de la cuantificación	49
4.4.2. Desarrollo del método de disolución	50
4.4.3. Validación del método analítico	51
4.4.4. Estudios de disolución	52
4.4.5. IVIVC	52
5. Resultados y discusión	54
5.1. Desarrollo de la cuantificación	54
5.1.1. Diseño de experimentos	54
5.1.2. Cuantificación compendial	60
5.2. Desarrollo del método de disolución	63
5.2.1. Primer acercamiento: Aparato USP 2	63
5.2.2. Segundo acercamiento: Aparato USP 3	65
5.2.3. Estudio de pérdida y remanente	70
5.3. Validación del método analítico	71
5.3.1. Validación con el fármaco	71

5.3.1.1. Linealidad, exactitud y precisión	71
5.3.1.2. Establecimiento de LOQ y LOQ _p	74
5.3.1.3. Estabilidad analítica	74
5.3.1.4. Influencia del filtro	75
5.3.2. Validación con el medicamento	76
5.3.2.1. Linealidad, exactitud y precisión	76
5.3.2.2. Selectividad	78
5.4. Estudios de disolución	80
5.4.1. Perfiles de disolución	80
5.4.2. Modelaje matemático de la cinética de disolución	80
5.4.3. Comparación de perfiles de disolución	82
5.5. IVIVC	83
6. Conclusiones	85
7. Referencias	89
Anexo A: Comatogramas típicos: Validación con el fármaco	93
Anexo B: Cromatogramas típicos: Validación con el medicamento	97
Anexo C: Cromatogramas típicos: Perfiles de disolución	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Disolución del principio activo	3
Figura 2. Aparato USP 1	6
Figura 3. Aparato USP 2	7
Figura 4. Aparato USP 3	8
Figura 5. Aparato USP 4	9
Figura 6. Modelo de la capa de difusión	11
Figura 7. Pioglitazona	29
Figura 8. S(pH) para PIO	29
Figura 9. Estrategia de trabajo	38
Figura 10. Diagrama de Pareto para Tr	55
Figura 11. Diagrama de Pareto para Área	55
Figura 12. Diagrama de Pareto para Altura	56
Figura 13. Diagrama de Pareto para Factor de Simetría (Sym)	56
Figura 14. Cromatogramas típicos pH 2.0	57
Figura 15. Cromatogramas típicos pH 6.0	57
Figura 16. Pureza del pico PIO2	58
Figura 17. Pureza del pico PIO20	59
Figura 18. Pureza del pico PIO200	59
Figura 19. Espectro UV: Pioglitazona	61
Figura 20. Cromatograma típico: condiciones finales	62
Figura 21. Pureza del pico PIO200. Condiciones finales	62
Figura 22. Perfiles de disolución en Aparato USP 2	63

Figura 23. Pruebas en Aparato USP 3	67
Figura 24. Perfil de disolución para EXP04	68
Figura 25. Perfiles de disolución para EXP05, EXP06 Y EXP07	69
Figura 26. Curva de calibración con el fármaco	73
Figura 27. Curva de calibración con el medicamento	77
Figura 28. Espectro 3D para Pioglitazona en FaSSIF-V2	78
Figura 29. Análisis de pureza del pico para PIO en FaSSIF-V2	78
Figura 30. Perfiles de disolución medios	80
Figura 31. Modelo matemático de IVIVC no lineal	85

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Modelos matemáticos de la cinética de liberación	12
Tabla 2. Interpretación del valor "n" de Korsmeyer-Peppas	14
Tabla 3. BCS	16
Tabla 4. Comparación entre medios biorrelevantes y medios compendiales	20
Tabla 5. Composición de FaSSGF	21
Tabla 6. Propiedades de FaSSGF	21
Tabla 7. Composición de FaSSIF	22
Tabla 8. Propiedades de FaSSIF	22
Tabla 9. Composición de FeSSIF	24
Tabla 10. Propiedades de FeSSIF	24
Tabla 11. Niveles de IVIVC	25
Tabla 12. Parámetros farmacocinéticos reportados para PIO	31
Tabla 13. Métodos analíticos por HPLC-UV para cuantificar PIO	34
Tabla 14. Factores y niveles: DA cuantificación	40
Tabla 15. Diseño de experimentos (cuantificación)	41
Tabla 16. Desarrollo del método de disolución	44
Tabla 17. Curva de calibración con el fármaco	46
Tabla 18. Curva de calibración con el medicamento	48
Tabla 19. Respuestas medias para cada condición experimental	54
Tabla 20. Estudio de pérdida y remanente de PIO	71
Tabla 21. Linealidad y precisión con el fármaco	71

Tabla 22. Coeficientes para la calibración con el fármaco	73
Tabla 23. Estabilidad analítica a 4°C	74
Tabla 24. Influencia del filtro	75
Tabla 25. Coeficientes de calibración con el medicamento	76
Tabla 26. Resumen de validación	77
Tabla 27. Parámetros comparativos: selección del modelo	79
Tabla 28. Modelo matemático y parámetros correspondientes	81
Tabla 29. Comparación de perfiles de disolución	81
Tabla 30. Valores observados para el medicamento de referencia	82
Tabla 31. Valores predichos para el medicamento de referencia	83
Tabla 32. Error de la predicción (medicamento de referencia)	84
Tabla 33. Predicción del desempeño: medicamento de prueba	84

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Noyes-Whitney	10
Ecuación 2. Modelo bajo condiciones sink	11
Ecuación 3. Factor de diferencia (f_1)	17
Ecuación 4. Factor de similitud (f_2)	18
Ecuación 5. Modelo de Nelson-Wagner	26
Ecuación 6. Cálculo del porcentaje disuelto	50
Ecuación 7. Cálculo de la diferencia absoluta	51
Ecuación 8. Cálculo del AUC_{0-t}	52
Ecuación 9. Cálculo del $AUC_{t-\infty}$	52
Ecuación 10. Cálculo del $AUC_{0-\infty}$	52
Ecuación 11. Cálculo de FA	54

ABREVIATURAS

AUC _{0-t}	Área bajo la curva de tiempo 0 a tiempo=t
AUC _{0-∞}	Área bajo la curva de tiempo cero a infinito
ACN	Acetonitrilo
AcOH	Ácido acético glacial
AcONH ₄	Acetato de amonio
AIC	Criterio de Información de Akaike
API	Ingrediente Activo Farmacéutico (<i>Active Pharmaceutical Ingredient</i>). Fármaco.
b	Intercepto de la recta
BA	Biodisponibilidad (<i>Bioavailability</i>)
BCS	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica
BE	Bioequivalencia
BRM	Medio Biorrelevante (<i>Biorelevant Media</i>)
°C	Grados Celsius
C18	Octadecilsilano
CAS	Chemical Abstract Service
C _{max}	Concentración plasmática máxima
C _p	Concentración plasmática
C _s	Concentración de saturación
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
CV%	Coefficiente de Variación Porcentual
D	Dosis
DA	Desarrollo Analítico
DAD	Detector de Arreglo de Diodos (<i>Diode Array Detector</i>)
DE	Desviación Estándar
dpm	Inmersiones Por Minuto (<i>Dip Per Minute</i>)
ERR	Error Relativo debido a la Regresión
FA	Fracción de fármaco absorbida

FDA	Administración de Alimentos y Fármacos (<i>Food and Drug Administration</i>)
FE	Fase Estacionaria
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FM	Fase Móvil
Fr	Factor de Respuesta
FaSSGF	Fluido Gástrico Simulado en Estado de Ayuno (<i>Fasted State Simulated Gastric Fluid</i>)
FaSSIF	Fluido Intestinal Simulado en Estado de Ayuno (<i>Fasted State Simulated Intestinal Fluid</i>). Versión original.
FaSSIF-V2	Fluido Intestinal Simulado en Estado de Ayuno (<i>Fasted State Simulated Intestinal Fluid</i>). Versión 2.
FeSSIF	Fluido Intestinal Simulado en Estado Postprandial (<i>Fed State Simulated Intestinal Fluid</i>). Versión original.
FeSSIF-V2	FeSSIF Versión 2, composición actualizada.
FeSSIF2X	FeSSIF Preparado al doble de concentración
g	Gramos
h	Horas
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IC ₉₀	Intervalo de confianza al 90%
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
IVIVC	Correlación <i>in vitro in vivo</i>
k _e	Constante de eliminación
LOD	Límite de Detección
LOQ	Límite de Cuantificación
LOQ _p	Límite de Cuantificación Práctico
λ	Longitud de Onda
m	Pendiente de la recta

mAU	Miliunidades de Absorbancia
mAUs	Miliunidades de Absorbancia por segundo
MDT	Tiempo Medio de Disolución
MeOH	Metanol
min	Minutos
mL	Mililitros
μ L	Microlitro
μ m	Micrómetros, micras
MDT	Tiempo Medio de Disolución
MRT	Tiempo Medio de Residencia
MSD	Distancia Estadística Multivariada
MSE	Error del Cuadrado Medio
nm	Nanómetros
PIO	Pioglitazona
PIO.HCl	Pioglitazona, clorhidrato
R	Coefficiente de correlación
R ²	Coefficiente de determinación
rpm	Revoluciones por minuto
SA	Solución reguladora de pH
SGF	Fluido Gástrico Simulado (<i>Simulated Gastric Fluid</i>)
SIF	Fluido Intestinal Simulado (<i>Simulated Intestinal Fluid</i>)
SRef	Sustancia de referencia
SSE	Suma de Cuadrados del Error/de los Residuos
S _{y/x}	Error Estándar del Estimado
S _{b0}	Error Estándar de la Ordenada al Origen
t _{1/2}	Tiempo de vida media
TGI	Tracto gastrointestinal
t _{max}	Tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima.

Tr	Tiempo de retención
USP	Farmacopea de los Estados Unidos (<i>U.S. Pharmacopeia</i>)
UV	Ultravioleta
V _D	Volumen de Distribución

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuevas formulaciones se rige por la búsqueda de tres parámetros esenciales: seguridad, eficacia y calidad. Para que un medicamento de administración oral sea efectivo de manera sistémica, es clave que su biodisponibilidad sea adecuada (1).

El requerimiento de estudios *in vivo* que permitan ya sea establecer la biodisponibilidad absoluta o la biodisponibilidad relativa de una formulación representan un impacto fuerte tanto en costo, tiempo y capital humano, por lo que estudios *in vitro* con carácter predictivo del desempeño *in vivo* de la forma farmacéutica son una herramienta con gran valor.

Los estudios de disolución aparente permiten medir la fracción del API que se disuelve desde la forma de dosificación, en un intervalo o un punto de tiempo establecido y bajo condiciones fijas. Este tipo de estudios tienen diferentes alcances dentro de la industria farmacéutica: permiten evaluar si se mantiene la calidad de un producto cuando se han realizado modificaciones en la fórmula, proceso de fabricación, sitio de fabricación o cuando se han escalado procesos; guían el desarrollo de nuevas formulaciones, son un parámetro de calidad dentro de control farmacéutico y, en algunos casos, son predictores de la biodisponibilidad *in vivo* (1)

Los medios de disolución incorporados en los diferentes compendios farmacéuticos suelen ser soluciones reguladoras de pH que representan vagamente las condiciones fisiológicas en el estómago e intestino humanos a pesar de la ocasional inclusión de enzimas o tensoactivos en los mismos, por lo que se han desarrollado medios de disolución que potencialmente pueden ofrecer resultados con relevancia biológica: los medios biorrelevantes (2).

Para APIs de BCS II, como es la pioglitazona, la disolución en el fluido intestinal (a cuyo pH es escasamente soluble) es el paso que limita la absorción y por tanto, el efecto terapéutico. El estudio de la disolución de medicamentos que contienen pioglitazona en BRM puede revelar si su comportamiento *in vitro* es capaz de correlacionarse con el desempeño *in vivo*, poder predictivo que no tiene el medio de disolución farmacopeico (3,4)

1.1. Objetivo principal

Desarrollar y validar un método analítico por HPLC-UV para cuantificar pioglitazona en muestras provenientes de estudios de disolución en medios biorrelevantes empleando Aparato USP 3.

1.2. Objetivos secundarios.

- Desarrollo del método de cuantificación: se determinarán las condiciones cromatográficas óptimas para cuantificar el API en las muestras provenientes del estudio de disolución.
- Desarrollo del método de disolución: se determinarán las condiciones bajo las cuales se realizará el estudio de disolución en BRM utilizando Aparato USP 3.
- Validación del método analítico: se validará el método con el fármaco y con el medicamento siguiendo los lineamientos normativos establecidos en la NOM-177-SSA1-2013 para garantizar con evidencia documental que el método desarrollado es consistente para el fin para el cual fue propuesto.
- Aplicación/Estudio de disolución: se construirá el perfil de disolución bajo las condiciones propuestas para el medicamento de referencia y un producto de prueba (genérico), se determinará el alcance adecuado para realizar la comparación de los mismos y, a su vez, se evaluará la factibilidad de establecer una IVIVC.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Disolución

2.1.1. Disolución del principio activo.

La IUPAC define la disolución como el proceso que implica la mezcla de dos fases para dar lugar a una nueva fase homogénea (5). Desde el punto de vista farmacéutico, la disolución del API es un proceso importante para formas farmacéuticas de liberación inmediata y para sistemas de liberación modificada, ya que limita la presentación del fármaco a la membrana de absorción y puede representar el paso limitante para la obtención del efecto terapéutico (1).

Ya sea *in vitro* o *in vivo*, para lograr tener al fármaco disuelto, la forma farmacéutica sufre procesos simultáneos que median la liberación (*Figura 1*): a) disolución del API desde la forma farmacéutica, b) desintegración de la forma farmacéutica en gránulos o agregados gruesos, c) disolución del API desde los gránulos y agregados, d) la disgregación de los gránulos o agregados en partículas finas y e) la disolución del API desde las partículas sólidas finas (6)

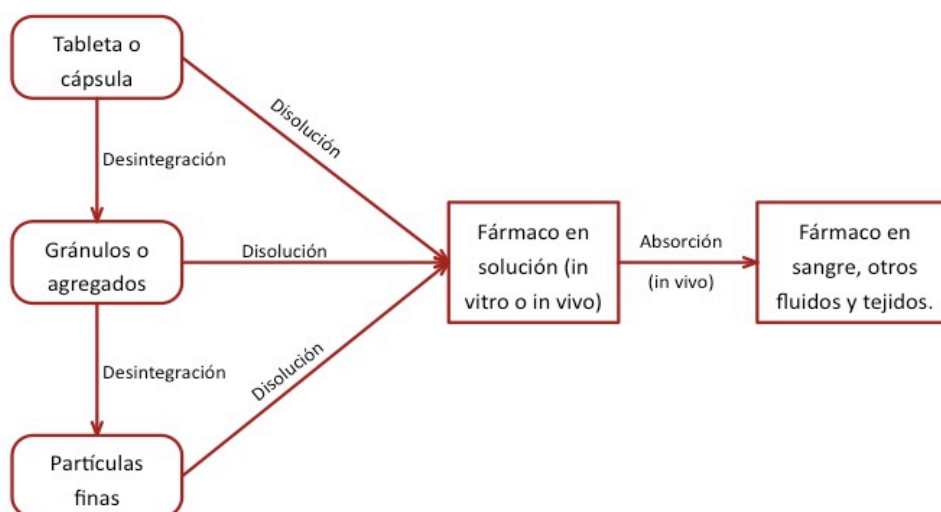


Figura 1. Disolución del principio activo (Wagner, 1971)⁶

La disolución del API es un proceso con múltiples sub-procesos que involucran interacciones heterogéneas entre las fases soluto-soluto, disolvente-disolvente y la interfaz soluto-disolvente. Los equilibrios heterogéneos que constituyen la transferencia de masa total desde la matriz hacia el medio de disolución pueden categorizarse como (1):

- i. Remoción del soluto desde la fase sólida
- ii. Solvatación del soluto en la fase líquida
- iii. Transporte difusivo o convectivo del soluto desde la interfaz sólido-líquido hacia el medio de disolución

La *prueba de disolución* determina la cantidad disuelta del API en un punto determinado y un *perfil de disolución*, caracteriza la liberación cuantificando la cantidad o fracción disuelta del API en un intervalo de tiempo establecido.

2.1.2. Metodologías de disolución.

Desde 1950 hasta 1968, la prueba de desintegración fue en la USP la principal prueba de desempeño de las formas farmacéuticas sólidas a pesar de que la desintegración sólo está relacionada indirectamente con la biodisponibilidad. A partir de la década de 1960, comenzó a identificarse que la desintegración no necesariamente podía ser indicativa de la disolución del API *in vivo*, y para 1962 comenzó a sugerirse que para productos que contenían APIs de solubilidad acuosa menor a 1% era necesario establecer una especificación de disolución. Para 1968, la USP/NF recomendó la adopción de un sistema de agitador con canastillas (Aparato USP 1) para evaluar la disolución *in vitro*.

Con la introducción de la USP19/NF14 en 1975 se sugirió que no era necesaria la introducción de un estándar de BA en el compendio probando que una IVIVC podía establecerse. En 1978 se adoptó al compendio un aparato compuesto de un agitador con forma de paleta (Aparato USP 2) que probó ser especialmente eficaz para desintegrar las formas de dosificación (7).

La clara ventaja de evaluar la disolución *in vitro* aunada al mejor entendimiento de los aspectos teóricos que explican el proceso llevó al desarrollo de diversos aparatos y métodos. La necesidad de estandarización fue evidente al detectar la alta capacidad de los aparatos a detectar cambios pequeños tanto dentro de la fórmula como en el diseño, instalación y operación de los equipos. Tal sensibilidad logró romper la brecha entre el uso de los estudios de disolución con interés en establecer IVIVC y su uso como herramienta en el control de calidad. La USP/NF reconoce un conjunto de aparatos cuyas especificaciones están claramente establecidas así como las modificaciones que son permitidas. El tipo de aparato a usar debe definirse durante el desarrollo del método en función de la forma farmacéutica, el fármaco y el medio de disolución ya que la elección puede afectar el resultado y el tiempo de análisis.

Los aparatos reconocidos por la USP incluyen (8):

- Aparato 1 (canastilla)
- Aparato 2 (paletas)
- Aparato 3 (cilindro reciprocante)
- Aparato 4 (celda de flujo)
- Aparato 5 (paleta sobre disco)
- Aparato 6 (cilindro)
- Aparato 7 ("holder" reciprocante)

Dentro de la gama de aparatos disponibles, los aparatos USP 1 y USP 2 son los de más frecuente uso ya que son sencillos, robustos y los diseños se han estandarizado adecuadamente además de estar soportados por una mayor cantidad de evidencia experimental.

2.1.2.1. Aparato USP 1

El aparato consiste de: un vaso cilíndrico de fondo semiesférico, con o sin tapa, de vidrio u otro material inerte y transparente; un motor, un eje propulsor metálico y una canastilla cilíndrica. El vaso está parcialmente sumergido en un baño de agua adecuado o recibe calor de un dispositivo conveniente. Durante el transcurso del estudio, la temperatura interior del baño permanece a 37 ± 0.5 °C y la canastilla se encuentra a 25 ± 2 mm de distancia del fondo del vaso (9).

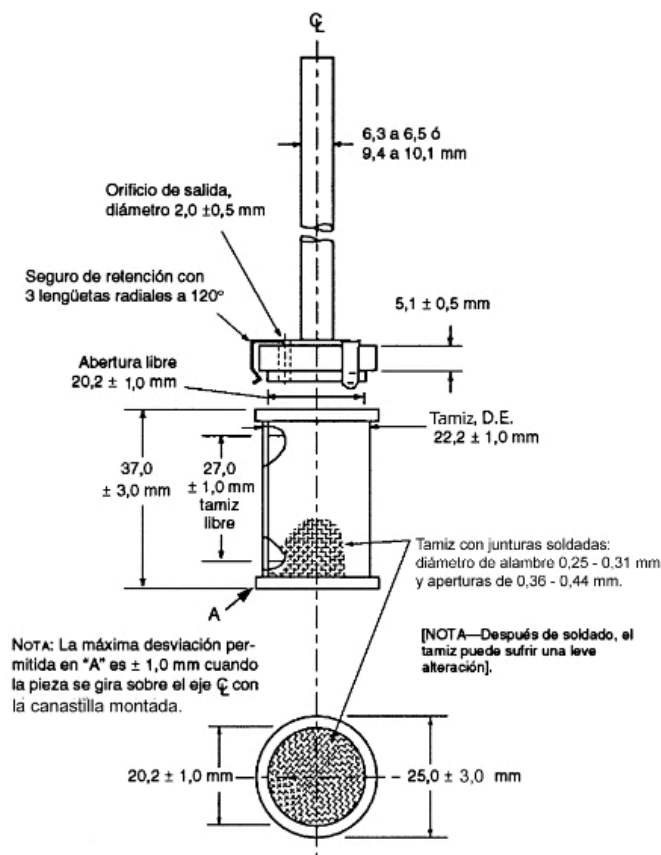


Figura 2. Especificaciones del Aparato USP 1 (canastilla)⁹

oscilantes; un motor y una transmisión que hacen oscilar los cilindros en sentido vertical dentro de los vasos y, de ser necesario, traslada los cilindros en sentido horizontal hacia otra hilera de vasos. Los vasos están sumergidos en un baño de agua adecuado que permita mantener la temperatura a 37 ± 0.5 °C durante la prueba (9).

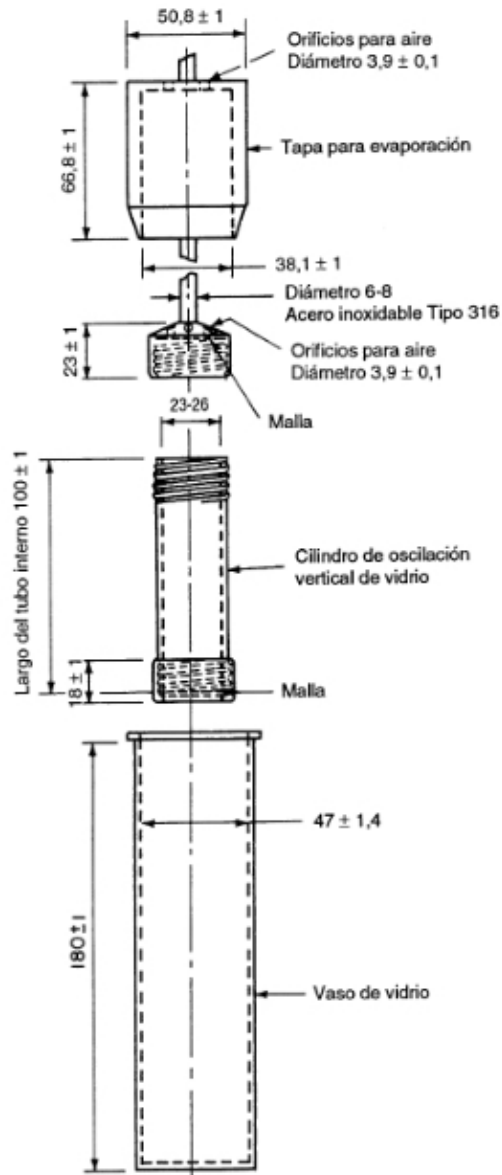


Figura 4. Especificaciones del Aparato USP 3 (cilindro oscilante/reciprocante)⁹

2.1.2.4. Aparato USP 4

El equipo se compone de un depósito y una bomba para el medio de disolución, una celda de flujo y un baño de agua que mantiene la temperatura del medio a 37 ± 0.5 °C. Se selecciona la celda del tamaño adecuado. La bomba desplaza el medio de disolución a través de una celda de flujo en dirección ascendente; la bomba debe suministrar flujo constante a razón de $\pm 5\%$ de la velocidad de flujo nominal. La celda de flujo, de un material transparente e inerte, está montada verticalmente con un sistema de filtro que impide que se escapen las partículas no disueltas de la parte superior de la celda; el diámetro estándar de la celda se ubica entre 12 mm y 22.6 mm; la base cónica de la celda está generalmente llena de perlas de vidrio que protegen el tubo de la entrada del fluido. La celda se sumerge en un baño de agua y se mantiene a la temperatura adecuada (9).

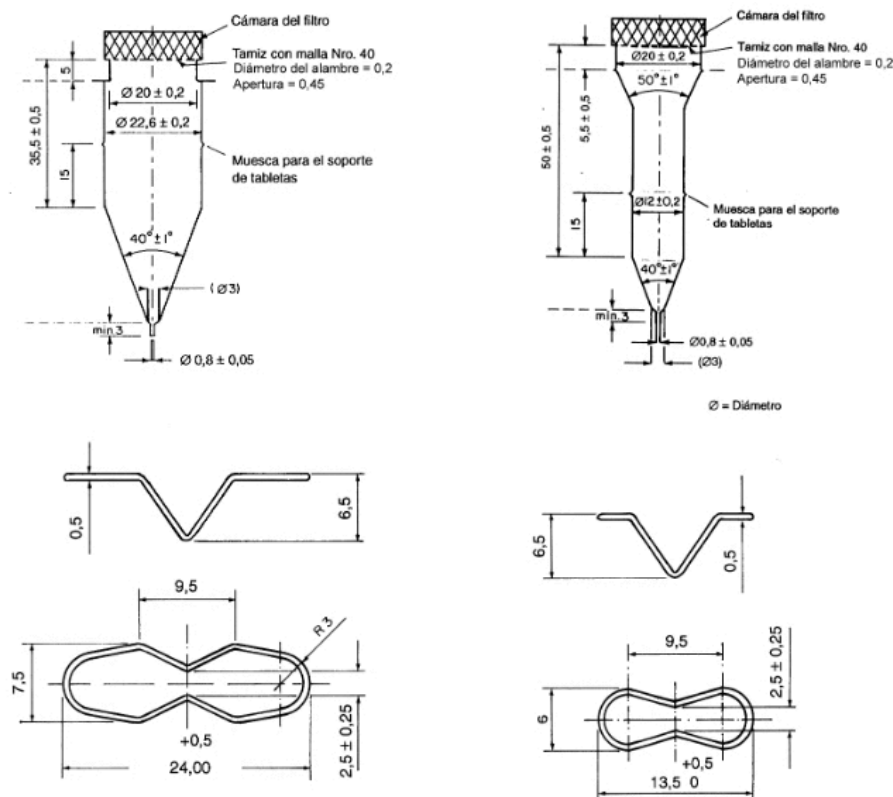


Figura 5. Especificaciones del aparato USP 4 (celda de flujo)⁹

2.1.3. Modelos matemáticos y teoría de la disolución.

Varias teorías han sido empleadas para construir modelos matemáticos que describan la disolución del API desde la forma de dosificación; ya que el proceso es de carácter cinético, la velocidad de disolución refleja la cantidad de API disuelta en un periodo dado de tiempo. En algunos casos es posible derivar una ecuación exacta que describe la dependencia de la disolución por el tiempo (solución analítica matemática); sin embargo, cuando una solución de ese estilo no se logra, se establecen relaciones empíricas que describen adecuadamente el sistema (7).

La velocidad de disolución de una sustancia fue propuesta de manera cuantitativa por Noyes y Whitney en 1897 de la siguiente manera:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{DS}{Vh}(C_s - C)$$

Dónde dC/dt representa la velocidad de disolución, D es el coeficiente de difusión del soluto en el medio de disolución, S es el área superficial del sólido expuesto, V es el volumen de medio de disolución, h el espesor de la capa de difusión, C_s es la solubilidad del sólido (concentración de saturación) y C es la concentración del soluto en el medio de disolución (7).

La teoría de Noyes-Whitney establece que existe una capa de difusión de espesor h en la superficie del sólido que se disuelve. Esta capa de difusión representa una región estacionaria de disolvente en la cual el soluto se encuentra en concentraciones de C_s a C ; más allá de la capa de difusión, el fármaco se encuentra a una concentración uniforme en el medio de disolución (*Figura 2*) (7).

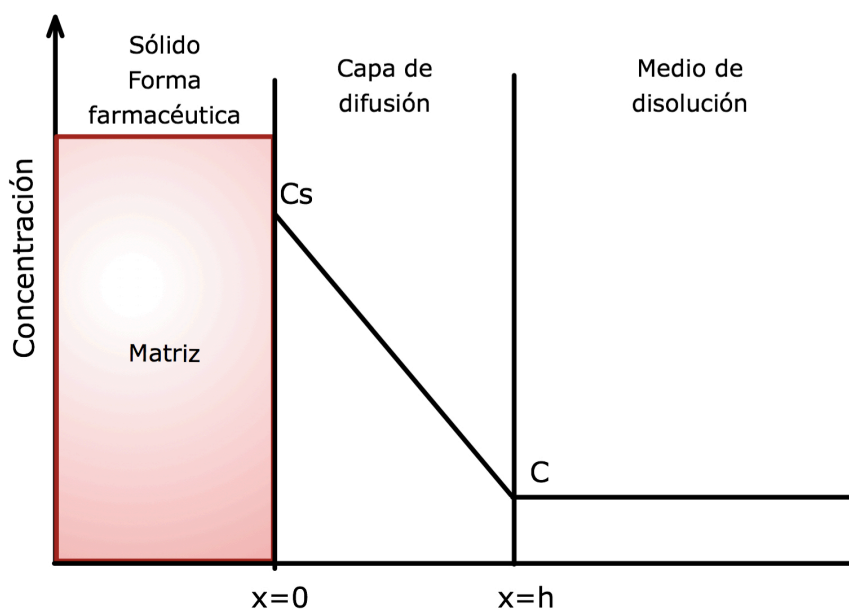


Figura 6. Modelo de la capa de difusión (recreado de Sinko, P. 2011)⁷

De acuerdo con el modelo, la concentración de saturación del fármaco es un parámetro clave; el proceso de disolución depende de un gradiente de concentraciones, por lo que la fuerza motriz depende del espesor de la capa de difusión y la concentración del fármaco en el medio. Cuando C es menor al 20% de C_s , se dice que el sistema opera bajo condiciones "sink" y la fuerza motriz es máxima.

Bajo estas condiciones, el modelo se simplifica:

$$Q_t = Q_0 e^{-kt} \text{ o } \ln(Q_t/Q_0) = -kt$$

Dónde, la disolución depende de una constante de proporcionalidad y del tiempo.

La construcción de un modelo matemático que describa el comportamiento del sistema requiere conocimiento profundo de los fenómenos que impactan la cinética de liberación.

En la tabla siguiente se enlistan algunos de los modelos matemáticos de uso más frecuente en la descripción y comparación de perfiles de disolución (10).

Tabla 1. Modelos matemáticos de la cinética de liberación⁸.

Modelo matemático	Ecuación
Orden cero	$Q_t = Q_0 + kt$
Primer orden	$\ln(Q_t) = \ln(Q_0) + k_1 t$
Hixon-Crowell	$Q_0^{(1/3)} - Q_t^{(1/3)} = kt$
Higuchi	$Q_t = K_H * t^{(1/2)}$
Weibull	$Q_t = Q_0 (1 - e^{-(t-T/a)^b})$
Korsmeyer-Peppas	$Q_t / Q_\infty = kt^n$
Hopfenberg	$Q_t / Q_\infty = 1 - [1 - k_1 * t(t-1)]^n$
Baker-Lonsdale	$(\frac{3}{2}) [1 - (1 - \frac{Q_t}{Q_\infty})^{(2/3)}] - \frac{Q_t}{Q_\infty} = kt$
Gompertz	$Q_t = Q_{max} * e^{(-ae^{(k \log t)})}$

Dónde Q_0 representa la cantidad disuelta al tiempo cero, Q_t la cantidad disuelta al tiempo t , Q_t/Q_∞ la fracción disuelta, k la constante de disolución y t el tiempo.

El modelo de orden cero es útil para describir la disolución de sistemas que no se desintegran y que liberan lentamente la misma cantidad de fármaco por unidad de tiempo. La fracción de fármaco disuelta depende únicamente del tiempo y de la constante aparente de disolución.

El modelo de primer orden incorpora en la constante de liberación de primer orden (k_1) parámetros de difusión y área superficial estableciendo relaciones entre la primera ley de Fick y la ecuación de Noyes-Whitney bajo condiciones sink. Suele aplicarse a la descripción de sistemas matriciales porosos que liberan fármacos hidrosolubles.

El modelo de Hixon-Crowell expresa la velocidad de disolución en función de la forma y densidad de las partículas, el número de las mismas y parámetros de difusión; el diámetro de las partículas no se asume constante. Suele aplicarse a la descripción de diferentes sistemas en los que la disolución sucede en planos paralelos a la superficie de la forma farmacéutica cuyas dimensiones disminuyen proporcionalmente manteniendo la geometría original.

El modelo de Higuchi describe la liberación de fármacos desde un sistema matricial como un proceso basado en la ley de Fick, dependiente de la raíz cuadrada del tiempo. Útil para la descripción de sistemas de liberación modificada.

El modelo de Weibull es un modelo empírico que puede aplicarse a muchos tipos de perfiles de disolución; considera como parámetros "T" (tiempo "lag" medido como resultado del proceso de disolución), "a" que representa la dependencia del tiempo y "b" que representa la forma del perfil de disolución. Cuando $b=1$, la curva tiene la forma exacta de una exponencial con $k=1/a$; si $b>1$, la curva

tiene forma sigmoide con un punto de inflexión y si $b < 1$, la curva presentará incrementos más pronunciados que aquella con $b = 1$.

El modelo de Korsmeyer-Peppas permite describir y caracterizar la liberación de sistemas difusivos; bajo algunas condiciones, el mecanismo de liberación puede desviarse de la difusión Fickiana y el valor de "n" del modelo permite identificar el tipo de mecanismo (siempre y cuando $Q_t/Q_\infty > 0.6$) de la siguiente manera:

Tabla 2. Interpretación del valor "n" de Korsmeyer-Peppas(11)

Película	Cilindro	Esfera	Mecanismo de liberación
n	n	n	
0.5	0.45	0.43	Difusión Fickiana
$0.5 < n < 1.0$	$0.45 < n < 0.89$	$0.43 < n < 0.85$	Transporte anómalo
1.0	0.89	0.85	Transporte caso II

La elección del modelo que describe de mejor manera los datos experimentales se realiza en función de la bondad de ajuste; los índices comúnmente empleados para tal evaluación incluyen(12,13):

- **Suma de cuadrados del error (SSE):** mide la desviación total del ajuste a los valores de respuesta, es llamado también suma de cuadrados de los residuos. Un valor cercano a 0 indica que el modelo tiene un menor componente de error aleatorio y el ajuste será de mayor utilidad para predicción.
- **R:** El coeficiente de correlación es una medida de la dependencia lineal entre variables aleatorias cuantitativas. Puede tomar valores entre 0 y 1, siendo un valor de 1 indicación de correlación lineal total.

- **R²**: El coeficiente de determinación mide qué tan exitoso es el ajuste explicando la variación de los datos. De otra manera, es el cuadrado de la correlación entre los valores de respuesta y los valores predichos.

Sólo puede tomar valores entre 0 y 1, siendo un valor cercano a 1 el que indica que una mayor proporción de la variación es explicado por el modelo.

- **Error Relativo asociado a la Regresión (ERR)**: Es la raíz cuadrada del error cuadrado medio y es conocido en estadística como el error estándar de la regresión o error estándar del estimado y representa la desviación estándar del componente aleatorio en los datos. Al igual que el SSE, un valor cercano a cero indica que el ajuste tiene mayor utilidad para predicción.
- **Criterio de Información de Akaike (AIC)**: Fue desarrollado para comparar diferentes modelos y evitar seleccionar un modelo que pueda sub-ajustarse a los datos y no reflejar la variabilidad natural de los mismos o sobre-ajustarse y perder generalidad. AIC relaciona el número de parámetros estimables (grados de libertad) con la verosimilitud en su punto máximo del modelo ajustado. Es importante mencionar que AIC es un índice ordinal y no significa nada por sí mismo, se emplea para establecer una relación ordenada entre modelos y se selecciona aquel que tenga un valor menor de AIC.

2.2. Perfiles de disolución.

Cómo se ha establecido anteriormente, un perfil de disolución es la medida de la liberación del API desde la forma farmacéutica hacia un medio receptor durante un periodo de tiempo; la curva resultante del tratamiento de los datos de múltiples tiempos de

muestreo representa la cantidad o el porcentaje acumulado de fármaco disuelto en el tiempo (11).

El conocimiento actual sobre la solubilidad, permeabilidad, disolución y farmacocinética de un producto farmacéutico debe considerarse cuando se definen las condiciones bajo las cuales se construye su perfil de disolución.

2.2.1. Sistema de clasificación biofarmacéutica (BCS)

Considerando la solubilidad de un fármaco y su permeabilidad, el equipo de Amidon y colaboradores establecieron en 1995 un sistema de clasificación de los APIs en función de dichos parámetros (*Tabla 3*). La solubilidad es determinada disolviendo la unidad de dosificación de la dosis mayor del fármaco en 250 mL de solución reguladora de pH entre 1.0 y 8.0. Un fármaco se considera altamente soluble cuando el volumen obtenido del cociente Dosis/Solubilidad es menor o igual a 250 mL. Los fármacos altamente permeables son, generalmente, aquellos cuya absorción es mayor del 90% en ausencia de inestabilidad en el TGI o bien cuando la permeabilidad del mismo se ha determinado de manera experimental (12).

Tabla 3. BCS¹²

Clase I	Alta solubilidad – Alta permeabilidad
Clase II	Baja solubilidad - Alta permeabilidad
Clase III	Alta solubilidad - Baja permeabilidad
Clase IV	Baja solubilidad – Baja permeabilidad

El BCS sugiere que para fármacos Clase I, y en algunos casos, Clase III el 85% disuelto en HCl 0.1N en 15 minutos puede asegurar que la BA del API no está limitada por la disolución.

Para fármacos clase II, la velocidad de disolución puede ser el paso limitante de la absorción y puede esperarse IVIVC (12).

Durante el desarrollo de métodos de disolución deben considerarse factores relacionados con el BCS:

- El volumen del medio de disolución debe ser manejable y está limitado por el diseño del aparato elegido.
- El estudio de la disolución de fármacos de baja solubilidad puede implicar no alcanzar disolución total del contenido en el volumen de ciertos medios de disolución.
- La sensibilidad analítica para fármacos de alta potencia (baja dosis) y/o con volúmenes de medio de disolución altos puede no ser la requerida.

2.2.2. Comparación de perfiles de disolución (14)

La comparación de perfiles de disolución obtenidos bajo las mismas condiciones permite establecer la similitud en virtud de del perfil total y la similitud a cada punto de la curva. La comparación puede realizarse empleando acercamientos modelo independientes o modelo dependientes.

Acercamientos modelo independientes.

I) Factor de diferencia y factor de similitud.

El factor de diferencia f_1 calcula el porcentaje de diferencia entre las dos curvas a cada punto de tiempo y es una medida del error relativo entre las dos curvas.

$$f_1 = \left\{ \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \right\} * 100$$

Dónde "n" es el número de puntos de muestreo, R_t es el valor de disolución del perfil referencia (medicamento innovador) al tiempo t y T_t es el valor de disolución del perfil de prueba (medicamento

genérico) al tiempo t. Para considerarse ambos perfiles similares, f_1 debe encontrarse entre 0-15.

El factor de similitud (f_2) es una transformación logarítmica, recíproca y con raíz cuadrada de la suma de cuadrados del error y es una medida de la similitud en porcentaje de la disolución entre las dos curvas.

$$f_2 = 50 * \log \{ [1 + (1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2]^{-0.5} * 100 \}$$

Para que ambos perfiles se consideren similares en términos de disolución, el valor de f_2 debe encontrarse entre 50-100 y el estudio debe haber sido realizado con 12 unidades del producto de prueba y 12 unidades del producto de referencia. Dentro de las consideraciones normativas se incluyen que sólo una medida tras alcanzar el 85% disuelto debe tomarse en cuenta y que el coeficiente de variación del porcentaje disuelto al primer tiempo de muestreo debe ser menor o igual a 20.0% y menor o igual a 10.0% para los tiempos subsecuentes.

II) Región de confianza multivariado

En casos en los que la variación dentro de un lote sea mayor a 15% CV, un procedimiento multivariado es más adecuado para comparar los perfiles de disolución. Éste acercamiento implica determinar la similitud en términos de la MSD basada en la diferencia intralote en la disolución de una referencia aprobada; debe estimarse la MSD entre la prueba y la referencia, estimar el IC_{90} de la MSD y comparar el límite superior del IC_{90} con el límite de similitud. Si el límite superior del IC_{90} es menor o igual que el límite de similitud los perfiles se consideran similares.

Acercamiento modelo dependiente.

Para aplicar los modelos de la cinética de disolución a la comparación de perfiles de disolución se sigue el siguiente procedimiento: se selecciona el modelo más apropiado para los perfiles de disolución de referencia y de prueba (se recomiendan modelos con no más de tres parámetros), se establece una región de similitud basada en la variación de los parámetros del modelo ajustado a los datos de prueba y de referencia, se calcula la MSD de los parámetros del modelo entre la prueba y la referencia, se estima el IC_{90} y se comparan los límites del IC_{90} con la región de similitud. Si el IC_{90} se encuentra dentro de la región de similitud, los perfiles de disolución se consideran similares.

2.3. Bioexención

Los estudios de disolución comparativos se han empleado para exentar los requerimientos de bioequivalencia (bioexentables o *biowaivers*) para concentraciones menores de una forma de dosificación que ha sido aprobada tras estudios de BE. Para bioexentables debe generarse un perfil de disolución y evaluarse empleando alguno de los métodos presentados en el apartado 2.2.2.

En la normativa mexicana, la NOM-177-SSA1-2013 establece en su apartado 6.4 los requisitos para exentar la prueba de BE para concentraciones de fármaco adicionales a la ya evaluada (15).

2.4. Medios de disolución biorrelevantes ⁽²⁾

El propósito inicial de los medios biorrelevantes (BRM) fue evaluar la solubilidad y disolución de fármacos con baja solubilidad (BCS II y IV) bajo condiciones que simulasen aquellas en estómago e intestino. Rápidamente, el uso de BRM se extendió a otras áreas experimentales como estudios de estabilidad, solubilidad, pruebas y

perfiles de disolución y pruebas de permeabilidad de todo tipo de fármacos.

Los medios biorrelevantes no deben confundirse con soluciones reguladoras de pH convencionales como son SGF o SIF que vagamente representan las condiciones del estómago e intestino humano. Las diferencias entre un medio biorrelevante y un medio compendial se enlistan en la *Tabla 4*.

Tabla 4. Diferencias entre medios compendiales y medios biorrelevantes.

Medios biorrelevantes	Medios compendiales (SIF, SGF)
Representan pH, osmolalidad, tensión superficial y capacidad amortiguadora.	Representan pH
Incorporan componentes fisiológicos como sales biliares (taurocolato) y lecitina.	No incorporan sales biliares o lecitina.
Son útiles para caracterizar la solubilidad de fármacos de baja solubilidad bajo condiciones fisiológicas de estómago e intestino.	Útiles para evaluar la solubilidad de un fármaco en pH fisiológico.
Tienen poder discriminatorio biológico en estudios de disolución de fármacos poco solubles y formulaciones que los contengan.	No necesariamente son biológicamente discriminatorios.
Permiten diferenciar entre condiciones en ayuno y tras consumir alimentos.	No diferencian entre estado en ayuno y tras consumir alimentos.
Pueden emplearse para la predicción del comportamiento de un fármaco <i>in vivo</i> en estudios de disolución y permeabilidad.	En algunos casos pueden predecir la disolución <i>in vivo</i> .

2.4.1. Tipos de BRM

BRM en estado de ayuno

I) FaSSGF (*Fasted State Simulated Gastric Fluid*): simula el fluido gástrico antes de los alimentos y puede distinguirse entre especies. El medio FaSSGF humano tiene un pH ácido de 1.6 e incorpora pequeñas cantidades de sales biliares (taurocolato) y lecitina. Si se requieren enzimas (como pepsina), pueden agregarse para representar los componentes activos del estómago en ayuno. La tabla siguiente muestra la composición de FaSSGF.

Tabla 5. Composición de FaSSGF

Componete	Concentración
Taurocolato de sodio	0.08 mM
Lecitina	0.02 mM
Cloruro de sodio	34.2 mM
Ácido clorhídrico	25.1 mM
Pepsina	0.1 mg/mL

Tabla 6. Propiedades de FaSSGF

Propiedades	FaSSGF
pH	1.6
Osmolalidad	120±2.5 mOsm/Kg

II) FaSSIF (*Fasted State Simulated Intestinal Fluid*): simula el fluido intestinal en ayuno y contiene una cantidad significativa de lecitina y sales biliares.

Opcionalmente puede incluir enzimas digestivas como pancreatina. FaSSIF puede distinguirse entre varias versiones y especies.

El medio FaSSIF humano puede encontrarse en dos versiones, V1 y V2. FaSSIF (o FaSSIF-V1) está basado en un compendio de estudios que evaluaron el fluido intestinal; tiene un pH de 6.5 y

contiene lecitina y taurocolato de sodio como la sal biliar. FaSSIF-V2 está basado en publicaciones actualizadas; describe condiciones intestinales más específicas de un grupo de individuos que producen menos lecitina. Por lo tanto, FaSSIF-V2 representa una versión actualizada que permite representar un grupo mayor de población. A continuación se presentan la composición y propiedades de FaSSIF.

Tabla 7. Composición de FaSSIF-V1 y FaSSIF-V2

Componete	FaSSIF-V1	FaSSIF-V2
Taurocolato de sodio (mM)	3.0	3.0
Lecitina (mM)	0.75	0.2
Cloruro de sodio (mM)	105.9	68.62
Ácido maleico (mM)	-	19.12
Fosfato monobásico de sodio (mM)	28.4	-
Hidróxido de sodio (mM)	8.7	34.8
Pancreatina (mg/mL)	10 (opcional)	

Tabla 8. Propiedades de FaSSIF-V1 y FaSSIF-V2

Propiedades	FaSSIF-V1	FaSSIF-V2
pH	6.5	6.8
Osmolalidad (mOsm/Kg)	270±10	180±10
Capacidad amortiguadora (mM/ΔpH)	10	10

BRM en estado postprandial

III) FeSSGF (*Fed State Simulated Gastric Fluid*): pretende simular las condiciones del fluido gástrico tras la ingesta de alimentos.

Los medios FeSSGF actuales tienen un pH de 5 y contienen aproximadamente un 50% de leche ultra pasteurizada. El uso de leche como medio de disolución fue propuesto hace más de 20 años y ha sido intensamente investigado hasta hoy gracias a su proporción de lípidos/carbohidratos/proteínas que es similar a aquella encontrada en el contenido gástrico postprandial (16).

El estómago tras ingesta de alimentos es un sistema dinámico y la composición del medio cambia con el tiempo. Estas variaciones deben tomarse en consideración. FeSSGF representa vagamente dicho sistema y podría subestimar el efecto de algunas propiedades importantes del estómago postprandial.

IV) FeSSIF (*Fed State Simulated Intestinal Fluid*): simula el fluido intestinal tras la ingesta de alimentos. Tiene un pH menor que FaSSIF pero una cantidad mucho mayor de componentes biliares. FeSSIF puede distinguirse en dos versiones, V1 y V2. La versión 1 es simplemente llamada FeSSIF y su composición está basada en la evaluación del fluido intestinal humano reportada en varios estudios; por lo tanto, contiene altas concentraciones de taurocolato de sodio y lecitina y tiene un pH de 5.

Estudios más recientes han mostrado que existen productos del metabolismo de lípidos en el intestino postprandial que pueden interactuar con una multitud de sustancias adquiridas de la dieta. FeSSIF-V2 fue desarrollado para considerar el metabolismo de lípidos, el pH intestinal actualizado de 5.8 y contiene, además de taurocolato de sodio y lecitina, monooleato glicerol y oleato de sodio. En las *Tablas 9 y 10* se presenta la composición y propiedades de las dos versiones de FeSSIF.

Antes de comenzar un estudio de disolución en BRM, se debe decidir qué región del tracto gastrointestinal (estómago o intestino) y qué estado prandial (ayuno o postprandial) se va a simular.

Con base en lo anterior, se selecciona el medio biorrelevante. Los volúmenes usuales de BRM son de 500 mL para desarrollo y 900 mL para control de calidad. La rotación de la paleta (Aparato 2 USP) en el disolutor depende del estado prandial a simular. En el estado de ayuno simulado, las velocidades suelen fijarse entre 75-100 rpm,

mientras que para el estado postprandial simulado (tras ingesta de alimentos) suele encontrarse alrededor de 50 rpm.

Tabla 9. Composición de FeSSIF-V1 y FeSSIF-V2

Componente	FaSSIF-V1	FaSSIF-V2
Taurocolato de sodio (mM)	15	10
Lecitina (mM)	3.75	2
Cloruro de sodio (mM)	203.2	125.5
Ácido maleico (mM)	-	55.02
Monooleato de glicerol (mM)	-	5
Oleato de sodio (mM)	-	0.8
Ácido acético (mM)	144.1	-
Hidróxido de sodio (mM)	101.0	81.65
Pancreatina (mg/mL)	40 (opcional)	

Tabla 10. Propiedades de FeSSIF-V1 y FeSSIF-V2

Propiedades	FaSSIF-V1	FaSSIF-V2
pH	5.0	5.8
Osmolalidad (mOsm/Kg)	670±10	390±10
Capacidad amortiguadora (mM/ΔpH)	76	25

2.5. Correlación *in vitro-in vivo*

IVIVC es un término general que se refiere a la relación matemática entre una propiedad biológica producida por una forma de dosificación (para fines del presente trabajo) como lo es la fracción de fármaco absorbida y una característica fisicoquímica de la misma observable *in vitro* como la fracción de fármaco disuelta en un estudio de disolución. El establecimiento de una IVIVC simplifica el desarrollo farmacéutico disminuyendo el número de estudios *in vivo* que deben realizarse (17).

Para productos desarrollados con el objetivo de tener acción sistémica, la propiedad biológica a evaluarse suele ser la llegada del fármaco a circulación (perfil farmacocinético) y la disolución aparente suele ser el parámetro *in vitro* de elección.

La FDA incluye en su guía(18) una categorización de los niveles de IVIVC posibles; los niveles se resumen en la *Tabla 11*.

Tabla 11. Niveles de IVIVC

Nivel	Tipo de correlación	Observaciones
A	Punto a punto, compara la fracción de fármaco disuelta con la fracción de fármaco absorbida (tras deconvolución de los datos de entrada).	Suele ser lineal; las correlaciones no lineales son poco frecuentes pero posibles y apropiadas.
B	Se basa en los principios del análisis del momento estadístico. El MDT es comparado al MRT o al MDT <i>in vivo</i> .	Emplea todos los datos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> pero no es una correlación punto a punto. Varias curvas diferentes pueden arrojar el mismo MDT o MRT
C	Establece una relación en un único punto entre un parámetro de disolución ($t_{50\%}$, por ejemplo) y un parámetro farmacocinético (AUC, C_{max} , t_{max}).	No refleja la forma de la curva de C_p contra tiempo, crítica en el desempeño.
Múltiple C	Relaciona uno o varios parámetros farmacocinéticos de interés con la fracción de fármaco disuelta a varios tiempos.	Poco frecuentes.

Para el establecimiento de una IVIVC la FDA considera que los datos humanos deben provenir de un número suficiente de sujetos para caracterizar el desempeño del producto, los estudios deben realizarse en estado de ayuno (a menos que el fármaco no sea tolerado), todas las formulaciones probadas deben analizarse bajo las mismas condiciones de disolución *in vitro*, un medio acuoso de pH menor o igual a 6.8 debe seleccionarse preferentemente (medios de disolución de pH mayor deben ser justificados), para fármacos poco solubles, la adición de surfactantes puede ser apropiada (18).

2.5.1. Deconvolución de datos de entrada: método de Nelson-Wagner.

El método de Nelson Wagner es un acercamiento frecuente en el establecimiento de IVIVC ya que permite la deconvolución modelo-dependiente de datos de concentraciones plasmáticas de fármaco para obtener la fracción absorbida en función del tiempo. Entonces, se grafica la fracción de fármaco absorbida contra la fracción de fármaco disuelta; si ambas curvas son superponibles y se obtiene una relación matemática (preferentemente lineal, aunque relaciones no-lineales pueden ser apropiadas), se sugiere que existe una correlación fuerte entre la prueba *in vitro* y el desempeño de la forma de dosificación *in vivo* (19).

Modelo:

$$FA(t) = \frac{[C_t + k_e * AUC_{(0-t)}]}{[k_e * AUC_{(0-\infty)}]}$$

2.6. Pioglitazona

2.6.1. Diabetes Mellitus en México, importancia de antidiabéticos.

La Diabetes Mellitus es una enfermedad crónica caracterizada por la incapacidad del organismo para regular la glucemia (glucosa en sangre). Las personas con diabetes presentan hiperglucemia debido a que su cuerpo no logra movilizar la glucosa desde la sangre a los adipocitos y células musculares para ser metabolizada o almacenada como energía. Entre las causas de dicho incremento en la glucemia se encuentran una producción deficiente de insulina (hormona producida por el páncreas que controla la glucemia) en el páncreas, insulinoresistencia (las células no responden de manera adecuada a la insulina) o ambas razones (20).

En términos generales se reconocen dos tipos principales de Diabetes. Las causas y factores de riesgo son diferentes para cada una de ellas:

- **Diabetes tipo 1:** En este tipo de diabetes el cuerpo no produce suficiente insulina ya que sus productoras: las células pancreáticas dejan de trabajar.
- **Diabetes tipo II:** En esta modalidad de la enfermedad se produce una cantidad adecuada de insulina pero el cuerpo es resistente a la misma y no la utiliza con la eficacia requerida para controlar la glucemia.

En México, la diabetes tipo 2 es la novena causa de enfermedad, con un registro de 391 casos nuevos por cada 100,000 habitantes y para el 2014 ocupó el segundo lugar en la lista de causas de mortalidad con un total de 94,029 defunciones registradas a causa de la misma (21,22). Las estadísticas justifican que la Diabetes Mellitus sea un tema de alto interés en materia de salud

pública y los fármacos y medicamentos indicados en el tratamiento de la misma son un campo de estudio relevante desde el punto de vista farmacéutico y biofarmacéutico.

Entre los fármacos de elección para el tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2 se encuentran las tiazolidinedionas o "sensibilizadores a insulina"; dentro de este grupo se encuentra la pioglitazona, fármaco de estudio en el presente proyecto.

2.6.2. Pioglitazona: identificación y propiedades fisicoquímicas (23).

Nombre: Pioglitazona

Número CAS: 111025-46-8

Tipo: Molécula pequeña

Fórmula: C₁₉H₂₀N₂O₃S

Clasificación BCS: II (baja solubilidad, alta permeabilidad)

Sinónimos:

- (+-)-5-((4-(2-(5-Ethyl-2-pyridinyl)ethoxy)phenyl)methyl)-2,4-thiazolidinedione.
- Pioglitazona.
- Pioglitazone.

Peso molecular: 356.439 D

Punto de ebullición experimental: 183-184 °C

logP experimental: 2.3

logP predicho (ALOGPS): 3.17

logP predicho (ChemAxon): 3.33

Solubilidad acuosa (predicha): 0.00442 mg/mL; prácticamente insoluble en agua.

Solubilidad: soluble en *N,N*-dimetilformamida; ligeramente soluble en etanol anhidro; muy ligeramente soluble en acetona y acetonitrilo; prácticamente insoluble en agua; insoluble en éter.

pKa (ácido más fuerte): 6.66

pKa (básico más fuerte): 5.6

Longitud de onda de máxima absorción (UV): 270 nm

Estructura:

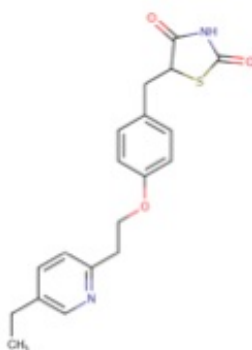


Figura 7. Pioglitazona(23)

2.6.2.1. Influencia del pH en la solubilidad de pioglitazona.

La pioglitazona es una base débil con buena solubilidad a pH ácido; la solubilidad máxima reportada (2.9 mg/mL) se alcanza en fluido gástrico simulado (SGF). El perfil de solubilidad como función del pH se presenta en la *Figura 8 (24)*.

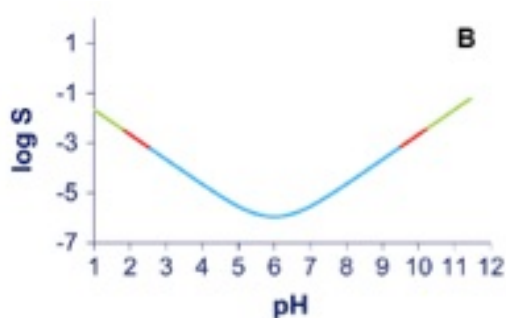


Figura 8. Perfil S(pH) de PIO(24)

2.6.3. Farmacodinamia

La pioglitazona es un miembro del grupo de fármacos conocidos como tiazolidinedionas o "sensibilizadores de insulina", no se encuentra relacionada química o funcionalmente a fármacos inhibidores de alfa-glucosidasa, biguanidas o sulfonilureas; la pioglitazona tiene como blanco la resistencia a insulina y, por tanto, se emplea sola o en combinación con insulina, metformina o alguna sulfonilurea como agente antidiabético.

Mecanismo de acción: Actúa como un agonista de receptores gamma activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR-gamma), promoviendo la sensibilidad a insulina en el tejido blanco; que puede ser adiposo, muscular (esquelético) o hepático. La activación del receptor nuclear PPAR-gamma incrementa la transcripción de genes sensibilizadores a insulina involucrados en el control de la producción, transporte y utilización de glucosa. De esta forma, la pioglitazona incrementa la sensibilidad del tejido blanco a la insulina y disminuye la gluconeogénesis hepática por lo que la resistencia a la insulina asociada a diabetes tipo 2 mejora sin incrementar la secreción de insulina desde las células β pancreáticas (23,25).

2.6.4. Farmacocinética (4,25).

Absorción: Se sabe que después de la administración oral, PIO es cuantificable en plasma a los 30 minutos y el máximo de concentración se observa a las dos horas. Los alimentos retrasan la aparición de C_{max} hasta 3 o 4 h, pero no se modifica la extensión de la absorción.

Unión a proteínas: Es mayor a 99 %, principalmente a albúmina sérica. Los metabolitos presentan unión a albúmina sérica mayor a 98%.

Metabolismo: Hepático; la pioglitazona es metabolizada a productos activos e inactivos. Las isoformas del CYP450 involucradas en el metabolismo hepático de pioglitazona son CYP2C8 y CYP3A4. La isoforma extrahepática CYP1A1 también está involucrada en el metabolismo de pioglitazona.

Metabolitos de PIO:

- Metabolito II, activo (derivado hidroxilo)
- Metabolito III, activo (derivado ceto)
- Metabolito IV, activo (derivado hidroxilo)

Eliminación:

- Renal: 15%-30%; la pioglitazona es excretada principalmente como metabolitos y sus conjugados.
- Biliar: proporción desconocida; aunque no totalmente probado, se asume que la mayor parte de la dosis es excretada en la bilis como fármaco activo o metabolitos y es eliminada en las heces.

Tabla 12. Parámetros farmacocinéticos reportados para PIO.

Parámetro farmacocinético	Valor
C_{max}	1.117 $\mu\text{g/mL}$
t_{max}	2.5 h
k_e	0.078 h^{-1}
$t_{1/2}$	8.01 h
V_D	0.63±0.41 L/kg (25) 0.5 L/Kg (4)

2.6.5. Métodos analíticos.

2.6.5.1. Disolución compendial por espectrofotometría UV(26).

Q: 80%, 15 min

Aparato: 2 (paletas)

Medio de disolución: Ácido clorhídrico y solución de cloruro de potasio (150 mg/mL), pH 2.0.

Preparación de la referencia: Transferir 23 mg de la SRef de clorhidrato de pioglitazona a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver con 10 mL de metanol y llevar a volumen con medio de disolución. Diluir esta solución con medio de disolución hasta una concentración final de L/900; dónde L es la cantidad declarada en miligramos.

Preparación de la muestra: Colocar cada tableta en el aparato con 900 mL del medio de disolución, accionarlo durante 15 min a 75 rpm, pasar una porción del medio de disolución a través de un filtro adecuado con un tamaño de poro de 0.45 µm

Procedimiento: Determinar la absorbancia de la preparación de la referencia y de la preparación de la muestra a 269 nm usando celdas de 1 cm y medio de disolución como blanco de ajuste. Calcular el porcentaje de pioglitazona.

2.6.5.2. Valoración compendial por HPLC-UV⁽²⁶⁾

Especificación: No menos de 95.0% y no más de 105.0% de la cantidad de pioglitazona declarada en el marbete.

Fase móvil: Mezcla de ACN : AcONH₄ 0.1 M : ácido acético glacial (25:25:1)

Preparación de la referencia: Preparar una solución de la SRef de clorhidrato de pioglitazona en MeOH de 0.5 mg/mL y diluir con FM hasta obtener una solución que contenga 50 µg/mL.

Solución concentrada de adecuación del sistema: Preparar una solución en MeOH que contenga 0.5 mg/mL de clorhidrato de pioglitazona y 13 mg/mL de benzofenona.

Preparación de la muestra: Pesar no menos de 20 tabletas, calcular su peso promedio y triturar a polvo fino.

Transferir una porción de polvo equivalente a aproximadamente 23 mg de pioglitazona, a un matraz con tapón de vidrio y agregar 50 mL de MeOH. Someter a acción de un baño de ultrasonido durante dos minutos y luego centrifugar. Diluir una porción del sobrenadante con fase móvil para obtener una concentración nominal de 45 µg/mL de pioglitazona.

Condiciones del equipo: Detector de luz UV a una longitud de onda de 269 nm; columna de acero inoxidable de 15 cm x 4.6 mm empacada con L1 (octadecil-silano enlazado químicamente a sílica porosa o a micropartículas de cerámica de 5 a 10 µm de diámetro) de 5 µm; velocidad de flujo de 0.7 mL/min; temperatura de la columna de 25±2.5 °C. Nota: ajustar el flujo de manera que el tiempo de retención del pico de pioglitazona sea aproximadamente 7 min.

Volumen de inyección: 20 µL

2.6.5.3. Métodos analíticos no compendiales.

Hasta el 2014, se habían reportado 22 métodos analíticos para la cuantificación de PIO en matrices farmacéuticas por HPLC-UV (27), no han sido reportados estudios de disolución de PIO en FaSSIF o FeSSIF; se ha evaluado, sin embargo, la disolución de PIO en leche entera(28). El resumen de los métodos analíticos reportados se incluyen en la *Tabla 13*; el método resaltado en negritas se utilizó como base para el diseño de experimentos y las siglas ND en la columna del tiempo de retención (Tr) significan que no se menciona el mismo.

Tabla 13. Métodos analíticos para cuantificar PIO por HPLC-UV

FM	Tamaño columna (C18, 5 µm)	λ (nm)	Flujo (mL/min)	Tr (min)
SA KH ₂ PO ₄ pH 6.0 : ACN (50:50)	250 x 4.6 mm	225	1.0	10
SA fosfatos pH 4.0 :ACN: MeOH (55:30:15)	250 x 4.6 mm	245	1.5	ND
SA fosfatos 0.01 M (pH 3.5):MeOH (55:45)	250 x 4.6 mm	241	1.5	ND
SA formato de amonio (pH 3.0):ACN (75:25)	150 x 3.9 mm	225	1.0	ND
SA formato de amonio (pH 4.1):ACN (44:55)	250 x 4.6	266	1.0	ND
ACN 0.15% : Trietilamina (40:60)	250 x 4.6	220	1.5	7.6
Citrato de triamonio (pH 6.95): ACN: MeOH (45:35:20)	250 x 4.6	228	1.0	10.0
ACN: KH ₂ PO ₄ (pH 3.0) (50:50)	250 x 4.6	238	1.0	ND
ACN KH ₂ PO ₄ 0.05 M pH 3.0 (50:50)	250 x 4.6	225	1.0	ND
ACN:Acetato de amonio 0.02 M pH 4.5 (60:40)	250 x 4.6	230	1.0	7.0
MeOH: SA fosfatos pH 4.3 (75:25)	250 x 4.6	260	1.0	7.12
ACN: SA fosfatos pH 7 (60:40)	250 x 4.6	260	0.8	ND
ACN: SA fosfatos 0.01 M (pH 6.2) (50:50)	250 x 4.6	225	1.4	ND
Ácido fosfórico diluído (pH 3): ACN (80:20)	250 x 4.6	215	0.8	8.24
ACN:Agua:Ácido acético (75:25:0.3) pH 5.5.	250 x 4.6	230	0.5	8.5
SA fosfatos:ACN:THF (40:50:10) pH 5	250 x 4.6	228	1.7	3.9
SA fosfatos: ACN (40:60)	150 x 4.6	225	1.5	ND
KH ₂ PO ₄ 0.02 M (pH 3.2):ACN (gradiente)	Zorbax Cyano 250 x 4.6	230	0.8	31.93
MeOH:KH ₂ PO ₄ 0.02 M (85:15)	250 x 4.6	227	1.2	ND
MeOH:Agua (72:28)	250 x 4.6	230	1.0	ND
ACN:Dihidrógeno fosfato de amonio pH 4.5; 0.002M (65:35)	150 x 4.6	210	1.0	3.16
ACN:SA fosfatos pH 3 (65:35)	150 x 4.6	245	0.5	ND
Tween 20:n-butanol:SA fosfatos pH 4.2 (50:25:25)	250 x 4.6	322	1.5	ND
SA fosfatos pH 3.1 : ACN	150x 4.6	225	1.5	ND

2.7. Validación de un método analítico para estudios de disolución(15).

La NOM-177-SSA1-2013 establece los criterios de validación a cumplir para demostrar que el método analítico es apto para cuantificar el fármaco en estudios de disolución. Los parámetros de desempeño se establecen para el fármaco (sistema) y para el medicamento (método).

Parámetros de validación con el fármaco.

A) Linealidad: Preparar una curva, por duplicado, al menos con 5 puntos de concentración, sin incluir el punto cero.

$$R \geq 0.99 ; ERR \leq 2\%$$

B) Precisión: Con los datos de linealidad calcular el CV% del Fr.

$$CV\% \leq 2\%$$

C) Estabilidad analítica de la muestra: La diferencia absoluta del promedio del porcentaje cuantificado en el análisis inicial y final debe ser menor o igual a 3%.

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

Parámetros de validación con el medicamento.

A) Demostrar linealidad con al menos 5 puntos por triplicado, sin incluir el cero.

$$R \geq 0.99 ; ERR \leq 3\%$$

B) Exactitud: Calcular el promedio del porcentaje de recuperación de los datos de linealidad, el cual no debe variar en más del 3% con respecto a la cantidad nominal.

C) Precisión (repetibilidad): Con los datos de exactitud del método, calcular el CV% del porcentaje cuantificado.

$$CV\% \leq 3\%$$

D) Precisión (reproducibilidad): En caso de que participen dos o más analistas evaluar su efecto en la precisión del método.

Analizar una muestra homogénea de la disolución del producto por triplicado y calcular el porcentaje cuantificado. El CV% global debe ser menor o igual a 3%.

E) Especificidad: Demostrar selectividad del método para el fármaco ante otros componentes de la muestra.

3. MATERIALES, INSUMOS E INSTRUMENTOS

3.1. Reactivos y disolventes

Las sales empleadas en la preparación de disoluciones, los disolventes grado HPLC (ACN, MeOH) y el ácido acético glacial fueron adquiridos de J.T. Baker México.

Los medios biorrelevantes (SIF Powder, FaSSIF-V2) fueron adquiridos desde www.biorelevant.com

El agua grado HPLC fue obtenida de un sistema Milli-Q® Reference, mientras que el agua destilada se obtuvo de un sistema Elix® 3; ambos adquiridos de Merck Millipore.

El estándar secundario de Pioglitazona (PHR1632-500MG), clorhidrato fue adquirido de Sigma Aldrich

3.2. Consumibles

Las membranas de 0.45 µm y 0.22 µm para filtración de fases móviles y los filtros de 0.45 µm acoplables a jeringa empleados para clarificar muestras fueron adquiridas a Merck Millipore.

3.3. Insumos cromatográficos.

Columna Zorbax C18 de 50 mm x 4.6 mm de 5 µm de tamaño de partícula (Agilent Technologies).

Columna Symmetry C18 de 150 mm x 4.6 mm de 5 µm de tamaño de partícula (Waters).

Precolumna SecurityGuard; cartuchos empacados con C18, 5 µm de tamaño de partícula (Phenomenex).

3.4. Equipos e instrumentos

Balanza analítica Denver Instruments, USA.

Potenciómetro Hannah Instruments, USA.

Baño de ultrasonido Cole Parmer

Disolutor DS8000 (Aparatos USP1 y USP2), LABINDIA.

Disolutor BIO-DIS (Aparato USP3), Vankel (Agilent Technologies)

Cromatógrafo de líquidos serie HP1050, Hewlett-Packard (Agilent Technologies). Desgasificador en línea Alltech.

3.5. Productos farmacéuticos analizados.

Medicamento de referencia: Zactos®, producido en Japón por Takeda Pharmaceutical Company y acondicionado en México por Eli Lilly Compañía México S.A. de C.V.

Medicamentos genéricos: Gliozac (Pioglitazona, tabletas); producido en México por Productos Maver S.A. de C.V. (Empleado en el desarrollo del método). Pioglitazona, tabletas; producido en México por laboratorios Serral S.A. de C.V (Empleado en la aplicación del método). Todos los medicamentos fueron obtenidos de Farmacias de la Ciudad de México.

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La estrategia a seguir para el desarrollo del proyecto se resume en la siguiente figura.

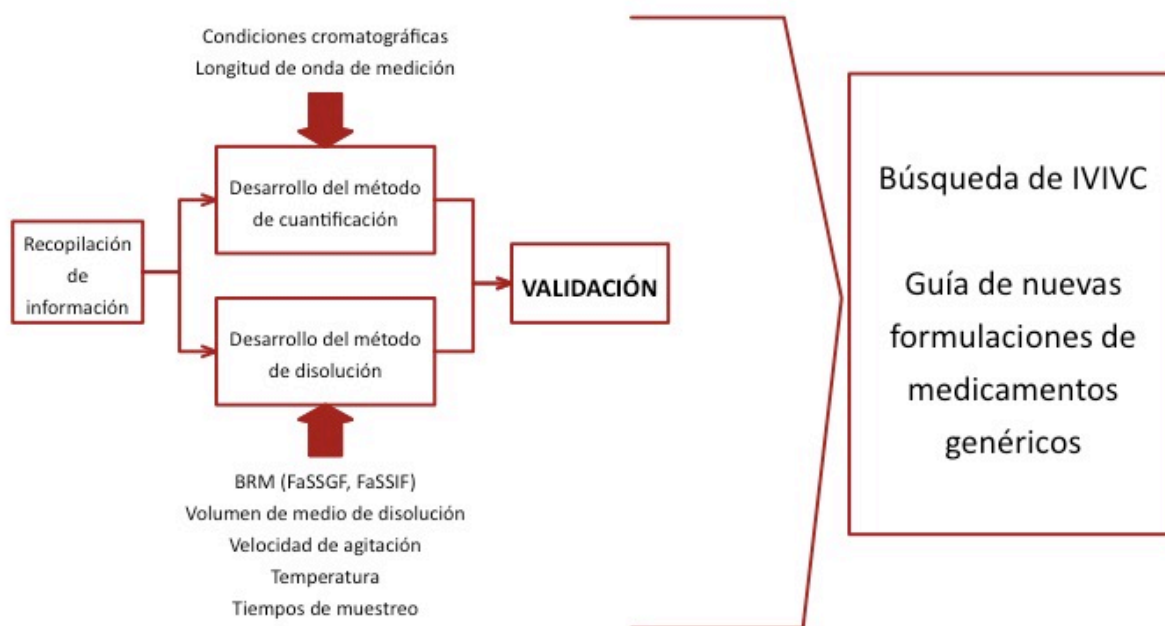


Figura 9. Estrategia de trabajo.

4.1. Desarrollo de la cuantificación.

Se determinaron las mejores condiciones cromatográficas para cuantificar el principio activo desde la matriz en estudio. Por una parte, se contemplaron como condiciones preferentes aquellas presentadas en la monografía del producto (Pioglitazona, tabletas) en la FEUM 11º ED para la valoración, adicionalmente se realizó un diseño de experimentos para evaluar la posibilidad de modificar las condiciones para acortar tiempos de análisis y sustituir el ACN por MeOH.

4.1.1. Primer acercamiento: condiciones compendiales

- Fase móvil: ACN:AcONH₄ 0.1 M:AcOH (25:25:1)
- Columna: 150 mm x 4.6 mm, empacada con L1 (C18) de 5 µm de tamaño de partícula.
- Longitud de onda: 269 nm
- Flujo: 0.7 mL/min
- Tiempo de retención: 7 min

Preparación de la FM (510 mL):

- Solución de AcONH₄ 0.1 M (250 mL): Pesar 3.86g de AcONH₄, transferir a un matraz volumétrico de 250 mL, añadir aproximadamente 130 mL de agua grado HPLC. Someter a baño de ultrasonido por 2 minutos, comprobar disolución total del sólido y llevar a volumen con agua grado HPLC, mezclar la solución obtenida con 10 mL de AcOH. Filtrar a través de una membrana de 0.45 µm y transferir a un reservorio de FM con capacidad de 1000 mL.

- Filtrar 250 mL de ACN grado HPLC y añadirlo al reservorio anterior. Mezclar y desgasificar con agitación con vacío por 30 minutos.

4.1.2. Segundo acercamiento: diseño de experimentos.

El diseño de experimentos se planteó con los objetivos de reducir el tiempo de análisis acortando la longitud de la columna de 150 mm a 50 mm, así como probar diferentes fases móviles compuestas de MeOH:SA (75:25); la proporción fue seleccionada con base en el método resaltado en la *tabla 13* y el intervalo de pH a evaluar corresponde a aquél especificado como adecuado por el fabricante de la columna. Las longitudes de onda probadas fueron elegidas considerando que el máximo de absorción reportado para PIO es 270 nm en agua y 260 nm en el método base. El diseño de experimentos corresponde a un diseño factorial con tres factores y dos niveles.

i) Selección de factores y niveles.

Tabla 14. Factores y niveles

Nivel/Factor	A: pH FM	B: Flujo (mL/min)	C: λ (nm)
-1	2	0.8	260
+1	6	1.2	280
MEDIA	4	1	270
INTERVALO	4	0.4	20

ii) Diseño y ejecución.

Tabla 15. Diseño de experimentos: cuantificación

EXP	A	B	C	Respuestas (Tr, Área, Altura, Simetría)
01	-1	-1	-1	
02	1	-1	-1	
03	-1	1	-1	
04	1	1	-1	
05	-1	-1	1	
06	1	-1	1	
07	-1	1	1	
08	1	1	1	

Preparación de soluciones.

- SA de fosfatos pH 2.0: En un matraz volumétrico de 1000 mL disolver 8.95 g de fosfato dibásico de sodio y 3.40g de fosfato monobásico de potasio en aproximadamente 900 mL de agua grado HPLC. Ajustar a pH 2.0 con ácido fosfórico. Llevar a volumen con agua grado HPLC. Filtrar por membrana de 0.45 μm .
- FM1 (MeOH:SA pH 2.0; 75:25): Filtrar por membrana de 0.45 μm 750 mL de MeOH grado HPLC, mezclar con 250 mL de SA pH 2.0. Agitar y esperar a que la mezcla llegue a temperatura ambiente. Desgasificar con agitación y vacío por 30 min.

- SA de fosfatos pH 6.0: En un matraz volumétrico de 1000 mL disolver 6.8 g de fosfato monobásico de sodio en aproximadamente 900 mL de agua grado HPLC. Si es necesario ajustar el pH a 6.0 con NaOH 1N. Filtrar por membrana de 0.45 μm .
- Solución de NaOH 1N: En un vaso de precipitados, disolver 4g de NaOH con aproximadamente 20 mL de agua. Transferir a un matraz volumétrico de 100 mL dejar que la solución tome temperatura ambiente y llevar a volumen con agua y homogeneizar.
- FM2 (MeOH:SA pH 6.0; 75:25): Filtrar por membrana de 0.45 μm 750 mL de MeOH grado HPLC y mezclar con 250 mL de SA pH 6.0 previamente filtrada. Agitar y esperar a que la mezcla llegue a temperatura ambiente. Desgasificar con agitación y vacío por 30 min.
- Preparación de la solución de referencia (200 $\mu\text{g/mL}$): Transferir una cantidad de SRef de pioglitazona, clorhidrato equivalente a 10 mg de PIO a un matraz volumétrico de 50 mL, agregar 10 mL de MeOH y someter a ultrasonido por 2 min. Verificar la disolución total del sólido. Llevar a volumen con FM y filtrar por membrana de 0.45 μm antes de transferir a viales.

4.2. Desarrollo del método de disolución.

4.2.1. Estudios preliminares con Aparato USP 2

Como primer acercamiento al desarrollo del método de disolución se seleccionó el aparato USP 2 y se probaron los siguientes medios de disolución: FaSSGF, FaSSIF-V2, FeSSIF, FeSSIF2X a las condiciones siguientes (el volumen de muestreo se mantuvo en 5 mL):

- Volumen de medio de disolución: 900 mL
- Temperatura del medio de disolución: 37 °C
- Temperatura del baño: 37.3 °C
- Velocidad de agitación: 100 rpm (seleccionada debido a la baja solubilidad de PIO a pH de FaSSIF y FeSSIF).
- Tiempos de muestreo: (0, 5, 10, 15, 25, 30) min

Preparación de soluciones.

- FaSSGF: En un matraz volumétrico de 1000 mL disolver 2g de NaCl en 900 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 1.6 con HCl y llevar a volumen con agua destilada. Homogeneizar y disolver en la solución anterior 0.060g de polvo FaSSGF/FaSSIF/FeSSIF.
- SA de acetatos pH 5: En un matraz volumétrico de 1000 mL disolver 4.04g de NaOH, 8.2 mL de AcOH y 11.87g de NaCl en 900 mL de agua. Ajustar a pH 5 con solución de NaOH 1 N o HCl y llevar a 1000 mL con agua destilada.
- FeSSIF: Disolver 11.2 g de FaSSGF/FaSSIF/FeSSIF en 1000 mL de SA de acetatos pH 5.
- FeSSIF2X: Disolver 22.4g de FaSSGF/FaSSIF/FeSSIF en 1000 mL de SA de acetatos pH 5.

4.2.2. Estudios preliminares en Aparato USP 3.

Para los estudios en Aparato 3, se evaluaron diferentes condiciones en la búsqueda de un porcentaje disuelto máximo mayor que en el Aparato 2. Las condiciones de los diferentes experimentos se resumen a continuación.

Tabla 16. Desarrollo del método de disolución

Experimento	BRM	Volumen de BRM por vaso (mL)	Agitación (dpm)	Permanencia por vaso (min)	Drenado (min)	Malla de la celda	Recambios de BRM
EXP01	FaSSIF-V2	250	12	5	1	Interna: #40 (420 μm) Externa: #40 (420 μm)	27 (6.7 L, 77% disuelto esperado)
EXP02	FaSSIF-V2	250	12	5	1	Interna: #400 (37 μm) Externa: #400 (37 μm)	35 (5.2 L, 60 % disuelto esperado)
EXP03	FaSSIF-V2	250	12	5	1	Interna: #400 (37 μm) Externa: #40 (420 μm)	35 (5.2 L, 60 % disuelto esperado)
EXP04	FaSSIF-V3	150	12	5	1	Interna: #400 (37 μm) Externa: #40 (420 μm)	35 (5.2 L, 60 % disuelto esperado)
EXP05	FaSSIF-V2	150	12	variable	1	Interna: #400 (37 μm) Externa: #40 (μm)	6 (900 mL)
EXP06	FeSSIF	150	12	variable	0.5	Interna: #400 (37 μm) Externa: #40 (μm)	6 (900 mL)
EXP07	FaSSIF-V2	150	30	variable	0.5	Interna: #400 (37 μm) Externa: #40 (μm)	6 (900 mL)

4.2.3. Estudio de pérdida y remanente.

Sabiendo que el principio activo micronizado en el producto de referencia contiene partículas menores a 30 μm (29) que se perderían a través de la malla interna de acero inoxidable de apertura de 37 μm , se estudió la proporción de fármaco perdido y remanente considerando las siguientes contribuciones y metodología:

- Fármaco disuelto: se determinó la concentración del fármaco disuelto en cada uno de los seis vasos de recambio tomando una muestra de 1.5 mL para su análisis por HPLC.
- Fármaco perdido: el contenido de cada uno de los seis vasos se filtró a través de una membrana de 0.22 μm para retener las partículas sólidas (excipientes + API no disuelto) y la membrana fue transferida a un matraz volumétrico de 200 mL, se añadieron al mismo 150 mL de medio de disolución compendial pH 2.0 y se sometió a ultrasonido por 10 min. Se llevó a volumen con medio compendial, la solución se filtró por membrana de 0.45 μm para su análisis por HPLC-UV.
- Fármaco remanente en la celda: el contenido sólido de la celda (tubo interno del Aparato 3) junto con las mallas interna y externa fueron transferidos a un embudo de separación de 100 mL, se agitó con 3 fracciones de 50 mL de medio de disolución compendial; las fracciones fueron recibidas en un matraz volumétrico de 200 mL y se llevó a volumen con el mismo disolvente. La solución fue filtrada por una membrana de 0.45 μm para su análisis por HPLC UV.

La cantidad de fármaco correspondiente a cada una de las contribuciones se determinó con el producto del volumen y la concentración y se calculó el porcentaje de la dosis que representan.

Durante el desarrollo del método de disolución se estableció el intervalo de concentraciones definitivo para la curva de calibración a emplear en la validación. Para la cuantificación del fármaco durante el desarrollo se construyeron curvas de calibración preliminares en función de los requerimientos analíticos y se resumen a continuación: i) curva de calibración en FM de (10-50) $\mu\text{g/mL}$ para el estudio preliminar en Aparato 2; ii) curva de calibración en FaSSIF-V2 de (1-2) $\mu\text{g/mL}$ para determinar el LOQ_p ; curva de calibración en FaSSIF-V2 de (1-10) $\mu\text{g/mL}$ empleada para los estudios preliminares en Aparato 3 y establecida como definitiva en la validación y el estudio de disolución *per se*, ésta última se describe a detalle en este apartado.

4.3. Validación del método analítico.

4.3.1. Validación con el fármaco.

Para la evaluación de los parámetros de desempeño (linealidad y precisión) con el fármaco se construyó la curva de calibración en FaSSIF-V2 por triplicado bajo el siguiente esquema (*Tabla 16*); las alícuotas fueron tomadas de una solución de trabajo (40 $\mu\text{g/mL}$) preparada desde una disolución stock (100 $\mu\text{g/mL}$).

Tabla 17. Curva de calibración con el fármaco.

Nivel	Alícuota (mL)	Volumen final FaSSIF-V2 (mL)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
1	0.5	20.0	1
2	1.0	20.0	2
3	2.0	20.0	4
4	3.0	20.0	6
5	5.0	20.0	10

Preparación de soluciones.

- SA de maleatos pH 6.8: Disolver 1.392g de NaOH, 2.220g de ácido maleico y 4.010g de NaCl en 900 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 6.8 con NaOH 1N. Llevar a 1000 mL con agua destilada y homogeneizar.
- FaSSIF-V2: Disolver 1.790 g de FaSSIF-V2 en 1000 mL de SA de maleatos pH 6.8.
- Solución stock de PIO (100 µg/mL): Pesar una cantidad de Sref de PIO.HCl equivalente a 10 mg de PIO y transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 50 mL de MeOH y someter a ultrasonido por 2 min. Verificar disolución total del sólido y llevar a volumen con FaSSIF-V2.
- Solución de trabajo PIO (40 µg/mL): Tomar una alícuota de 10.0 mL de solución stock y transferirla a un matraz volumétrico de 25 mL, llevar a volumen con FaSSIF-V2.

NOTAS: El contenido máximo de MeOH en la curva corresponde al 5% permitido por la NOM-177-SSA1-2013. Las soluciones de la curva de calibración fueron filtradas por membrana de 0.45 µm y transferidas a viales para su análisis por HPLC-UV.

La literatura reporta una estabilidad en soluciones acuosas (pH 7) de pioglitazona de 8 días a 4°C; para la evaluación de la estabilidad analítica, una fracción de la solución de trabajo fue analizada en fresco y otra almacenada en refrigeración y con protección de la luz para su análisis al octavo día.

La curva de calibración por triplicado se preparó en dos días diferentes en ausencia de la necesidad de la intervención de otro analista.

Para la prueba de la influencia del filtro, se preparó una dilución a 7 µg/mL de la solución de trabajo por sextuplicado, las soluciones sin filtrar se transfirieron a viales para su análisis por HPLC mientras que el remanente en los matraces fue filtrado a través del filtro de teflón acoplado a las cánulas de toma de muestra para repartirse en viales para su análisis.

4.3.2. Validación con el medicamento.

Para la evaluación de los parámetros de desempeño con el medicamento (linealidad, exactitud y precisión), se construyó por triplicado la curva de calibración a partir de una muestra compuesta del polvo de 10 tabletas del medicamento de referencia (Zactos) trituradas. La construcción de la curva de calibración con el medicamento se presenta en la *Tabla 17*. De forma análoga a la validación con el fármaco, la curva se preparó desde una solución de trabajo (40µg/mL) preparada a partir de una disolución stock (100µg/mL).

Tabla 18. Curva de calibración con el medicamento.

Nivel	Alícuota (mL)	Volumen final FaSSIF-V2 (mL)	Concentración (µg/mL)
0	0.0	20.0	0
1	0.5	20.0	1
2	1.0	20.0	2
3	2.0	20.0	4
4	3.0	20.0	6
5	5.0	20.0	10

Preparación de soluciones.

- Solución stock (100 µg/mL): Determinar el peso promedio de 10 tabletas del medicamento de referencia y triturarlas hasta polvo fino. Pesar una cantidad de polvo equivalente a 10 mg de pioglitazona y transferir a un matraz volumétrico de 100 mL. Añadir 50 mL de MeOH y someter a baño de ultrasonido por 5 min, agregar 30 mL aproximadamente de FaSSIF-V2 y esperar a que la solución llegue a temperatura ambiente. Llevar a volumen con FaSSIF-V2 y homogeneizar. Filtrar la solución a través de una membrana de 0.45µm (desechando los primeros 5 mL del filtrado).
- Solución de trabajo (40 µg/mL): Tomar una alícuota de 10.0 mL del filtrado de solución stock y transferirlo a un matraz volumétrico de 25 mL. Llevar a volumen con FaSSIF-V2 y homogeneizar.

La especificidad del método fue evaluada registrando los cromatogramas a longitudes de onda de 200 a 400 nm con el DAD y analizando el espectro 3D y la pureza del pico cromatográfico.

4.4. Tratamiento de datos.

4.4.1. Desarrollo de la cuantificación.

Para conocer el efecto factorial sobre las respuestas evaluadas se empleó análisis de varianza por contrastes, se construyó la superficie de respuestas y se obtuvieron líneas de contorno para determinar las condiciones que permiten obtener las respuestas deseadas. El análisis se llevó a cabo en Statgraphics Centurion XV.

4.4.2. Desarrollo del método de disolución.

El porcentaje de API disuelto a cada tiempo de muestreo fue calculado empleando una hoja electrónica en Microsoft Excel.

Cálculo del porcentaje disuelto a cada tiempo:

i) Calcular la cantidad de fármaco disuelto en el volumen de muestra tomado:

$$Q_{Mt} = C_t * V_M$$

Dónde: Q_{Mt} es la cantidad de fármaco en mg en el volumen de muestra tomado, C_t es la concentración de fármaco en mg/mL tomada en el tiempo "t" y V_M es el volumen de la muestra en mL.

ii) Calcular la cantidad de fármaco disuelto al tiempo "t":

$$Di = C_t \cdot V_t + \sum_{t=0}^{t=t} Q_{Mt}$$

Dónde Di es la cantidad de fármaco disuelto al tiempo "t" en mg, C_t es la concentración de la muestra al tiempo "t" en mg/mL, V_t el volumen de medio de disolución al tiempo "t" en mL y $\sum_{t=0}^{t=t} Q_{Mt}$ es la cantidad de fármaco en mg disueltos en el volumen de muestra tomada al tiempo t.

iii) Calcular el porcentaje disuelto:

$$\%Di = (Di/D) * 100$$

Dónde %Di es el porcentaje disuelto, Di es la cantidad disuelta al tiempo "t" en mg y D es la dosis declarada en el marbete del producto en mg.

4.4.3. Validación del método analítico para la cuantificación del activo en FaSSIF-V2.

Los parámetros de regresión para el fármaco y el medicamento (coeficiente de correlación, coeficiente de determinación, ERR) así como el gráfico y la ecuación de la recta fueron obtenidos con el software Statgraphics Centurion XV.

La precisión se evaluó con el coeficiente de variación del factor de respuesta, calculado de la siguiente manera:

$$Fr = A/C ; CV\% = (DE/Media) * 100$$

Dónde Fr es el factor de respuesta, A es el área del pico cromatográfico, C la concentración correspondiente al pico, CV% el porcentaje de coeficiente de variación y DE la desviación estándar.

Para la evaluación de la estabilidad se calculó la diferencia absoluta del promedio del porcentaje recuperado con respecto a la concentración nominal de la siguiente manera:

$$D_{absoluta} = \left| \frac{D_i - D_f}{D_i} \right| * 100$$

Dónde $D_{absoluta}$ es la diferencia absoluta, D_i es el promedio del porcentaje recuperado inicial y D_f es el promedio del porcentaje recuperado final.

Para la influencia del filtro, la diferencia absoluta se calculó de la siguiente manera:

$$D_{absoluta} = \left| \frac{SF - F}{SF} \right| * 100$$

Dónde S es el promedio de la respuesta de 6 muestras sin filtrar y F el promedio de la respuesta de 6 muestras filtradas.

4.4.4. Estudios de disolución.

El establecimiento del modelo de la cinética de disolución así como la comparación de perfiles de disolución por diferentes acercamientos se realizó con el complemento de Excel *DDSolver* (11).

4.4.5. IVIVC

El cálculo de la fracción de fármaco absorbida a cada tiempo se obtuvo mediante el método de deconvolución de Nelson-Wagner a partir de concentraciones plasmáticas reportadas en estudios *in vivo* (4). Los cálculos se realizan de la siguiente manera:

i) Cálculo del AUC_{0-t} por el método de los trapecoides.

$$AUC_{0-t} = \int_{t=0}^{t=t} C_p \cdot dt$$

$$AUC_{0-t} = \frac{Cp_0 + Cp_1}{2} \cdot t_1 + \frac{Cp_1 + Cp_2}{2} (t_2 - t_1) + \frac{Cp_2 + Cp_3}{3} (t_3 - t_2) + \dots +$$

Dónde AUC_{0-t} es el área bajo la curva de $t=0$ a $t=t$, C_p son las concentraciones plasmáticas de fármaco y t es el tiempo.

ii) Cálculo del $AUC_{t-\infty}$

$$AUC_{t-\infty} = \frac{Cp^u}{k_e}$$

Dónde $AUC_{t-\infty}$ es el área bajo la curva del tiempo "t" a infinito, Cp^u la concentración plasmática al último tiempo de muestreo y k_e la constante de eliminación.

iii) Cálculo de $AUC_{0-\infty}$

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + AUC_{t-\infty}$$

iv) Cálculo de la fracción absorbida al tiempo "t".

$$FA = Cp_t + k_e \cdot AUC_{0-t}$$

v) Cálculo del porcentaje de fármaco absorbido al tiempo "t"

$$\%Abs = \frac{FA}{k_e \cdot AUC_{0-\infty}} \cdot 100$$

Los cálculos se realizaron en una hoja electrónica en Microsoft Excel y confirmados con el paquete de IVIVC del software estadístico R; el gráfico de Levy (FA vs %Dis), el ajuste de regresión no lineal y la simulación para el medicamento de prueba se realizaron en Statgraphics Centurion XV.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1. Desarrollo de la cuantificación.

5.1.1. Diseño de experimentos.

Empleando diseño de experimentos, se buscaron las condiciones cromatográficas que minimizaran el tiempo de retención, maximizaran el área y altura del pico obteniendo un factor de simetría cercano a uno. La serie de 8 experimentos se llevó a cabo siguiendo el diseño propuesto en la *tabla 15*, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 19. Respuestas medias para cada condición experimental.

Experimento	Tr (min)	Área (mAUs)	Altura (mAU)	Sym
01	0.987	1267.1	129.1	0.55
02	1.034	1717.7	431.7	0.78
03	0.668	810.9	96.9	0.58
04	0.691	1139.3	367.8	0.82
05	0.986	924.3	95.5	0.57
06	1.039	661.2	161.2	0.75
07	0.663	609.9	74.6	0.52
08	0.688	436.1	141.7	0.84

El impacto de cada factor sobre las respuestas fue determinado mediante un diagrama de Pareto de efectos estandarizados (efecto estimado entre el error estándar), que equivale a calcular el estadístico t para cada efecto. La significancia se evaluó al 95% de confianza.

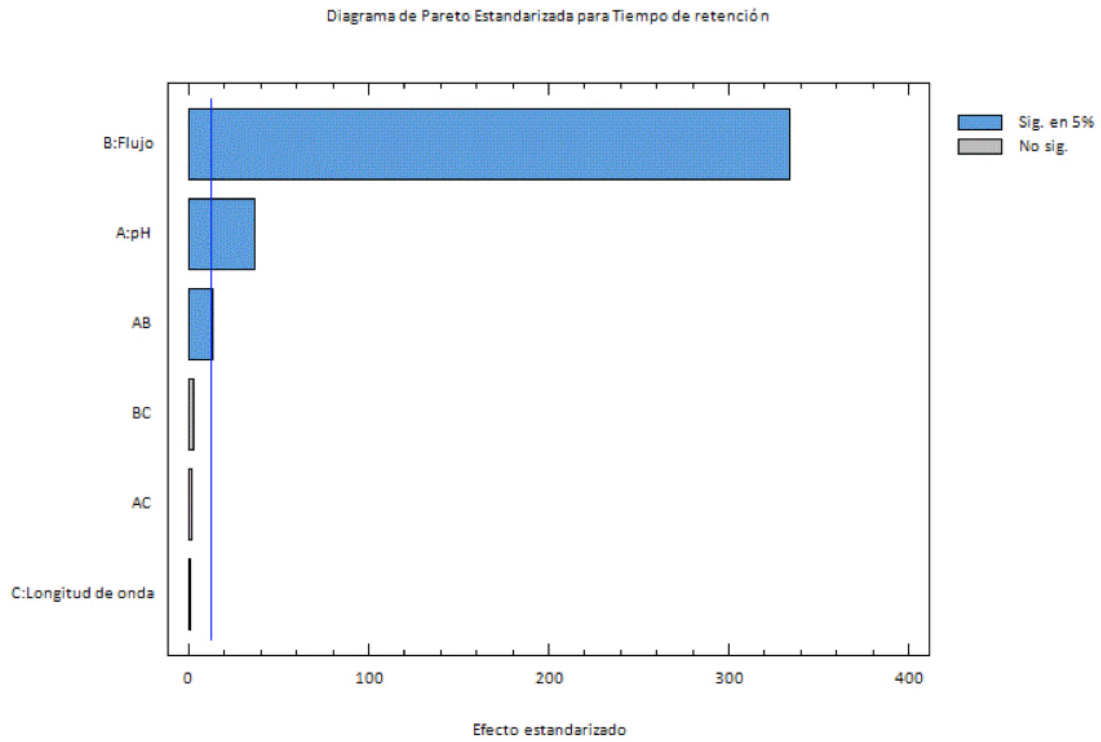


Figura 10. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para T_r

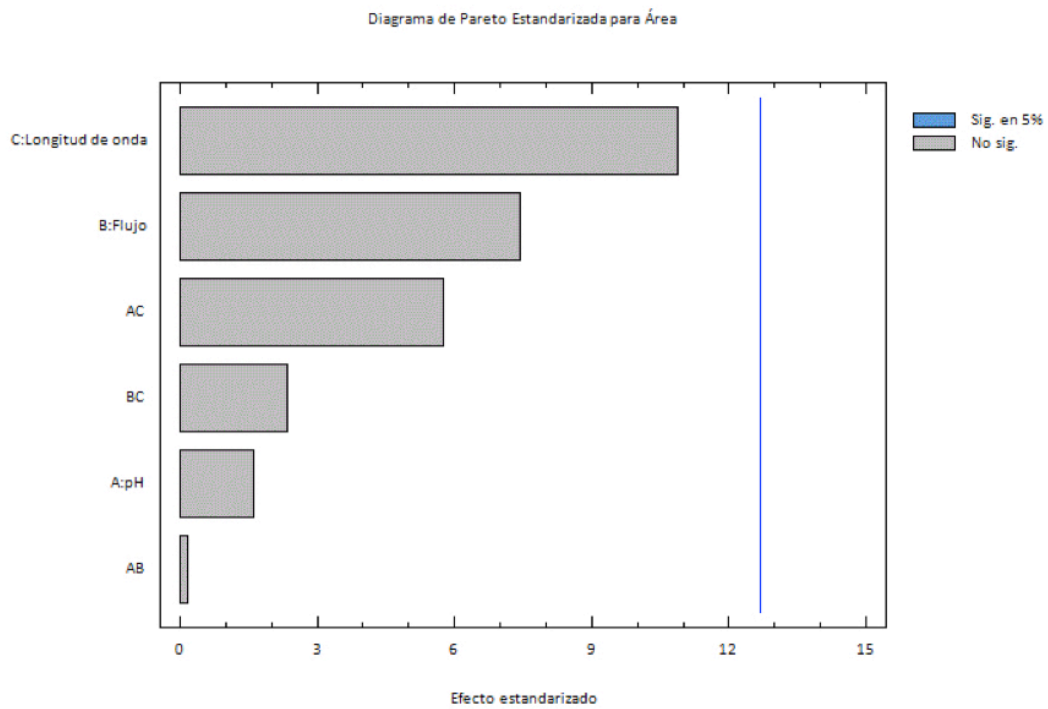


Figura 11. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para Área

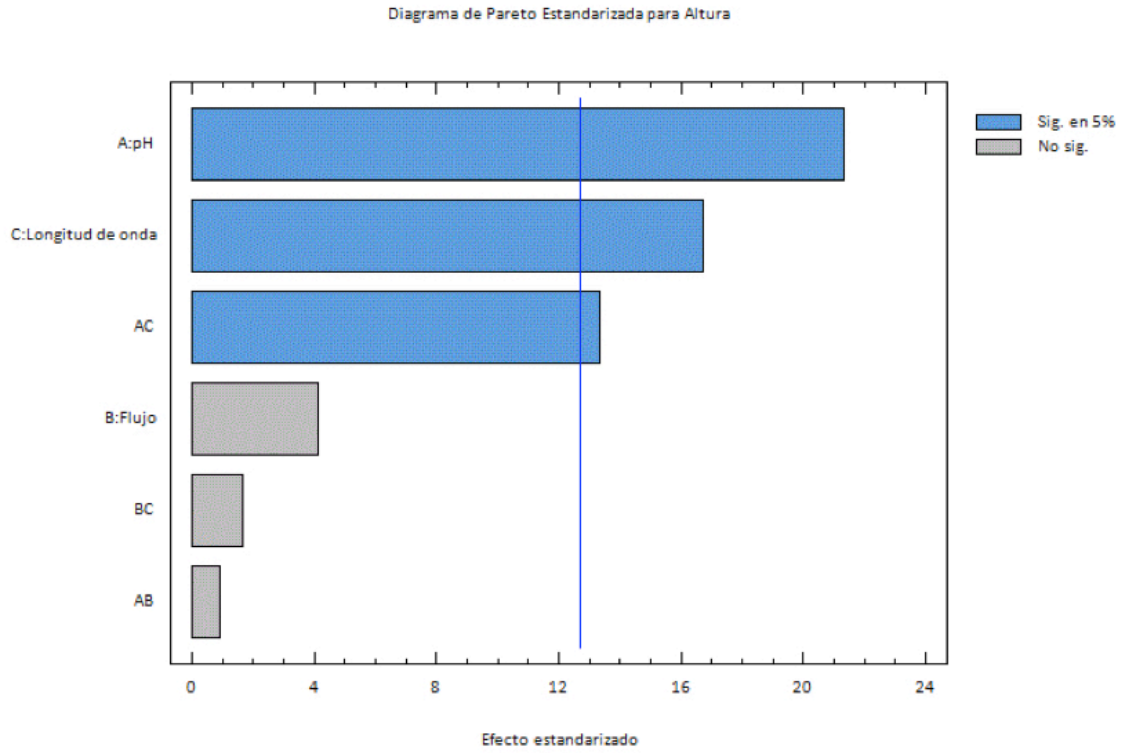


Figura 12. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para Altura.

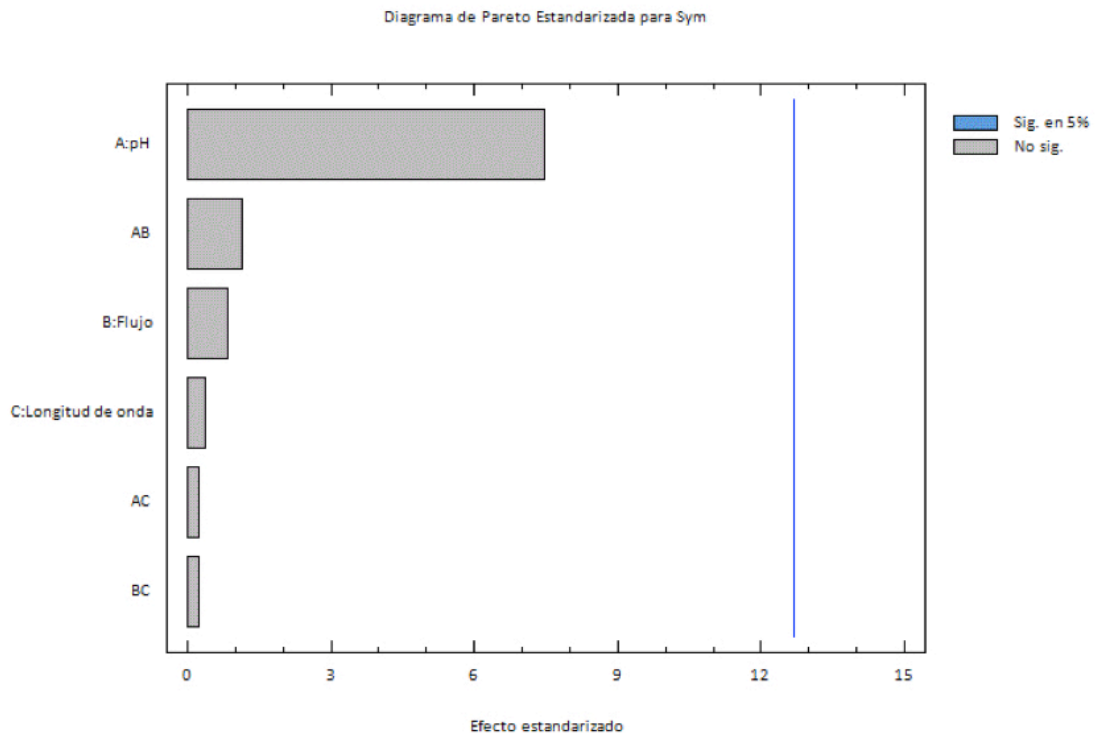


Figura 13. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para Sym

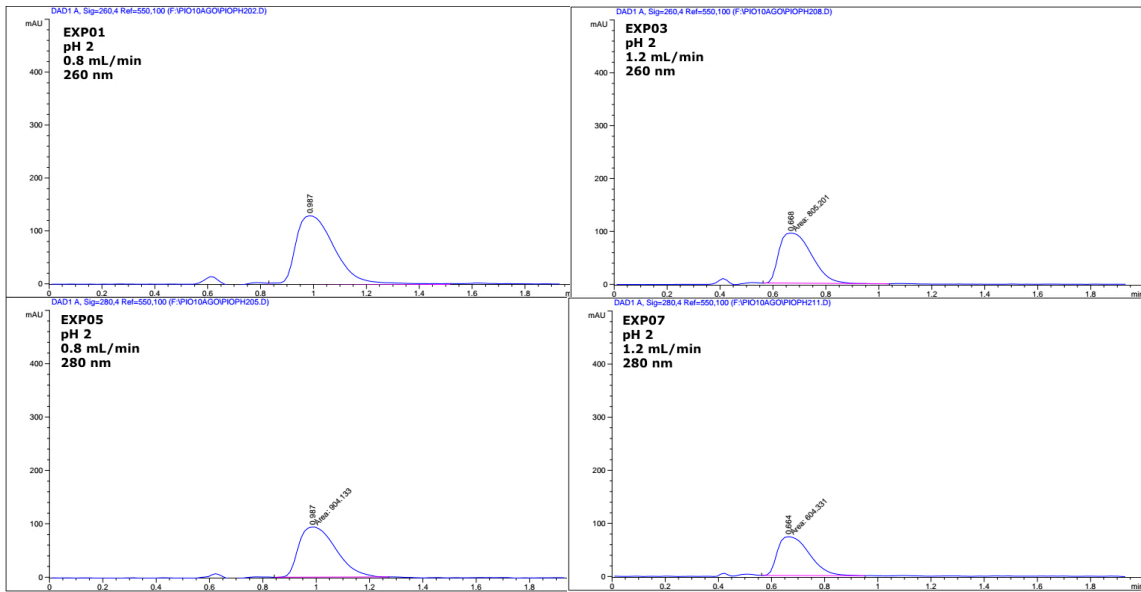


Figura 14. Cromatogramas típicos a pH 2

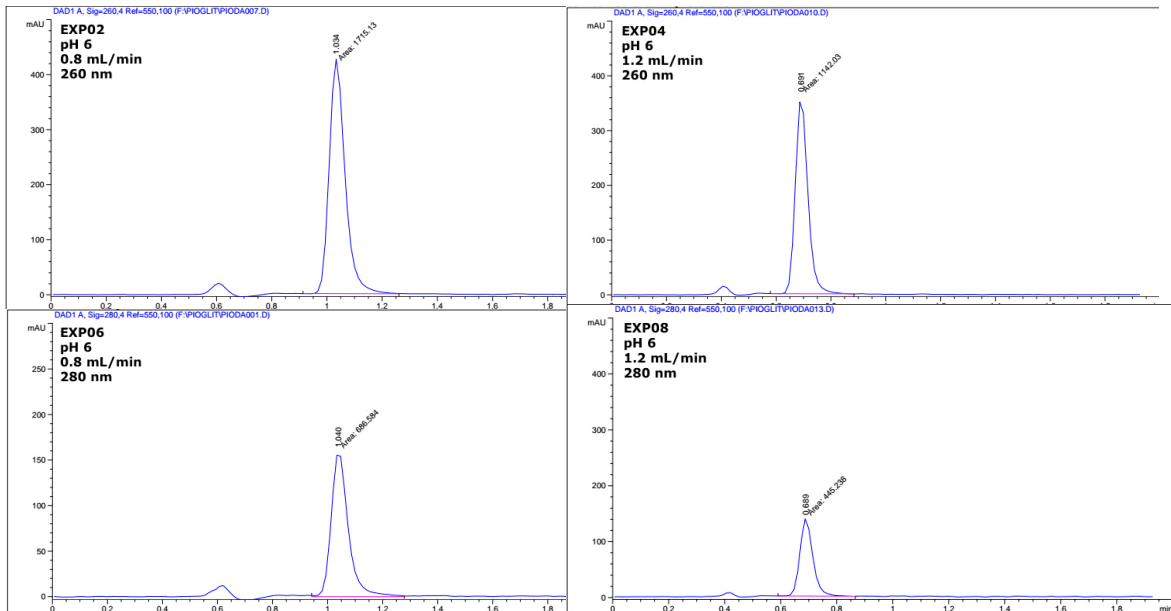


Figura 15. Cromatogramas típicos a pH 6

El análisis del diseño permitió determinar el impacto de los factores sobre las respuestas; para el tiempo de retención, el flujo y el pH tienen un impacto significativo así como la interacción entre ambos: el tiempo de retención se acorta al incrementar el flujo y trabajar a pH ácido; bajo las condiciones de estudio, ningún factor impactó significativamente el área del pico pero las figuras 14 y 15 muestran que a pH 2 la calidad de los mismos es pobre y presentan

ensanchamiento. La altura del pico se ve significativamente comprometida al trabajar a pH 2 y a longitud de onda de 280 nm, encontrándose mejor respuesta a pH 6 y a 260 nm. La simetría no presenta cambios significativos en función de los factores estudiados, sin embargo, visualmente los picos a pH 2 resultan inaceptables.

Previo a la construcción de las líneas de contorno para optimizar el método, se evaluó (a 260 nm, 1.0 mL/min y pH 6.0) la pureza del pico a tres niveles de concentración (2 µg/mL, 20 µg/mL y 200 µg/mL) para valorar la selectividad del método, encontrando que las condiciones propuestas son incapaces de separar al principio activo de los componentes de la matriz.

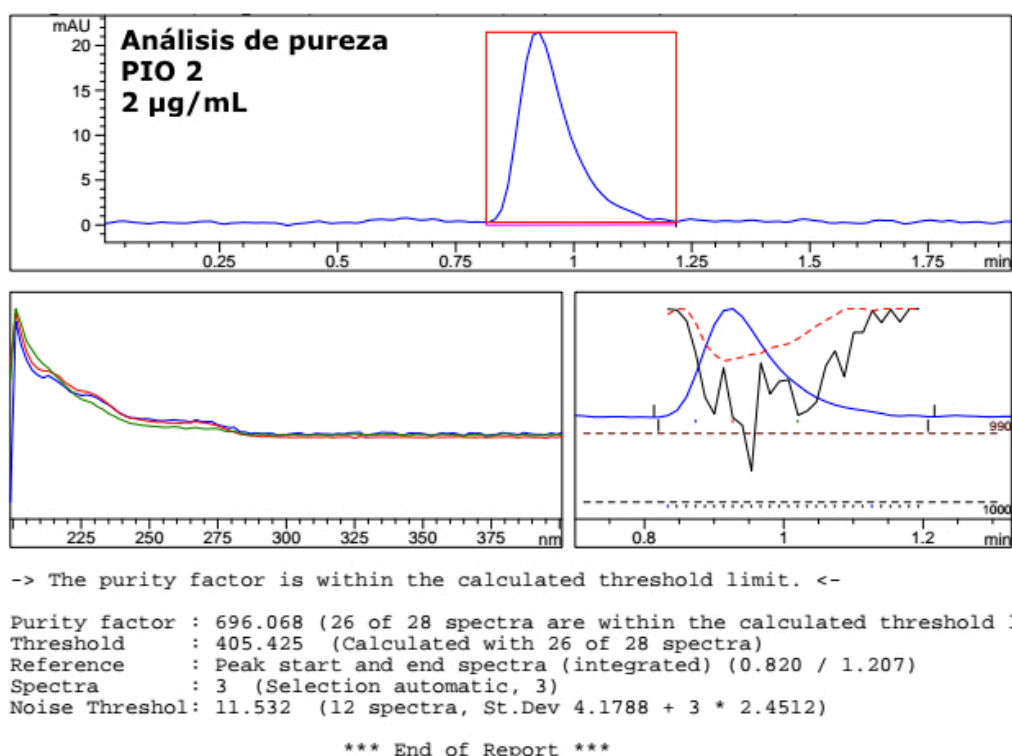


Figura 16. Análisis de pureza del pico de PIO2 (2 µg/mL)

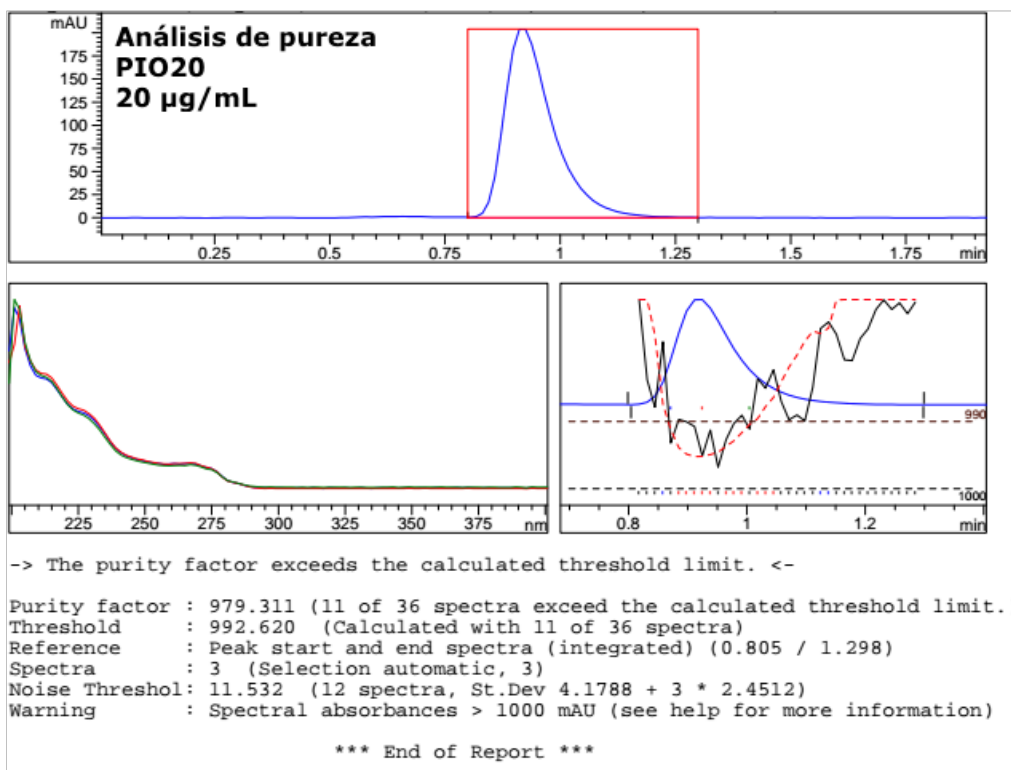


Figura 17. Análisis de pureza del pico de PIO20 (20µg/mL)

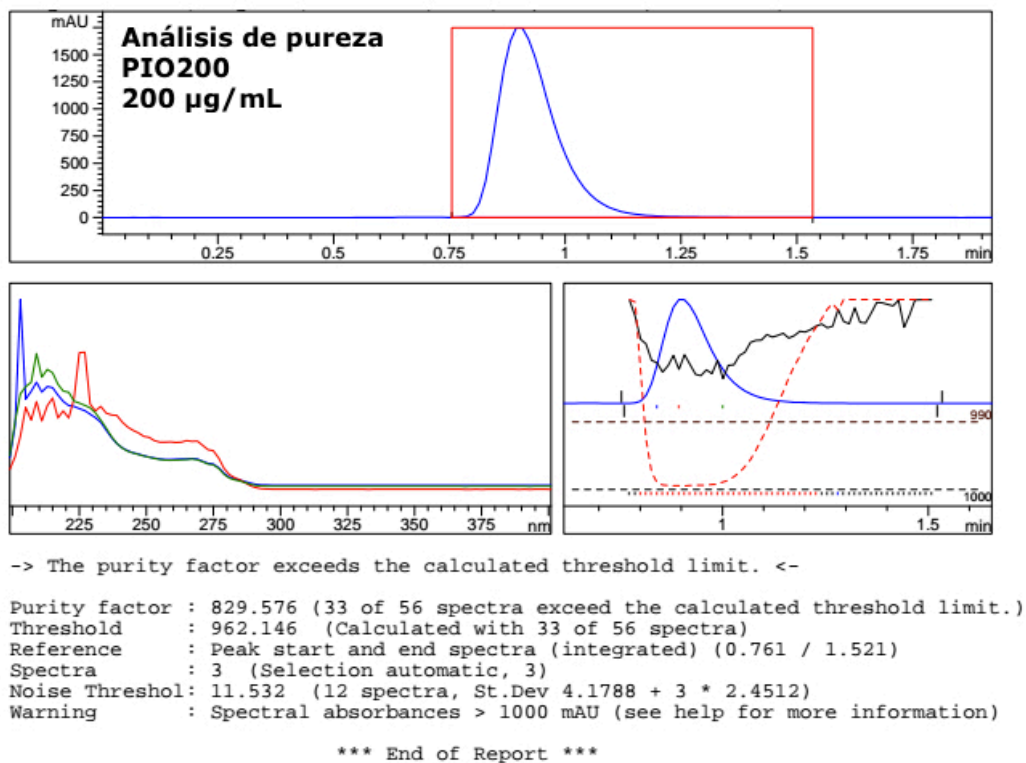


Figura 18. Análisis de pureza del pico de PIO200 (200µg/mL).

Del análisis de pureza se concluye que a concentraciones bajas, el nivel de impurezas presente no impacta en el área del pico del principio activo, sin embargo, al incrementarse la concentración se hace evidente su empalme bajo el pico principal; la estrategia a seguir para separar al API de los componentes que no son de interés fue incrementar la longitud de la columna y disminuir la polaridad de la fase móvil (incrementando la cantidad de MeOH o sustituyéndolo por ACN). No obstante, dicha estrategia rompe con el objetivo del diseño: acortar el tiempo de análisis utilizando una columna de longitud 50 mm, por lo que se decidió realizar la cuantificación empleando la fase móvil y columna sugerida en la monografía del producto en la FEUM.

5.1.2. Cuantificación compendial.

Las condiciones cromatográficas empleadas fueron determinadas con base en las requeridas para la valoración del principio activo. Se seleccionó una columna Symmetry C18 de 150 mm x 4.6 mm y empaque de 5 μ m como FE y ACN:AcONH₄ 0.1M:AcOH (25:25:1) como FM.

El flujo y volumen de inyección fueron modificados para satisfacer los requerimientos del análisis en BRM bajo los siguientes criterios: el flujo compendial se fija con la intención de que el Tr de pioglitazona sea 7 min para establecer la especificación de resolución con respecto a un estándar adicionado de benzofenona, al no incorporarse benzofenona en el análisis, el incremento del flujo a 1.0 mL/min permite disminuir el Tr a 5 min sin presentar interferencias con componentes de la matriz y con una presión del sistema aceptable (\approx 80 bar); el volumen de inyección sugerido en el compendio es de 20 μ L para una concentración de PIO de 45 μ g/mL,

el volumen empleado en un análisis inicial fue de 50 μL pero fue necesario incrementarlo a 80 μL con la finalidad de lograr cuantificar las concentraciones cercanas a la solubilidad el fármaco en FaSSIF-V2 (1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Debido a la presencia de sales biliares y la viscosidad del medio biorrelevante se incorporó una precolumna Phenomenex con un cartucho de C18 (5 μm) para extender la vida útil de la columna analítica, se evaluó su efecto sobre la respuesta sin encontrarse diferencias significativas sobre el pico principal, su uso fue rutinario.

La longitud de onda sugerida (260 nm) fue verificada con un barrido entre 200-400 nm, encontrándose un máximo a dicho punto.

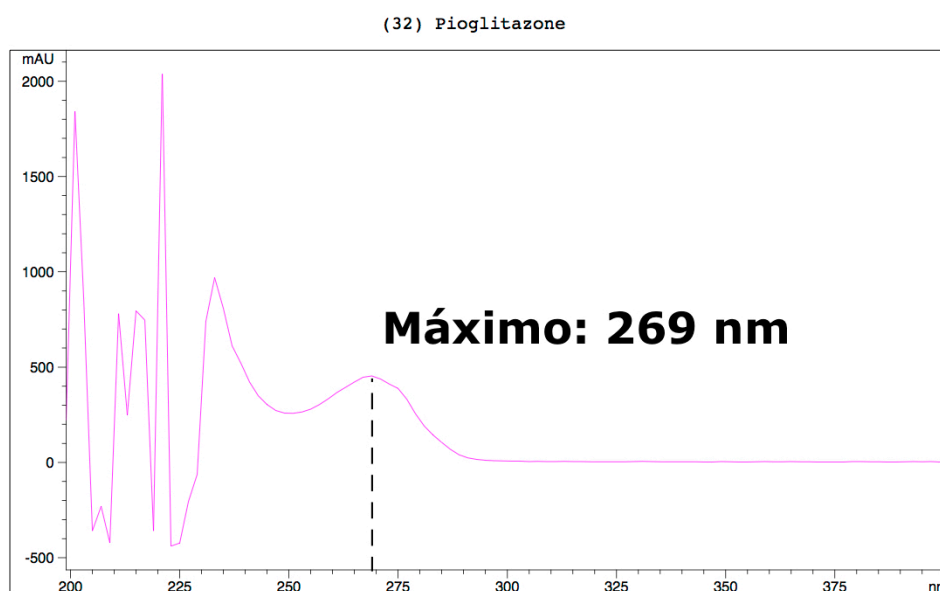


Figura 19: Espectro UV para PIO.

Las condiciones de análisis definitivas se resumen a continuación:

FE: Columna Symmetry C18, 150mm x 4.6 mm; 5 μm

Precolumna: SecurityGuard Phenomenex, C18 (5 μm)

FM: ACN:AcONH₄ 0.1 M:AcOH (25:25:1)

Longitud de onda: 269 nm

Volumen de inyección: 80 µL

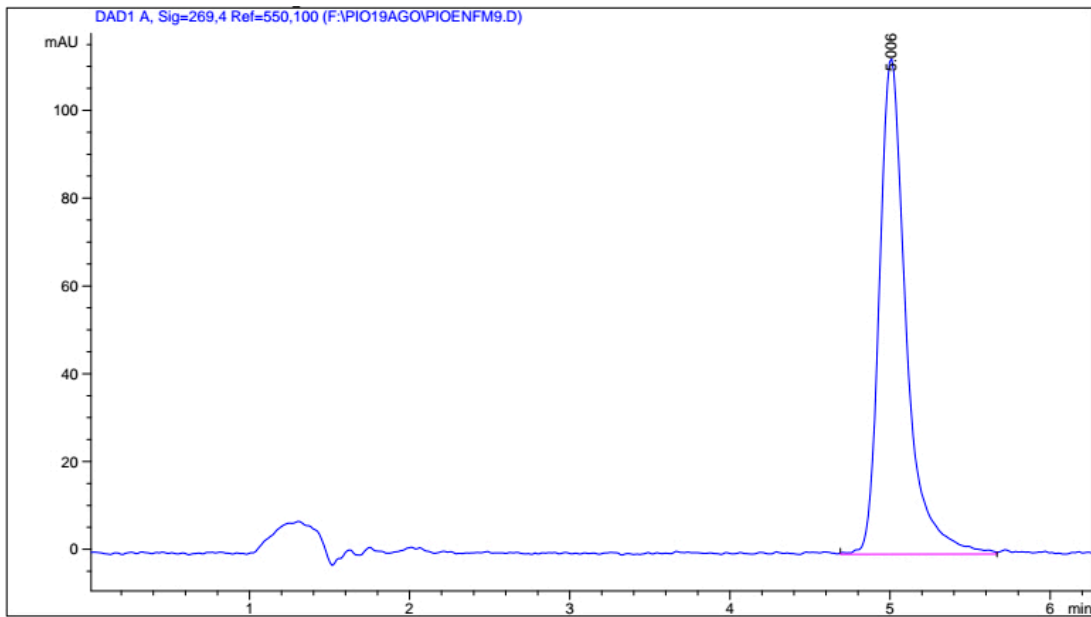


Figura 20: Cromatograma típico, condiciones de análisis finales.

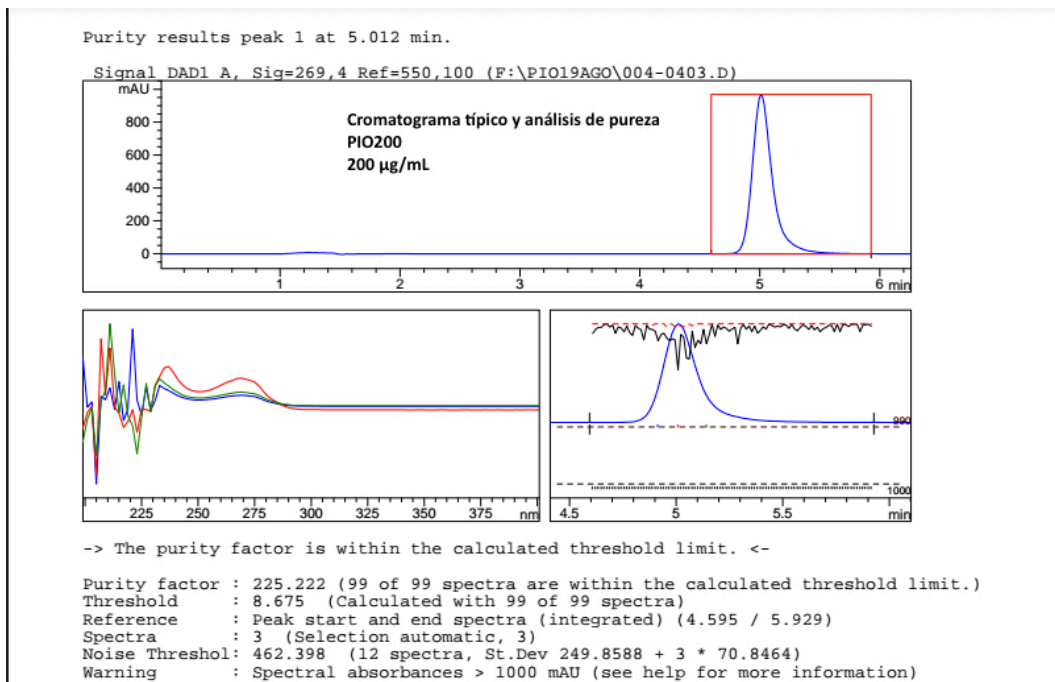


Figura 21. Análisis de pureza del pico de PIO200 (200 µg/mL)

5.2. Desarrollo del método de disolución.

5.2.1. Primer acercamiento: Aparato USP 2

Teniendo como hipótesis que los medios de disolución compendiales sólo consideran el pH fisiológico y pueden subestimar la disolución *in vivo* del API, se eligió el Aparato 2 como primer acercamiento al método de disolución en BRM por su amplia disponibilidad y facilidad de operación. El volumen de medio de disolución se mantuvo constante en 900 mL y la agitación a 100 rpm, en un primer diseño se estudió la disolución aparente de PIO en FaSSGF, FaSSIF-V2, FeSSIF y FeSSIF2X.

Los tiempos de muestreo (0, 5, 10, 15, 25 y 30 min) fueron elegidos teniendo como guía el método sugerido por la FDA(30), añadiendo el tiempo 25 para contar con cinco tiempos de muestreo sin considerar el cero.

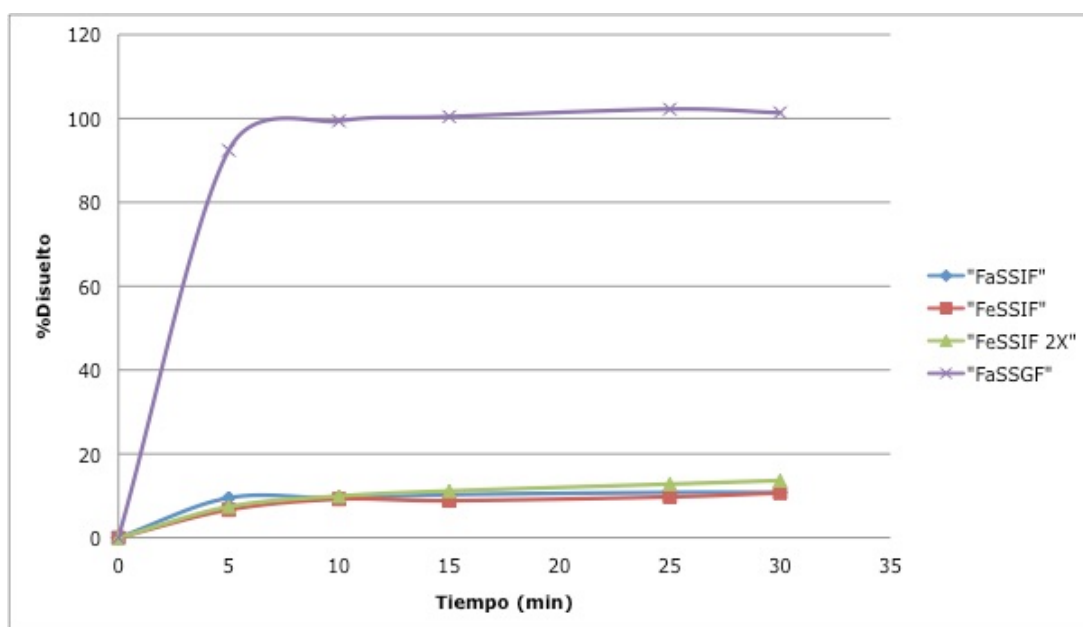


Figura 22. Perfiles de disolución en Aparato 2

De los perfiles de disolución presentados en la figura 22, destaca lo siguiente:

La disolución de PIO en FaSSGF es similar a la disolución en el medio compendial (HCl pH 2) y el 100% disuelto se alcanza antes de los 10 min; este comportamiento no resulta de utilidad ya que ha sido reportado como no correlacionable con el desempeño *in vivo*(4).

El estudio en FaSSIF-V2 alcanzó un porcentaje disuelto máximo de 10.8%, similar al obtenido en FeSSIF (10.7%). La solubilidad (C_s) en FaSSIF se determinó experimentalmente y se obtuvo un valor de 1.67 $\mu\text{g/mL}$, comparable a la reportada en solución acuosa pH 6.5 (1.8 $\mu\text{g/mL}$)(31). De los resultados anteriores, se comprueba que la solubilidad de PIO es altamente dependiente del pH y la saturación se alcanza desde el primer tiempo de muestreo imposibilitando la caracterización de la disolución; como estudio adicional se construyó el perfil de disolución del producto en FeSSIF2X con la finalidad de determinar si las sales biliares y la lecitina presentes en los BRMs logran incrementar la solubilidad de PIO por efecto de la formación de micelas; el porcentaje disuelto máximo obtenido fue 13.6% y, aunque bajo dichas condiciones la solubilidad se vio incrementada, los perfiles de disolución en FaSSIF-V2 y FeSSIF resultaron ser similares por lo que el empleo de FeSSIF2X resultó inconveniente.

A pesar de presentarse una baja disolución del API en FaSSIF-V2, el interés sobre la disolución en condiciones del fluido intestinal persiste ya que es en esta región del TGI dónde se lleva a cabo la absorción del fármaco disuelto y, si la solubilidad del principio activo (una base débil) es altamente dependiente del pH y baja en el intestino, su estudio puede arrojar resultados discriminatorios que permitan explicar cómo productos genéricos desarrollados para tener

una disolución en condiciones farmacopeicas similar a la del producto de referencia han fallado en probar bioequivalencia.

5.2.2. Segundo acercamiento: Aparato USP 3

Dados el desempeño del producto en el Aparato USP 2 y la carencia de Aparato USP 4, la estrategia siguiente fue utilizar el aparato de cilindro recíprocante para evaluar la disolución de PIO en FaSSiF-V2. Las ventajas que ofrece el diseño del aparato incluyen que la agitación es más agresiva y que permite realizar "n" recambios de medio de disolución de manera automática trasladando la forma farmacéutica a un tubo/vaso externo con medio blanco; ésta última ventaja podría ayudar a construir el perfil de disolución evitando alcanzar la saturación del medio.

Teniendo en cuenta la solubilidad del API en FaSSiF-V2 (1.67 µg/mL) y la capacidad de cada vaso/tubo externo (300 mL totales, 250 mL efectivos), se planteó realizar una cantidad de recambios que permitiera alcanzar un 60% disuelto.

Si se considera un volumen de medio de disolución de 250 mL por vaso externo y una concentración máxima esperada (C_s) de 1.67 µg/mL, el realizar 27 recambios permitiría observar un 75.3% disuelto. La agitación se seleccionó a 12 dpm ya que para simular el intestino delgado en ayuno se sugieren agitaciones entre 10-20 dpm (32), la permanencia por vaso se fijó en 5 min para lograr un tiempo de análisis total de 3 h considerando que el tiempo de tránsito por el intestino delgado es 3-4 h (33).

Los experimentos realizados y la información recabada al respecto se presentan a continuación.

I) EXP01

En el primer experimento se detectó que el tamaño de apertura de la malla interna de polipropileno (#40, 420 μm) era demasiado grande para contener las partículas sólidas en el interior de la celda por lo que únicamente se observó la señal de PIO en el cromatograma correspondiente al primer vaso/tubo externo. Se adquirieron mallas de acero inoxidable #400 (37 μm) para valorar su funcionamiento.

II) EXP02

En el segundo experimento, se colocaron mallas de acero inoxidable #400 en las caras interna y externa de la celda del aparato, se identificó que la malla interna retiene las partículas mientras que la malla externa controla la liberación permitiendo la entrada y salida de aire de la celda y el libre flujo de medio de disolución a través de la misma. Se ha reportado que el empleo de mallas externas de apertura pequeña forman una película de líquido por efecto de la tensión superficial (en especial en medios de disolución con tensoactivos) que limita el paso del medio de disolución desde el vaso externo (*Figura 23*) por lo que se sugiere que la malla externa tenga siempre una apertura máxima. Sólo se encontró la señal correspondiente a PIO en el cromatograma del primer tiempo de muestreo.

III) EXP03

En el tercer experimento se colocó la malla de acero inoxidable #400 en la cara interna de la celda y la malla #40 de polipropileno en la cara externa de la misma. El medio de disolución fluyó sin obstrucciones pero se identificó que la altura del volumen de FaSSIF-V2 en el punto más bajo de la inmersión superaba la altura de la tapa

externa de la celda, provocando la pérdida de partículas sólidas por la parte superior, se decidió evaluar el volumen de medio de disolución adecuado.

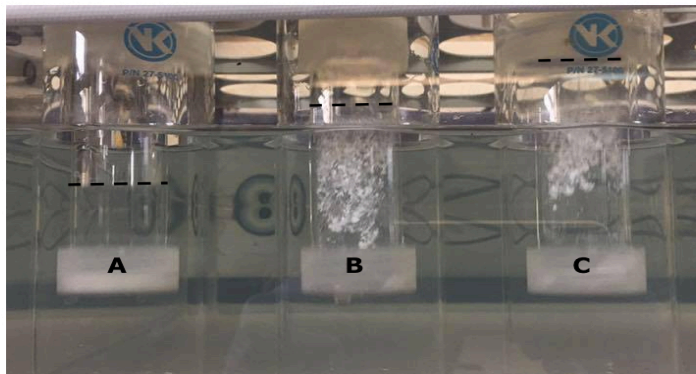


Figura 23. Pruebas en Aparato USP3

Las líneas discontinuas representan el nivel del medio de disolución dentro de la celda durante la operación del aparato. El vaso A ejemplifica la carencia de flujo de medio de disolución al emplear #400 como malla externa; el vaso B muestra el nivel de 150 mL de medio de disolución y el vaso C el nivel de 200 mL de medio de disolución.

En la *Figura 23B* se observa que un volumen de medio de disolución de 150 mL resulta adecuado para no superar la altura de la tapa externa de la celda; a pesar de no rebasar la altura superior, 200 mL de medio de disolución (*Figura 23C*) generan espuma no deseada en el medio de disolución. Con base en los criterios anteriores, se seleccionan 150 mL de medio de disolución por vaso.

IV) EXP04

En el experimento 04, se contemplaron las variables del método de los ensayos anteriores y se procedió a obtener el perfil de disolución considerando que al emplear un menor volumen de medio

de disolución, el número de recambios debía incrementarse a un mínimo de 35.

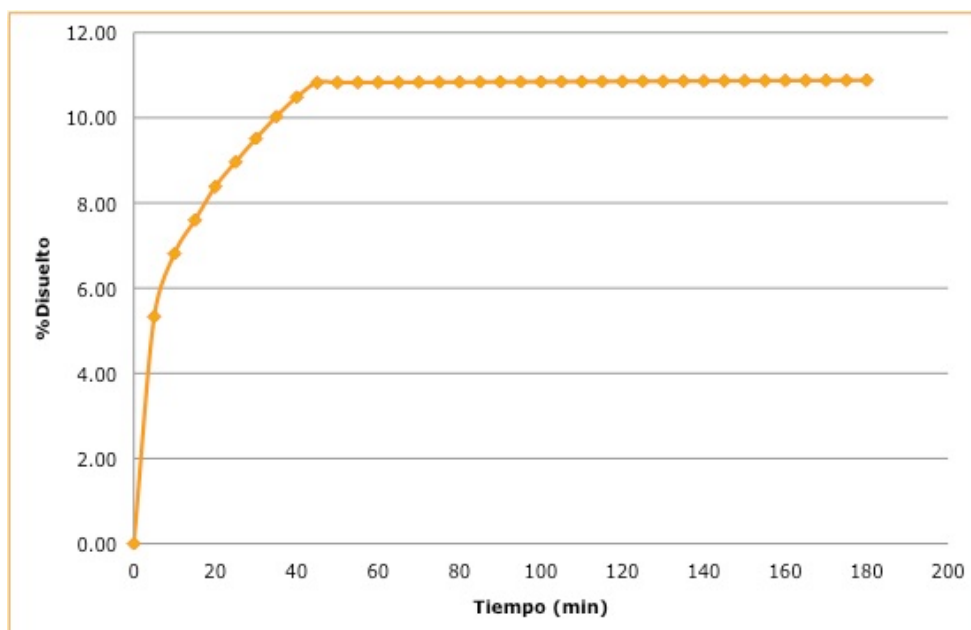


Figura 24. Perfil de disolución para EXP04

Se obtuvo un porcentaje disuelto máximo de 10.88%, contra al 60% esperado. Se debe mencionar que a partir de los 50 min la señal correspondiente a PIO presentó áreas no cuantificables por lo que los tiempos de muestreo subsecuentes se observan como una meseta. Para mitigar la lenta disolución del API no cuantificable a los 5 min, se decidió incrementar progresivamente el tiempo de permanencia de la forma farmacéutica en el medio de disolución para obtener áreas por encima del LOQ_p (la determinación del LOQ y LOQ_p se incluyen en el apartado *Validación del método analítico*). El número de recambios se fijó en 6 al no observarse diferencia en el porcentaje disuelto máximo al incrementarlos.

V) EXP05

En EXP05, se realizaron incrementos progresivos en el tiempo de permanencia de la celda del aparato por vaso hasta fijar como tiempos de muestreo (0, 5, 35, 70, 110, 155 y 205) min. La figura 25

resume el perfil de disolución de EXP05, EXP06 y EXP07. El porcentaje disuelto máximo obtenido fue 13.5%.

VI) EXP06

De forma análoga a los ensayos en Aparato 2, se evaluó el efecto de FeSSIF sobre el porcentaje disuelto máximo del fármaco bajo las condiciones de velocidad de agitación del Aparato 3, obteniendo un porcentaje disuelto máximo de 13.7% similar al obtenido en FaSSIF-V2. Ver *Figura 25*.

VII) EXP07

Para valorar si la intensidad de agitación tiene efecto sobre el porcentaje disuelto máximo obtenido, se fijaron las inmersiones por minuto a 30 (siendo 60 dpm el máximo de operación del equipo y 30 dpm el máximo de operación sin formar espuma o burbujas no deseadas en el medio de disolución). El porcentaje disuelto máximo obtenido bajo estas condiciones fue 18.1%.

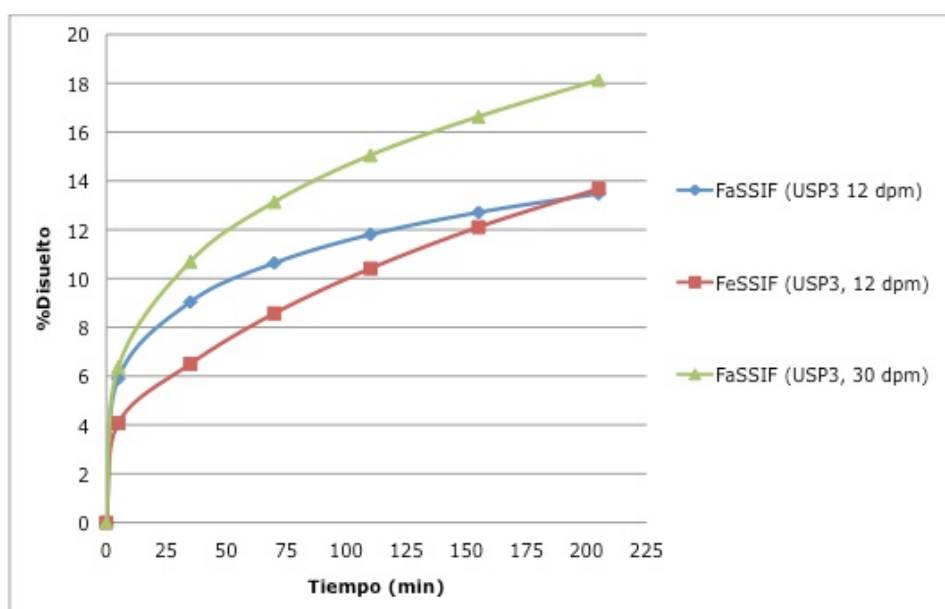


Figura 25. Perfil de disolución de EXP05, EXP06, EXP07.

En la *figura 25* se presentan los perfiles de disolución para las condiciones experimentales mencionadas y es resaltable que al incrementar la intensidad de agitación del sistema, la curva de disolución en FaSSIF-V2 a 30 dpm es similar a aquella en FeSSIF a 12 dpm, demostrando que el incremento en la agitación resulta en una mayor disolución del principio activo sin tendencia a saturación durante el tiempo de análisis; de los experimentos realizados se seleccionaron las siguientes condiciones para el método de disolución final:

Medio de disolución: FaSSIF-V2

Volumen de medio de disolución: 150 mL/vaso (900 mL total)

Número de recambios: 6 por unidad de dosificación

Tiempo de permanencia por vaso: variable (5, 30, 35, 40, 45, 50) min.

Malla interna: #400

Malla externa: #40

Agitación: 30 dpm

Tiempo de drenado de la celda: 0.5 min.

Temperatura del baño: 37.3 °C

5.2.3. Estudio de pérdida y remanente.

Resulta en este punto crucial determinar si el porcentaje disuelto del API observado en FaSSIF-V2 se relaciona con la baja solubilidad en dicho medio o con el hecho de que el principio activo micronizado presenta partículas menores a 37 μm (apertura de la malla interna) que potencialmente se rezagan en el primer vaso y limitan el porcentaje disuelto máximo observable. El criterio para valorar el impacto de las partículas sólidas rezagadas fue que la suma

de la cantidad de PIO disuelta en el medio de disolución y la cantidad de PIO remanente en la celda del aparato correspondiera a un mínimo de 60%.

Tabla 20. Estudio de pérdida y remanente de PIO

	Area (mAUs)	C (µg/mL)	C (mg/mL)	Vol. (mL)	Cant. (mg)	%Dosis
Blanco	0	0	0	150	0	0
Disuelto	812.623	10.95	0.011	150	1.64	10.9
Perdido	1999.377	26.93	0.027	200	5.39	35.9
Remanente	3426.22	46.15	0.046	200	9.23	61.5
				TOTAL	16.26	108.4

La *Tabla 19* resume los resultados del estudio y se comprueba que la cantidad de PIO que se pierde debido a la apertura de la malla es únicamente de 35.6 %, por lo que los bajos porcentajes disueltos en el perfil de disolución se deben a la baja solubilidad del API y no a que las partículas no disueltas no permanecieron en la celda.

5.3. Validación del método analítico definido en el desarrollo (*Pág. 61*).

5.3.1. Validación con el fármaco.

5.3.1.1. Linealidad, exactitud y precisión.

Los cromatogramas típicos para cada nivel de concentración se presentan en el Anexo A, los resultados para los parámetros de linealidad y precisión se reportan a continuación.

Tabla 21. Linealidad, exactitud y precisión con el fármaco

DÍA	01-feb			02-feb			Precisión interdía		
N	Conc ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Área (mAUs)	Fr (A/C)	Conc ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Área (mAUs)	Fr (A/C)	MEDIA	DE	CV%
0	0	0		0	0				
1	1.02	71.81	70.40	1.02	71.74	70.33	71.61	0.656	0.9
	1.01	70.97	70.26	1.01	72.83	72.11			
	1.00	72.54	72.54	1.00	71.91	71.91			
2	2.04	144.76	70.96	2.04	144.90	71.03	144.08	0.921	0.6
	2.02	142.65	70.62	2.02	143.51	71.04			
	2.00	144.88	72.44	2.00	143.75	71.88			
3	4.08	288.21	70.64	4.08	287.21	70.40	287.34	0.522	0.2
	4.04	286.72	70.97	4.04	287.29	71.11			
	4.00	287.63	71.91	4.00	287.01	71.75			
4	6.12	432.03	70.59	6.12	433.36	70.81	432.83	1.134	0.3
	6.06	431.66	71.23	6.06	434.81	71.75			
	6.00	432.74	72.12	6.00	432.36	72.06			
5	10.20	726.28	71.20	10.20	719.90	70.58	722.43	2.451	0.3
	10.10	719.48	71.24	10.10	720.95	71.38			
	10.00	721.55	72.15	10.00	720.97	72.10			
		Media	71.29		Media	71.35			
		DE	0.76		DE	0.63			
		CV%	1.07		CV%	0.89			

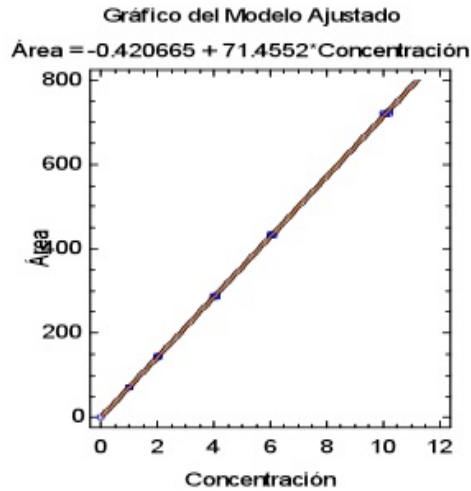


Figura 26. Curva de calibración con el fármaco: regresión simple, Área vs Concentración ($\mu\text{g/mL}$).

Tabla 22. Coeficientes para la calibración con el fármaco

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	-0.420665	0.996121	-0.422303	0.6759
Pendiente	71.4552	0.178909	399.395	0

Coefficiente de correlación: 0.9999

R^2 : 99.98%

R^2 ajustado para grados de libertad: 99.98%

Error estándar del estimado: 3.27

Área promedio: 310.82 mAU

ERR: 1.052 %

S_{b0} :0.996

5.3.1.2. Determinación de LOQ y LOQ_p

El LOQ se calculó mediante el error estándar del intercepto con la siguiente ecuación:

$$LOQ = \frac{10 * S_{b0}}{m}$$

Dónde LOQ es el límite de cuantificación, S_{b0} la desviación estándar del intercepto y m la pendiente de la recta.

El LOQ calculado es 0.14 µg/mL, sin embargo las limitaciones de sensibilidad del instrumento empleado obligan a determinar un LOQ_p empleando como herramienta la relación señal ruido (S/N: *signal/noise*) y estableciendo como especificación una S/N mínima de 10, que corresponde a la concentración del nivel más bajo de la curva de calibración.

5.3.1.3. Estabilidad analítica.

La estabilidad se evaluó con base en los reportes de estabilidad en solución acuosa de PIO (8 días a 4°C), la diferencia absoluta entre el promedio del porcentaje recuperado en fresco (día 1) y en el día 8 es 1.2%. La muestra (7 µg/mL, pH 5.8) es estable al menos 8 días en refrigeración (4°C) y protegida de la luz. Los resultados se muestran en la *Tabla 22*.

Tabla 23. Estabilidad de la muestra a 4°C

	Día 1 (01/FEB/17)		Día 8 (08/FEB/17)	
	Área (mAU)	%Recobro	Área (mAU)	%Recobro
EstabA	301.07	95.70	306.54	97.44
EstabB	301.05	95.69	303.32	96.41
EstabC	293.50	93.30	296.60	94.28
	PROMEDIO	94.90	PROMEDIO	96.04

5.3.1.4. Influencia del filtro

Los resultados de la prueba de influencia del filtro se reportan en la *Tabla 24* y se encuentra una diferencia absoluta de 1.7% entre el promedio del porcentaje recuperado de las muestras filtradas y sin filtrar.

Tabla 24. Influencia del filtro.

		Área (mAUs)	Conc (µg/mL)	C_{nominal} (µg/mL)	%Reco bro
Muestras filtradas	F1	592.36017	7.52	7.00	107.5
	F2	592.37054	7.52	7.00	107.5
	F3	593.85382	7.54	7.00	107.8
	F4	598.83228	7.61	7.00	108.7
	F5	591.88165	7.52	7.00	107.4
	F6	592.72162	7.53	7.00	107.6
Muestras sin filtrar				PROMEDIO	107.7
	SF1	578.70892	7.35	7.00	105.0
	SF2	599.51337	7.61	7.00	108.8
	SF3	581.81976	7.39	7.00	105.6
	SF4	575.50049	7.31	7.00	104.4
	SF5	581.66437	7.39	7.00	105.5
	SF6	586.73627	7.45	7.00	106.5
				PROMEDIO	106.0

5.3.2. Validación con el medicamento.

5.3.2.1. Linealidad, exactitud y precisión

Los cromatogramas típicos para cada nivel de concentración se presentan en el Anexo B, los resultados de linealidad, exactitud y precisión se reportan a continuación.

Tabla 25. Linealidad, exactitud y precisión con el medicamento.

Nivel	Conc (µg/mL)	Área (mAUs)	Conc exp (µg/mL)	%Recobro
0	0	0	NA	NA
1	1.00	67.18266	0.98	97.7
	1.00	67.33073	0.98	97.9
	0.99	67.0264	0.98	98.9
2	2.00	145.0641	1.97	98.6
	2.00	144.56294	1.97	98.3
	1.97	145.5087	1.98	100.3
3	4.00	309.59836	4.08	101.9
	4.00	302.224	3.99	99.6
	3.95	306.74866	4.04	102.4
4	6.01	457.63577	5.98	99.5
	6.01	457.26718	5.97	99.4
	5.92	457.17065	5.97	100.8
5	10.01	771.00647	9.99	99.8
	10.01	762.0401	9.87	98.6
	9.87	772.27679	10.00	101.3

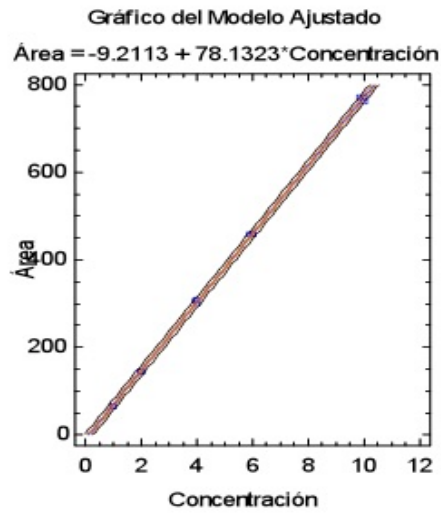


Figura 27. Curva de calibración con el medicamento: regresión simple. Área vs Concentración ($\mu\text{g/mL}$).

Tabla 26. Coeficientes para la calibración con el medicamento

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	-9.2113	2.4171	-3.8108	0.0022
Pendiente	78.1323	0.43294	180.469	0

Coefficiente de correlación: 0.9998

R^2 : 99.96%

R^2 ajustado para grados de libertad: 99.96%

Error estándar del estimado: 5.35

Área promedio: 348.84 mAUs

ERR: 1.53 %

El porcentaje de recuperación no varía en más de 3.0% (97.0%-103.0%) del valor nominal y el %CV de los datos de exactitud del método es 1.44%.

5.3.2.2. Especificidad.

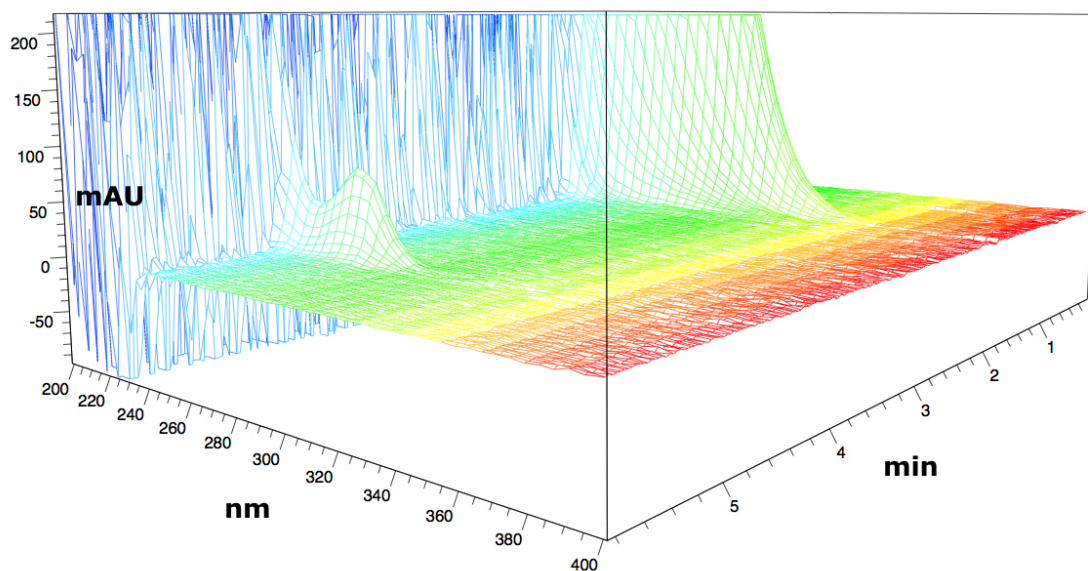


Figura 28. Espectro 3D para PIO a partir de muestras de disolución en FaSSIF-V2.

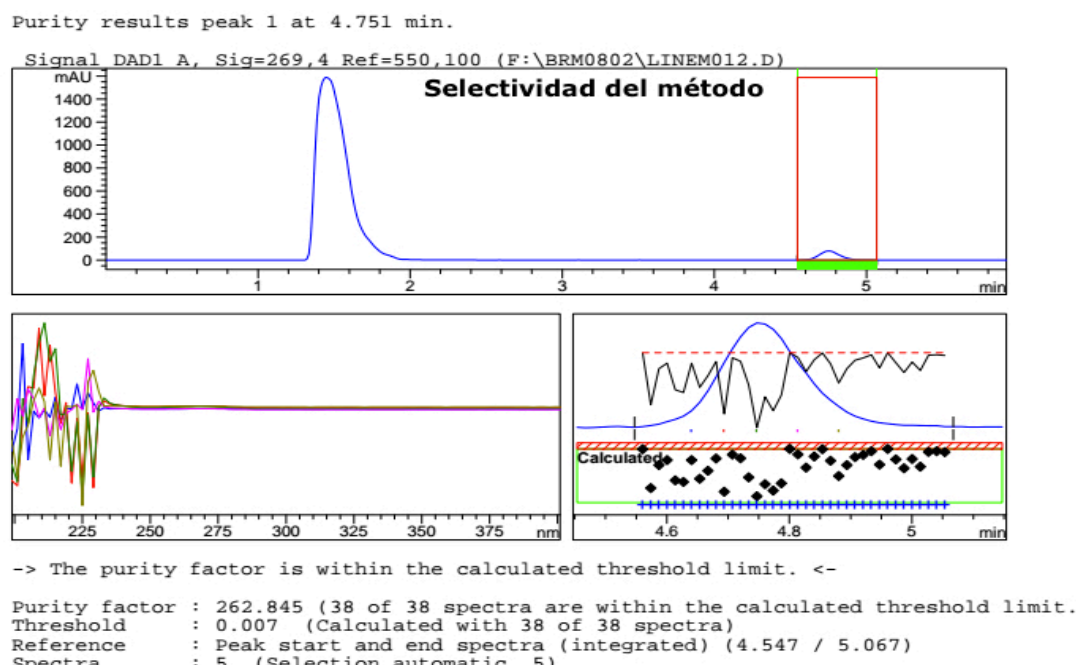


Figura 29. Análisis de pureza del pico de PIO en muestras de disolución en FaSSIF-V2.

Tabla 27. Resumen de validación.

Validación con el fármaco			
Parámetro	Especificación	Resultado	Dictamen
Linealidad	$r \geq 0.99$	R=0.9999	Cumple
	$ERR \leq 2.0\%$	1.05%	Cumple
Precisión	$\%CV_{Fr} \leq 2.0\%$	1.07%	Cumple
Estabilidad	$D_{abs} \leq 3.0\%$	1.2%; 8 días a 4°C	Cumple
Influencia del filtro	$D_{abs} \leq 2.0\%$	1.70%	Cumple
Validación con el medicamento			
Linealidad	$r \geq 0.99$	R=0.9998	Cumple
	$ERR \leq 3.0\%$	1.53%	Cumple
Exactitud	% Recobro 97%-103%	97.7%-102.4%	Cumple
Precisión	$\%CV_{\%Recobro} \leq 3.0\%$	1.44%	Cumple
Especificidad	Sin interferencias de componentes de la muestra	Sin interferencias	Cumple

5.4. Estudios de disolución.

Se construyeron los perfiles de disolución para el medicamento de referencia y el medicamento de prueba bajo las condiciones de análisis determinadas en el desarrollo del método de disolución. La curva de calibración se preparó cada vez que se analizaron las muestras.

5.4.1. Perfiles de disolución

El perfil de disolución medio (n=6) para el medicamento de referencia (Zactos®) y el medicamento de prueba (Serral) se presenta a continuación.

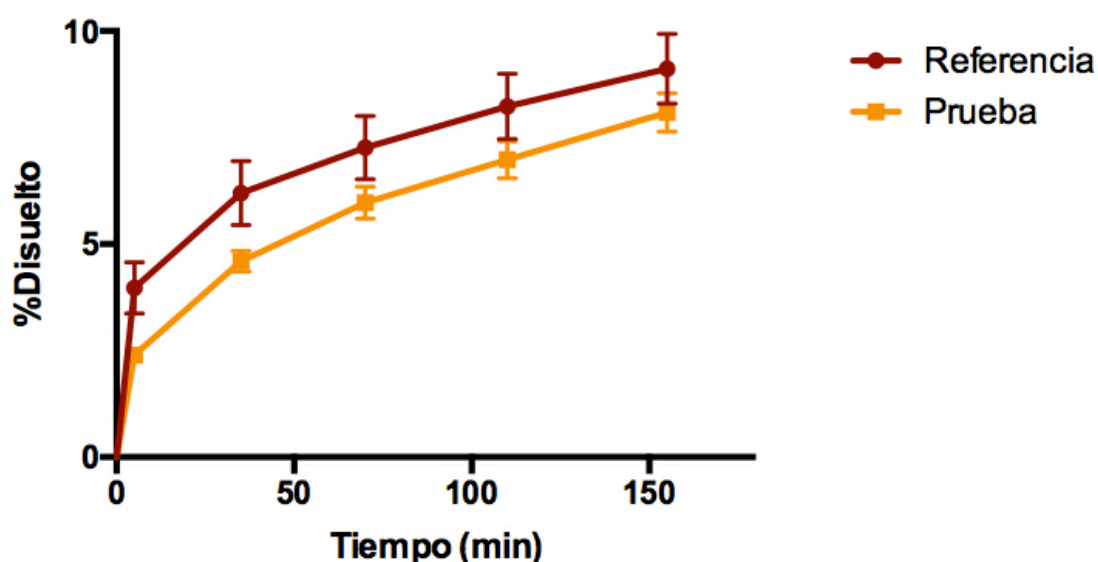


Figura 30. Perfiles de disolución medios (con error estándar de la media) para el producto de prueba y el producto de referencia en FaSSIF-V2.

5.4.2. Modelaje matemático.

De acuerdo con la tabla 28, tanto el modelo Weibull como el Korsmeyer-Peppas presentan un adecuado ajuste a los datos experimentales. Los parámetros comparativos y que caracterizan el modelo se resumen en las tablas 28 y 29.

Tabla 28. Parámetros comparativos. Selección del modelo.

Medicamento de referencia		
	Weibull	Korsmeyer-Peppas
R ²	0.9862	0.9867
AIC	-4.98	-5.29
SSE	0.268	0.265
Medicamento de prueba		
R ²	0.9942	0.9965
AIC	-9.76	-11.78
SSE	0.1565	0.0668

Tabla 29. Modelo matemático y parámetros.

Medicamento de referencia				
	Weibull		Korsmeyer-Peppas	
Ecuación	$%D_i = 100 * \{1 - \text{Exp}[-(t^\beta)/a]\}$		$%D_i = k_{KP} * t^n$	
Parámetros	α	42.39	k _{KP}	2.66
	β	0.26	n	0.252
Medicamento de prueba				
	Weibull		Korsmeyer-Peppas	
Ecuación	$%D_i = 100 * \{1 - \text{Exp}[-(t^\beta)/a]\}$		$%D_i = k_{KP} * t^n$	
Parámetros	α	82.55	k _{KP}	1.284
	β	0.378	n	0.362

El modelo seleccionado fue Korsmeyer-Peppas debido a su bondad de ajuste y simplicidad; además de que Weibull es un modelo empírico que representa la forma de la curva y la dependencia del tiempo pero no caracteriza el mecanismo de liberación. Se debe recordar, sin embargo, que aunque el parámetro "n" del modelo de Korsmeyer-Peppas permite identificar el mecanismo de liberación del fármaco, es requisito alcanzar un 60% disuelto máximo para su aplicación, por lo que el modelo fue empleado para describir matemáticamente la disolución en el intervalo de tiempo estudiado y no para caracterizar el sistema en su totalidad.

5.4.3. Comparación de perfiles de disolución

La comparación de perfiles de disolución se realizó mediante dos acercamientos: región de confianza multivariada y comparación modelo dependiente; el criterio de aceptación (similitud) establece que el límite superior del IC₉₀ debe ser menor o igual que el límite de similitud (MáxMSD). Los resultados de la comparación se resumen en la tabla 30.

Tabla 30. Comparación de perfiles de disolución

Acercamiento	Criterio	Resultado	Similitud
Región de confianza multivariada	Límite superior IC ₉₀ ≤ MáxMSD	Límite superior: 9.997 MáxMSD: 18.4	Sí
Modelo dependiente		Límite superior: 4.62 MáxMSD: 11.8	Sí

Con ambos acercamientos, los perfiles de disolución se consideran similares, comportamiento esperado en un estudio biorrelevante de un producto genérico que ha demostrado BE.

La similitud del producto de referencia y el producto genérico en términos de perfiles de disolución no prueba si el método tiene poder predictivo o discriminatorio, y a falta de una muestra de bioequivalencia probada para someterla al estudio, se evaluó si los resultados de disolución *in vitro* se correlacionan con los obtenidos de estudios *in vivo* reportados en la literatura (4). Los resultados de dicho análisis se describen en el apartado siguiente

5.5. IVIVC

Con los datos de Cp experimentales reportados (4), se obtuvo la fracción absorbida a cada tiempo mediante el método de Nelson-Wagner. Los valores observados y los valores predichos se muestran en las tablas 31 y 32.

Tabla 31. Valores observados para el producto de referencia.

Tiempo (h)	Cp Obs (µg/mL)	AUC _{0-t}	FA Obs	FA Obs (%)	%Dis (FRD)	AUC _{0-∞} Obs
0	0	0	0	0	0	15.96
0.25	0.200	0.03	0.05	5.00	5.13	AUC_{0-t} Obs
0.5	0.312	0.06	0.13	13.08	6.07	1.64
1	0.534	0.21	0.25	24.95	7.44	C_{max} Obs
1.5	0.836	0.34	0.45	45.45	8.24	1.117
2	1.026	0.47	0.71	71.18	8.86	
2.5	1.117	0.54	1.00	100.00	9.38	

Tabla 32. Valores predichos para el producto de referencia.

Tiempo (h)	Cp Pred (µg/mL)	AUC _{0-t}	FA pred	FA Pred (%)	%Dis (FRD)	AUC _{0-∞} Pred
0	0	0	0	0	0	16.69
0.25	0.287	0.03	0.06	6.01	5.13	AUC_{0-t} Pred
0.5	0.449	0.09	0.10	9.75	6.07	2.37
1	0.763	0.30	0.23	22.83	7.44	C_{max} Pred
1.5	1.201	0.49	0.41	40.62	8.24	1.63
2	1.485	0.67	0.66	66.12	8.86	
2.5	1.632	0.78	1.02	102.2	9.38	

Tabla 33. Error de la predicción.

Parámetro	Observado	Predicho	Error (%)
AUC _{0-∞}	15.96	16.69	4.56
AUC _{0-t}	1.64	2.37	48.32
C _{max}	1.1200	1.63	46.10

Cálculo de AUC_{t-∞} con datos farmacocinéticos reportados (4).

$$k_e = 0.078 \text{ h}^{-1}$$

$$C_p \text{ última: } 1.117 \text{ µg/mL}$$

$$AUC_{t-\infty} = C_p \text{ última} / k_e = (1.117 \text{ µg/mL}) / (0.078 \text{ h}^{-1}) = 14.32 \text{ µg mL}^{-1} \text{ h}$$

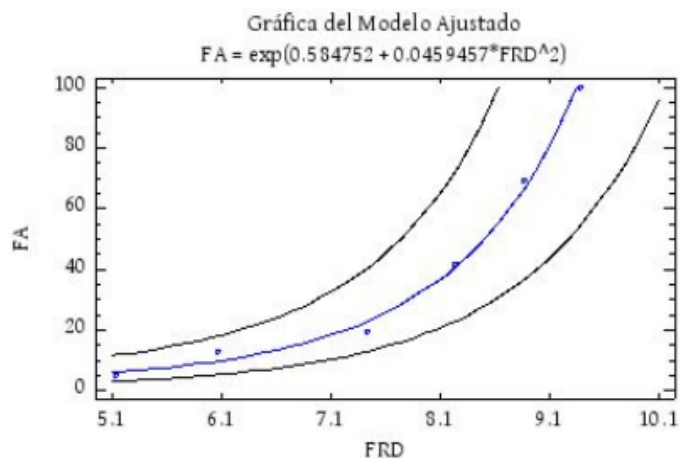


Figura 31. Modelo de correlación no lineal in vitro in vivo.

Tabla 34. Predicción del desempeño in vivo con el modelo de IVIVC para el medicamento de prueba (Serral).

Tiempo (h)	%Dis (FRD)	%FA Pred	FA Pred	Cp Pred	AUC _{0-t} Pred	AUC _{0-t} Pred	AUC _{0-t} Obs	Error (%)
0	0	0						
0.25	1.9	2.12	0.02	0.24	0.03	1.98	1.64	20.47
0.5	4.2	4.04	0.04	0.34	0.07			
1	6.0	7.22	0.07	0.29	0.23			
						AUC_{0-∞} Pred	AUC_{0-∞} Obs	Error (%)
1.5	7.0	13.31	0.13	0.92	0.37	16.29	15.96	2.1
2	8.0	25.58	0.26	1.22	0.54			
2.5	9.0	58.35	0.58	1.71	0.73	C_{max} Pred	C_{max} Obs	Error (%)
						1.71	1.12	52.96

En la búsqueda de un método de disolución predictivo, se encontró una correlación matemática no lineal entre el porcentaje disuelto *in vitro* (%Dis, FRD) con modelo LogY-X² con ecuación: $FA = \text{EXP}(0.5847 + 0.046\text{FRD}^2)$ que presenta una R de 0.9883 y un error estándar del estimado de 0.19. En la tabla 32 se resumen los resultados de la predicción de los parámetros farmacocinéticos del producto de referencia con el uso del modelo y en la tabla 33 se presenta el error expresado como porcentaje con respecto a los valores experimentales y se evidencia que para el AUC_{0-t} y C_{max} el error resulta inadecuado (mayor a 15%)(34). En la predicción de los parámetros farmacocinéticos del producto de prueba mediante el modelo (tabla 34) y obteniendo el error con respecto a los valores reales observados para el medicamento de referencia, se encuentran resultados similares.

Existe entonces un modelo matemático no lineal que describe la relación entre el porcentaje disuelto *in vitro* y la fracción absorbida *in vivo* de productos con pioglitazona, tendencia que sugiere un carácter predictivo. La no obtención de una correlación punto a punto lineal y el elevado error en la predicción pueden deberse a factores tanto de la fisicoquímica del fármaco, limitaciones del método y consideraciones fisiológicas.

Por una parte, la solubilidad de PIO resulta ser altamente dependiente del pH, sin encontrar un incremento significativo en la misma al emplear FaSSIF-V2 en el estudio, lo cual implica la obtención de menores velocidades de disolución y bajos porcentajes disueltos del API que no permiten caracterizar la liberación en su totalidad y que limitan de forma operativa las variables del método.

En cuanto a las consideraciones fisiológicas, a pesar de que la permeabilidad del TGI a PIO es alta, los procesos que sufre el fármaco en el intestino aun no han sido elucidados. Reportes de la literatura provenientes de estudios *in vitro* y *ex vivo* proponen dos fenómenos: 1) el fármaco se disuelve en su totalidad en el estómago y precipita en el intestino delgado, por lo que la absorción no está dada por la disolución del API desde la forma farmacéutica, sino por la re-disolución de las partículas del mismo suspendidas en el precipitado, que depende a su vez de la distribución del tamaño de partícula del API (29) y 2) que el fármaco se disuelve en su totalidad en el estómago y el flujo a través del TGI permite que se alcance un estado de supersaturación en el intestino delgado en el que el fármaco se encuentra disuelto y puede ser absorbido, sugiriendo que la solubilidad el API se subestima en estudios *in vitro* (31).

El refinar el método para simplificar la parte operativa y obtener una predicción con un error menor es una perspectiva que vale la pena considerar y, a pesar que PIO requiere de manera normativa estudios de BE para demostrar la intercambiabilidad de productos genéricos, la predicción del comportamiento *in vivo* mediante perfiles de disolución podría permitir la selección de la mejor fórmula para enviar a dichos estudios, opción no provista por el método de disolución compendial.

Se enfatiza que la obtención del modelo matemático no sugiere que el método de disolución propuesto reemplace estudios de BE para PIO, debido a que la IVIVC no ha sido validada y hacerlo implica estudios *in vivo* que van más allá del alcance del presente trabajo.

6. CONCLUSIONES

Se desarrolló un método analítico para cuantificar pioglitazona en muestras provenientes de estudios de disolución en FaSSIF-V2. El método demostró ser lineal, exacto, preciso y específico.

Se probaron condiciones de disolución en FaSSIF-V2, definiéndose aquellas que permitieron obtener una fase ascendente en el perfil de disolución.

El porcentaje disuelto máximo encontrado para el medicamento de prueba y el medicamento de referencia se encontró cercano a 10% y el modelo que describe la disolución de mejor manera es Korsmeyer-Peppas.

Los perfiles de disolución del medicamento de prueba y del medicamento de referencia son similares tanto por región de confianza multivariada y comparación modelo-dependiente.

Se encontró una relación matemática no lineal entre el porcentaje disuelto *in vitro* y la fracción absorbida *in vivo* de PIO. El error en la predicción, sin embargo resultó ser mayor a 15% para AUC_{0-t} y C_{max} , por lo que una IVIVC no es validable bajo el método propuesto y el modelo obtenido es meramente informativo.

7. REFERENCIAS

1. Gajendran J, Krammer J, Timothy Grady L. Historical Development of Dissolution Testing. In: Pharmaceutical Dissolution Testing [Internet]. Informa Healthcare; 2005 [cited 2017 Mar 15]. p. 1–37. Available from: <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/9780849359170.ch1>
2. Dressman J. What are Biorelevant Dissolution Media? biorelevant.com [Internet]. [cited 2017 Mar 15]. Available from: <http://biorelevant.com/biorelevant-media-intro/>
3. TSRL inc. BCS Database results [Internet]. [cited 2017 Mar 15]. Available from: <http://www.tsrlinc.net/results.cfm>
4. Sajal, Sasha. Jayanta K. Pioglitazone Tablet Dissolution and IVIVC Profile. First. Edit. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing; 2012. 117 p.
5. Dissolution. In: IUPAC Compendium of Chemical Terminology [Internet]. Research Triangle Park, NC: IUPAC; [cited 2017 Mar 16]. Available from: <http://goldbook.iupac.org/D01806.html>
6. Wagner JG. Biopharmaceutics and Relevant Pharmacokinetics. First. Edit. USA: Drug Intelligence Pubns; 1971.
7. Martin A. Martin's Physical Pharmacy And Pharmaceutical Sciences. Physical Chemical and Biopharmaceutical Principles in the Pharmaceutical Sciences. Sixth Edit. Sinko PJ, editor. Philadelphia; 2011.
8. Brown W. Compendial Requirements of Dissolution Testing—European Pharmacopoeia, Japanese Pharmacopoeia, United States Pharmacopeia. In: Pharmaceutical Dissolution Testing [Internet]. Informa Healthcare; 2005 [cited 2017 Mar 15]. p. 69–80. Available from: <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/9780849359170.ch3>
9. U.S. Pharmacopeial Convention, editor. Dissolution. In: US Pharmacopeia [Internet]. 2011 [cited 2017 Mar 16]. Available from:

- http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/2011-02-25711DISSOLUTION.pdf
10. R, KA. Mathematical Models of Drug Dissolution: A Review. Sch Acad J PharmacyOnline) Sch Acad J Pharm [Internet]. 2014 [cited 2017 Mar 16];3(5):2320–4206. Available from: www.saspublisher.com
 11. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Zou A, Li W, Yao C, et al. DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. [cited 2017 Mar 16]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2895453/pdf/12248_2010_Article_9185.pdf
 12. Goodness of Fit Statistics [Internet]. [cited 2017 Mar 16]. Available from: <http://web.maths.unsw.edu.au/~adelle/Garvan/Assays/GoodnessOfFit.html>
 13. Snipes M, Taylor DC, Hilton CN. Model Selection and Akaike Information Criteria: An example from wine ratings and prices. 2014 [cited 2017 Mar 16]; Available from: www.sciencedirect.com
 14. Guidance for Industry Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. 1997 [cited 2017 Mar 15]; Available from: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070237.pdf>
 15. Secretaría de Salud. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 [Internet]. 2013. Available from: <http://www.economia-noms.gob.mx/normas/noms/2010/177ssa12013.pdf>
 16. Koziolk M, Garbacz G, Neumann M, Weitschies W. Simulating the Postprandial Stomach: Biorelevant Test Methods for the Estimation of Intragastric Drug Dissolution. Mol Pharm. 2013; (10):2211–21.
 17. Iliadis A, Reppas C, Nicolaidis E, Symillides M, Vertzoni M. Orally Administered Drug Products. In: Pharmaceutical Dissolution Testing [Internet]. Informa Healthcare; 2005 [cited

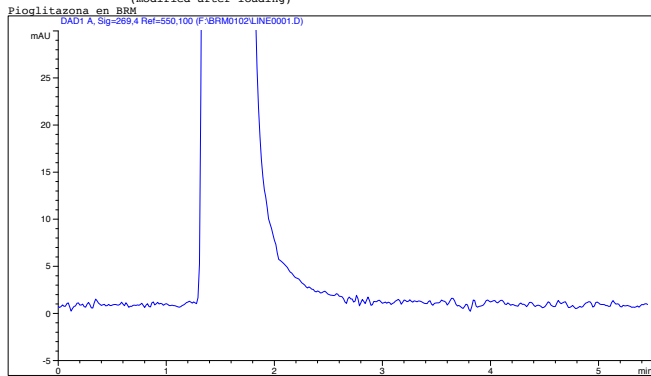
- 2017 Mar 15]. p. 229–49. Available from:
<http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/9780849359170.ch8>
18. Guidance for Industry Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application of In Vitro/In Vivo Correlations. 1997 [cited 2017 Mar 15]; Available from:
<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070239.pdf>
 19. D’Souza S, Faraj JA, Giovagnoli S, Deluca PP. IVIVC from long acting olanzapine microspheres. *Int J Biomater*. 2014;2014(January).
 20. Health NI of. Diabetes. MedlinePlus. 2015.
 21. INEGI. Morbilidad hospitalaria: tasa de morbilidad de los principales casos nuevos de enfermedades (2000-2014). 2014.
 22. INEGI. Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. [Internet]. 2014. Available from:
<http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>
 23. Wishart D, Knox C, Guo A, Shrivastava S, Hassanali M, Stothard P, et al. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids res*. 2006.
 24. Schönherr D, Wollatz U, Haznar-Garbacz D, Hanke U, Box KJ, Taylor R, et al. Characterisation of selected active agents regarding pKa values, solubility concentrations and pH profiles by SiriusT3. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2015;92:155–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.02.028>
 25. Truven Health Analytics. Micromedex (Healthcare series, electronic version). Pioglitazone, hydrochloride. 2016.
 26. Secretaría de Salud. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Vol. 2. 11 Edición. México; 2014.
 27. Satheeshkumar N, Shantikumar S, Srinivas R. Pioglitazone: A review of analytical methods. *J Pharm Anal*. 2014;4(5):295–302.

28. Kustrin S A. Biorelevant Dissolution Studies of Pioglitazone Hcl Immediate Release Tablets and the Determination of an In Vitro In Vivo Correlation. J Bioequiv Availab [Internet]. 2015;7(2):86–9. Available from: <http://omicsonline.org/open-access/biorelevant-dissolution-studies-of-pioglitazone-hcl-immediate-release-tablets-and-the-determination-of-an-in-vitro-in-vivo-correlation-jbb.1000220.php?aid=39840>
29. Sugita M, Kataoka M, Sugihara M, Takeuchi S, Yamashita S. Effect of Excipients on the Particle Size of Precipitated Pioglitazone in the Gastrointestinal Tract: Impact on Bioequivalence. 2014 [cited 2017 Mar 19]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4147060/pdf/12248_2014_Article_9646.pdf
30. FDA. Dissolution Methods For Pioglitazone [Internet]. [cited 2017 Mar 21]. Available from: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults.cfm
31. Tsume Y, Amidon GL, Takeuchi S. Bioequivalence & Bioavailability Dissolution Effect of Gastric and Intestinal pH for a BCS class II drug, Pioglitazone: New in vitro Dissolution System to Predict in vivo Dissolution. J Bioequiv Availab [Internet]. 2013 [cited 2017 Mar 19];5(5):224–2276. Available from: <http://dx.doi.org/10.4172/jbb.1000162>
32. Boda K. Developing Methods for Apparatus 3 and 7. In: Agilent Technologies [Internet]. Available from: www.dissolution.com
33. González Álvarez I, Cabrera Pérez M., Bermejo Sanz M. Metodologías Biofarmacéuticas en el Desarrollo de Medicamentos. Primera Ed. Elche; 2015.
34. FDA. Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation And Application of In Vitro/In Vivo Correlations. Guidance for Industry. 1997.

ANEXO A. Cromatogramas típicos: validación con el fármaco.

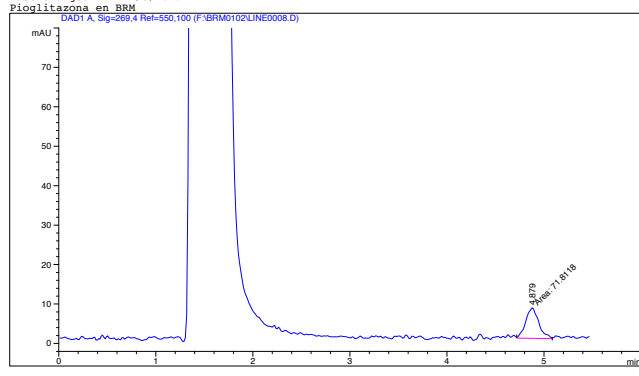
- A1. Blanco**
- A2. Nivel 1**
- A3. Nivel 2**
- A4. Nivel 3**
- A5. Nivel 4**
- A6. Nivel 5**
- A7. Estabilidad día 1**
- A8. Estabilidad día 8**
- A9. Muestra filtrada**
- A10. Muestra sin filtrar**

Injection Date : 2/1/2017 12:14:05 PM
Sample Name : Blanco
Acq. Operator : C. Barrera
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRRM.M
Last changed : 2/1/2017 12:12:18 PM by Ricardo Arana
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRRM.M
Last changed : 2/3/2017 11:04:55 AM
(modified after loading)



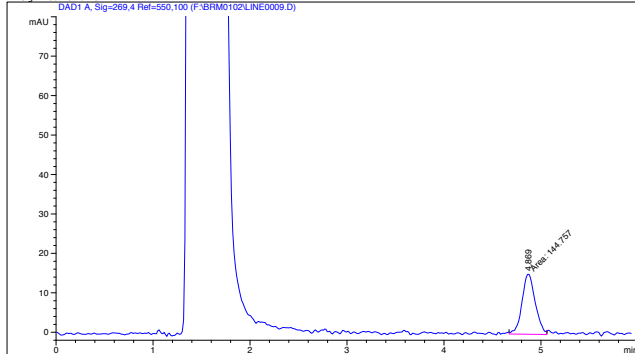
Area Percent Report with Performance and Noise
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!
Noise determination:
Time range from to Noise Noise Noise Wander Drift
[6*SD] [PtOP] [ASTM] [MAU] [MAU] [MAU/h]

Injection Date : 2/1/2017 1:11:20 PM
Sample Name : AN1
Acq. Operator : C. Barrera
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRRM.M
Last changed : 2/1/2017 1:10:00 PM by C. Barrera
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRRM.M
Last changed : 2/3/2017 1:22:14 PM
(modified after loading)



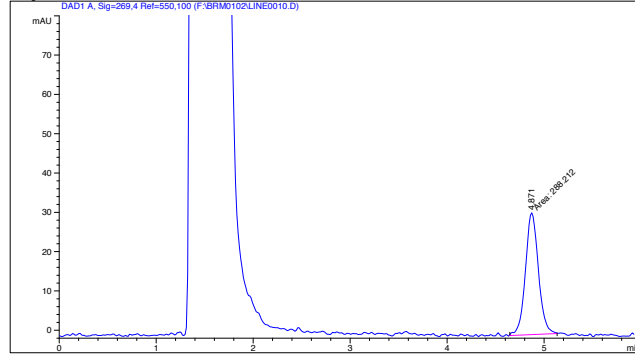
Area Percent Report with Performance and Noise
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!
Noise determination:
Time range from to Noise Noise Noise Wander Drift
[6*SD] [PtOP] [ASTM] [MAU] [MAU] [MAU/h]

Injection Date : 2/1/2017 1:19:26 PM
Sample Name : AN2
Acq. Operator : C. Barrera
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRRM.M
Last changed : 2/1/2017 1:18:28 PM by C. Barrera
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRRM.M
Last changed : 2/3/2017 1:22:14 PM
(modified after loading)



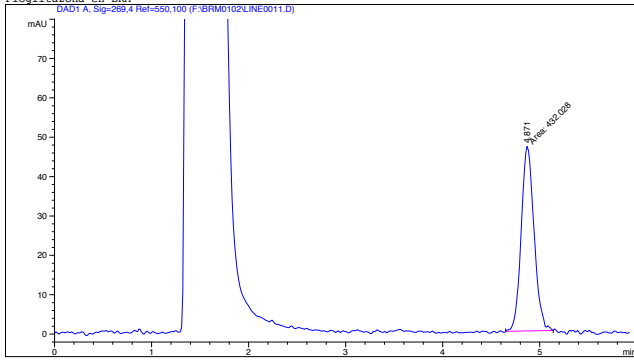
Area Percent Report with Performance and Noise
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!
Noise determination:
Time range from to Noise Noise Noise Wander Drift
[6*SD] [PtOP] [ASTM] [MAU] [MAU] [MAU/h]

Injection Date : 2/1/2017 1:26:53 PM
Sample Name : AN3
Acq. Operator : C. Barrera
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRRM.M
Last changed : 2/1/2017 1:26:39 PM by C. Barrera
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRRM.M
Last changed : 2/3/2017 1:22:14 PM
(modified after loading)

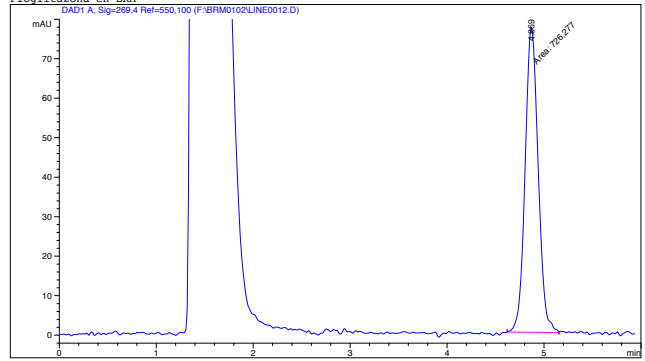


Area Percent Report with Performance and Noise
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!
Noise determination:
Time range from to Noise Noise Noise Wander Drift
[6*SD] [PtOP] [ASTM] [MAU] [MAU] [MAU/h]

Injection Date : 2/1/2017 1:34:18 PM Seq. Line : 6
 Sample Name : AN4 Vial : 6
 Acq. Operator : C. Barrera Inj : 1
 Acq. Instrument : Desarrollio Analitico Inj Volume : 80 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRRM.M
 Last changed : 2/1/2017 1:32:58 PM by C. Barrera
 (modified after loading)
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRRM.M
 Last changed : 2/3/2017 1:22:14 PM
 Pioglitazona en BRM



Injection Date : 2/1/2017 1:41:45 PM Seq. Line : 7
 Sample Name : AN5 Vial : 7
 Acq. Operator : C. Barrera Inj : 1
 Acq. Instrument : Desarrollio Analitico Inj Volume : 80 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRRM.M
 Last changed : 2/1/2017 1:45:43 PM by C. Barrera
 (modified after loading)
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRRM.M
 Last changed : 2/3/2017 1:22:14 PM
 Pioglitazona en BRM



Area Percent Report with Performance and Noise

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Noise determination:

Time range	Noise	Noise	Noise	Wander	Drift
from to	(6*SD)	(PtoP)	(ASTM)	(mAU)	(mAU/h)
[min] [min]	[mAU]	[mAU]	[mAU]	[mAU]	[mAU/h]
0.000 1.000	1.7313	1.4806	-	-	17.328

RetTime	k'	Area	Height	Symm.	Width	Plates	Resol
[min]		[mAU*s]	[mAU]		[min]		ution
4.871	-	432.02795	46.98407	0.87	0.1390	6799	-

*** End of Report ***

Area Percent Report with Performance and Noise

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

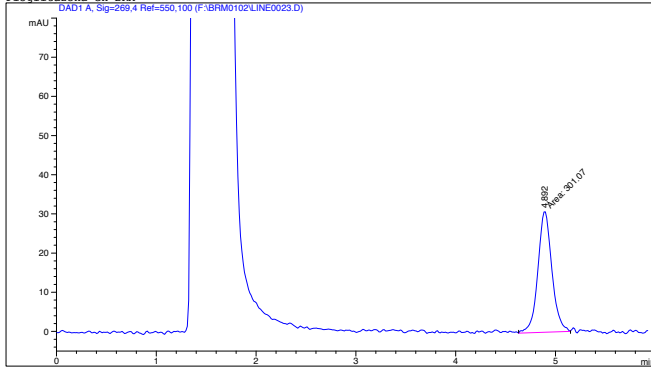
Noise determination:

Time range	Noise	Noise	Noise	Wander	Drift
from to	(6*SD)	(PtoP)	(ASTM)	(mAU)	(mAU/h)
[min] [min]	[mAU]	[mAU]	[mAU]	[mAU]	[mAU/h]
0.000 1.000	1.2653	0.9946	-	-	22.602

RetTime	k'	Area	Height	Symm.	Width	Plates	Resol
[min]		[mAU*s]	[mAU]		[min]		ution
4.869	-	726.27667	77.52708	0.89	0.1410	6610	-

*** End of Report ***

Injection Date : 2/1/2017 3:23:03 PM Seq. Line : 18
 Sample Name : Estaba Vial : 20
 Acq. Operator : C. Barrera Inj : 1
 Acq. Instrument : Desarrollio Analitico Inj Volume : 80 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRRM.M
 Last changed : 2/1/2017 2:43:46 PM by C. Barrera
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRRM.M
 Last changed : 2/16/2017 6:55:42 PM
 Pioglitazona en BRM



Area Percent Report with Performance and Noise

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

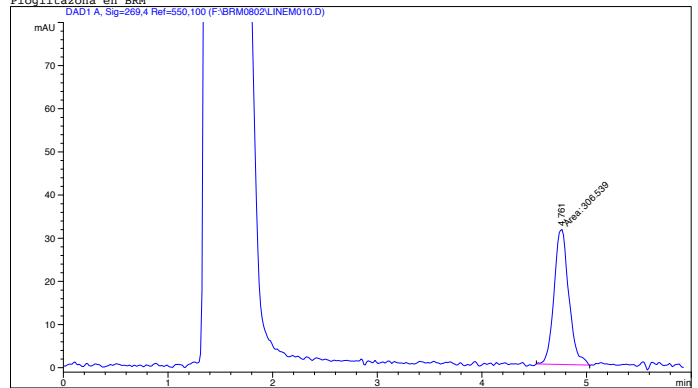
Noise determination:

Time range	Noise	Noise	Noise	Wander	Drift
from to	(6*SD)	(PtoP)	(ASTM)	(mAU)	(mAU/h)
[min] [min]	[mAU]	[mAU]	[mAU]	[mAU]	[mAU/h]
0.000 1.000	1.1747	0.9670	-	-	-7.392

RetTime	k'	Area	Height	Symm.	Width	Plates	Resol	Signal
[min]		[mAU*s]	[mAU]		[min]		ution	Noise
4.892	-	301.06955	31.02990	0.93	0.1429	6496	-	26.4

*** End of Report ***

Injection Date : 2/8/2017 1:46:50 PM Seq. Line : 5
 Sample Name : AN3 Vial : 5
 Acq. Operator : C. Barrera Inj : 1
 Acq. Instrument : Desarrollio Analitico Inj Volume : 80 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRRM.M
 Last changed : 2/8/2017 1:46:04 PM by C. Barrera
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRRM.M
 Last changed : 3/23/2017 1:14:53 PM
 (modified after loading)
 Pioglitazona en BRM



Area Percent Report with Performance and Noise

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Noise determination:

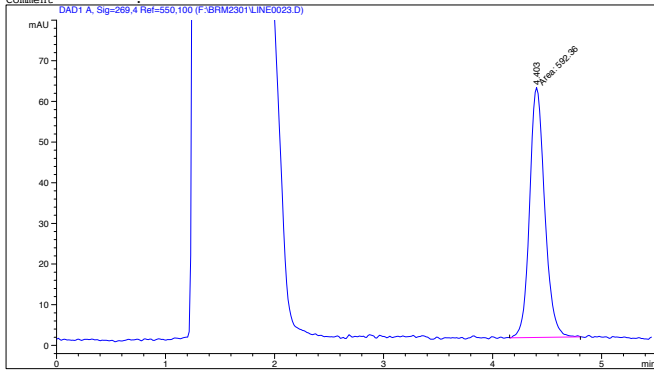
Time range	Noise	Noise	Noise	Wander	Drift
from to	(6*SD)	(PtoP)	(ASTM)	(mAU)	(mAU/h)
[min] [min]	[mAU]	[mAU]	[mAU]	[mAU]	[mAU/h]
0.000 1.000	1.3867	1.1530	-	-	-13.078

RetTime	k'	Area	Height	Symm.	Width	Plates	Resol	Signal
[min]		[mAU*s]	[mAU]		[min]		ution	Noise
4.761	-	306.53903	31.42283	0.97	0.1467	5837	-	22.7

*** End of Report ***

Injection Date : 1/23/2017 4:08:46 PM Seq. Line : 18
 Sample Name : F1 Vial : 20
 Acq. Operator : C.Barrera Inj : 1
 Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 80 µl
 Acq. Method : C:\BPCHEM\1\METHODS\PIOBRM.M
 Last changed : 1/23/2017 4:07:23 PM by C.Barrera
 (modified after loading)
 Analysis Method : C:\BPCHEM\1\METHODS\PIOBRM.M
 Last changed : 2/9/2017 2:40:59 PM
 (modified after loading)
 Pioglitazona en BRM

Column Description : Symmetry C18 5.0 micras
 Product# : WAT045905 Batch#: UAC/06
 Serial# : 028534169138 31
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
 Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
 Maximum Temperature : 30 °C
 Comment :



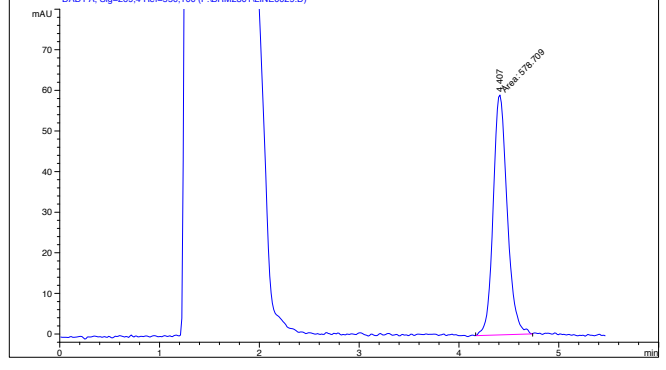
Area Percent Report with Performance and Noise

Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!
 Noise determination:

Time range	Noise	Noise	Noise	Wander	Drift
from to	(6*SD)	(PtOP)	(ASTM)		
[min] [min]	[mAU]	[mAU]	[mAU]	[mAU]	[mAU/h]
0.000 1.000	0.9674	0.8556	-	-	2.327e-1

Injection Date : 1/23/2017 4:53:52 PM Seq. Line : 24
 Sample Name : SF1 Vial : 105
 Acq. Operator : C.Barrera Inj : 1
 Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 80 µl
 Acq. Method : C:\BPCHEM\1\METHODS\PIOBRM.M
 Last changed : 1/23/2017 4:51:50 PM by C.Barrera
 (modified after loading)
 Analysis Method : C:\BPCHEM\1\METHODS\PIOBRM.M
 Last changed : 2/3/2017 1:22:14 PM
 Pioglitazona en BRM

Column Description : Symmetry C18 5.0 micras
 Product# : WAT045905 Batch#: UAC/06
 Serial# : 028534169138 31
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
 Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
 Maximum Temperature : 30 °C
 Comment :



Area Percent Report with Performance and Noise

Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!
 Noise determination:

Time range	Noise	Noise	Noise	Wander	Drift
from to	(6*SD)	(PtOP)	(ASTM)		
[min] [min]	[mAU]	[mAU]	[mAU]	[mAU]	[mAU/h]
0.000 1.000	0.8236	0.8900	-	-	16.589

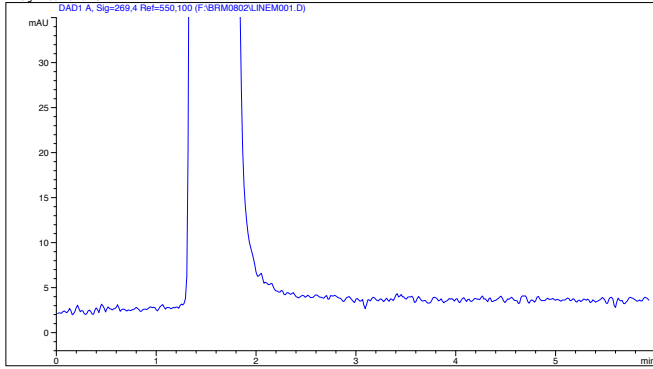
RetTime	k'	Area	Height	Symm.	Width	Plates	Resol	Signal
[min]		[mAU*s]	[mAU]		[min]		ution	/Noise
4.407	1.60	578.70892	59.27931	0.82	0.1448	5134	-	72.0

ANEXO B. Cromatogramas típicos: validación con el medicamento.

- B1. Blanco**
- B2. Nivel 1**
- B3. Nivel 2**
- B4. Nivel 3**
- B5. Nivel 4**
- B6. Nivel 5**

Injection Date : 2/8/2017 12:32:26 PM Seq. Line : 1
 Sample Name : Blanco Vial : 1
 Acq. Operator : C. Barrera Inj : 1
 Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 80 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRRM.M
 Last changed : 2/8/2017 12:31:19 PM by C. Barrera
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRRM.M
 Last changed : 2/9/2017 11:04:09 AM
 (modified after loading)

Pioglitazona en BRM



Area Percent Report with Performance and Noise

Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

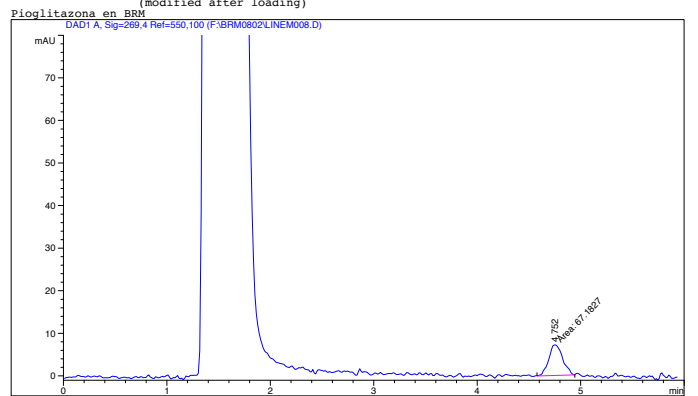
Noise determination:

Time range from [min]	Time range to [min]	Noise (6*SD) [mAU]	Noise (PtoP) [mAU]	Noise (ASTM) [mAU]	Wander [mAU]	Drift [mAU/h]
0.000	1.000	1.3967	1.0833	-	-	24.335

*** End of Report ***

Injection Date : 2/8/2017 1:31:51 PM Seq. Line : 3
 Sample Name : AN1 Vial : 3
 Acq. Operator : C. Barrera Inj : 1
 Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 80 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRRM.M
 Last changed : 2/8/2017 1:30:31 PM by C. Barrera
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRRM.M
 Last changed : 2/9/2017 11:30:54 AM
 (modified after loading)

Pioglitazona en BRM



Area Percent Report with Performance and Noise

Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

Noise determination:

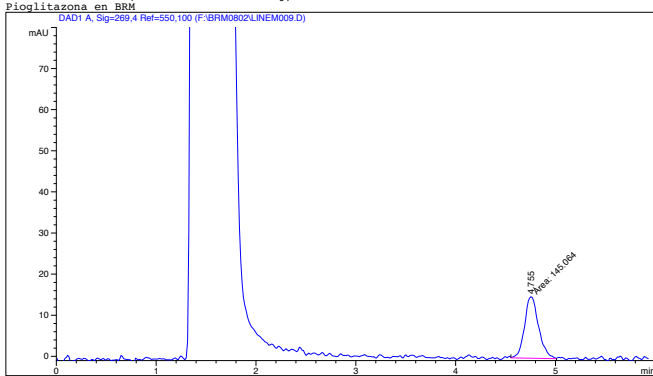
Time range from [min]	Time range to [min]	Noise (6*SD) [mAU]	Noise (PtoP) [mAU]	Noise (ASTM) [mAU]	Wander [mAU]	Drift [mAU/h]
0.000	1.000	1.1704	0.8823	-	-	-2.516

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resolution
4.752	-	67.18266	7.21481	0.82	0.1410	6297	-

*** End of Report ***

Injection Date : 2/8/2017 1:39:19 PM Seq. Line : 4
 Sample Name : AN2 Vial : 4
 Acq. Operator : C. Barrera Inj : 1
 Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 80 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRRM.M
 Last changed : 2/8/2017 1:40:25 PM by C. Barrera
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRRM.M
 Last changed : 2/9/2017 11:30:54 AM
 (modified after loading)

Pioglitazona en BRM



Area Percent Report with Performance and Noise

Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

Noise determination:

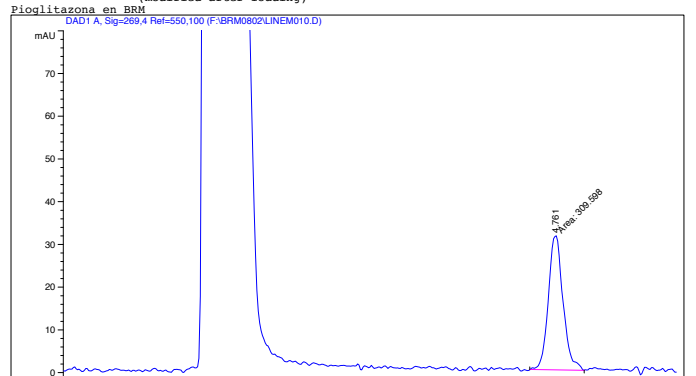
Time range from [min]	Time range to [min]	Noise (6*SD) [mAU]	Noise (PtoP) [mAU]	Noise (ASTM) [mAU]	Wander [mAU]	Drift [mAU/h]
0.000	1.000	2.4554	2.6080	-	-	17.422

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resolution
4.755	-	145.06413	14.99104	0.85	0.1429	6139	-

*** End of Report ***

Injection Date : 2/8/2017 1:46:50 PM Seq. Line : 5
 Sample Name : AN3 Vial : 5
 Acq. Operator : C. Barrera Inj : 1
 Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 80 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRRM.M
 Last changed : 2/8/2017 1:46:04 PM by C. Barrera
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRRM.M
 Last changed : 2/9/2017 11:30:54 AM
 (modified after loading)

Pioglitazona en BRM



Area Percent Report with Performance and Noise

Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

Noise determination:

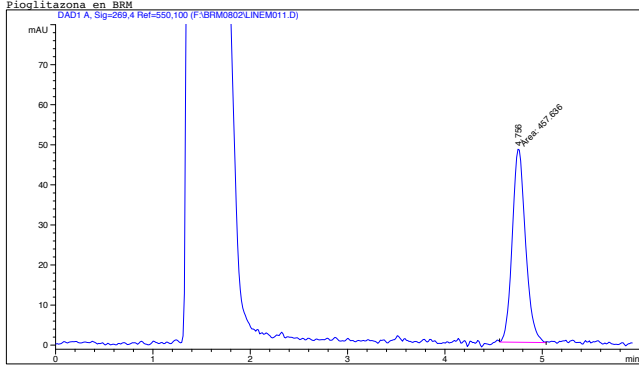
Time range from [min]	Time range to [min]	Noise (6*SD) [mAU]	Noise (PtoP) [mAU]	Noise (ASTM) [mAU]	Wander [mAU]	Drift [mAU/h]
0.000	1.000	1.3867	1.1530	-	-	-13.078

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resolution
4.761	-	309.59836	31.52093	0.98	0.1467	5837	-

*** End of Report ***

```

=====
Injection Date : 2/8/2017 1:54:16 PM      Seq. Line : 6
Sample Name    : AN4                      Vial       : 6
Acq. Operator  : C. Barrera               Inj        : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico     Inj Volume : 80 µl
Acq. Method    : C:\BPCHEM\1\METHODS\PIOBRM.M
Last changed   : 2/8/2017 1:55:35 PM by C. Barrera
                    (modified after loading)
Analysis Method : C:\BPCHEM\1\METHODS\PIOBRM.M
Last changed   : 2/9/2017 11:30:54 AM
                    (modified after loading)
  
```



Area Percent Report with Performance and Noise

```

=====
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

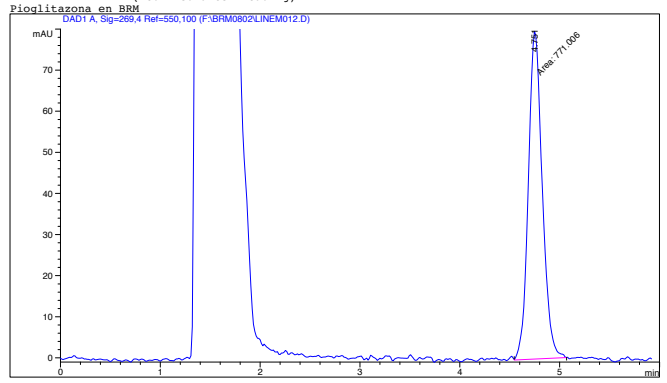
Noise determination:
Time range from [min] to [min]
Noise (6*SD) [mAU]
Noise (Ptop) [mAU]
Noise (ASTM) [mAU]
Wander [mAU]
Drift [mAU/h]
-----
0.000 1.000 1.4804 1.1092 - - -15.379

RetTime k' Area Height Symm. Width Plates Resol
[min] [min] [mAU*s] [mAU] [min] [min] [min] [min]
-----
4.756 - 457.63577 48.42209 0.87 0.1429 6140 -

*** End of Report ***
  
```

```

=====
Injection Date : 2/8/2017 2:01:44 PM      Seq. Line : 7
Sample Name    : AN5                      Vial       : 7
Acq. Operator  : C. Barrera               Inj        : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico     Inj Volume : 80 µl
Acq. Method    : C:\BPCHEM\1\METHODS\PIOBRM.M
Last changed   : 2/8/2017 2:02:00 PM by C. Barrera
                    (modified after loading)
Analysis Method : C:\BPCHEM\1\METHODS\PIOBRM.M
Last changed   : 2/9/2017 11:30:54 AM
                    (modified after loading)
  
```



Area Percent Report with Performance and Noise

```

=====
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Noise determination:
Time range from [min] to [min]
Noise (6*SD) [mAU]
Noise (Ptop) [mAU]
Noise (ASTM) [mAU]
Wander [mAU]
Drift [mAU/h]
-----
0.000 1.000 1.4052 1.1986 - - -39.141

RetTime k' Area Height Symm. Width Plates Resol
[min] [min] [mAU*s] [mAU] [min] [min] [min] [min]
-----
4.751 - 771.00647 80.12583 0.84 0.1429 6127 -

*** End of Report ***
  
```

ANEXO C.

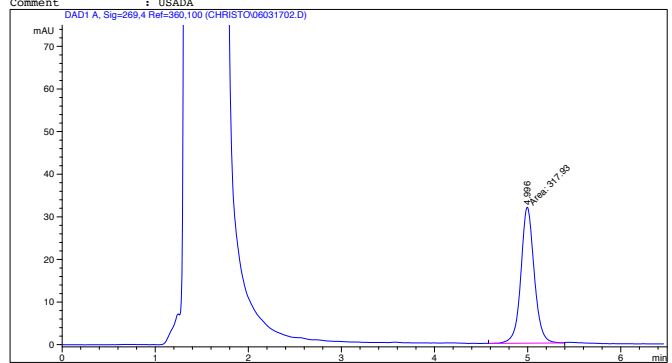
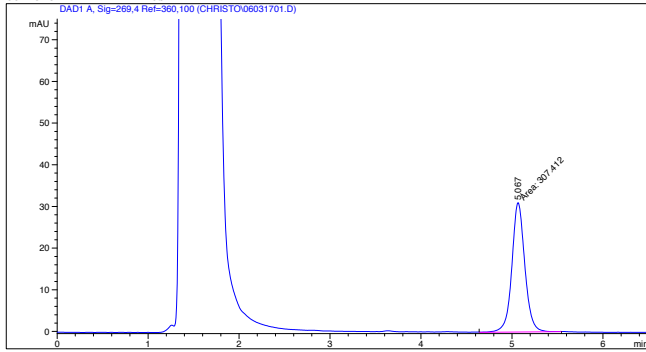
- C1. Referencia. Unidad 1, Tiempo 1**
- C2. Ref. U1T2**
- C3. Ref. U1T3**
- C4. Ref. U1T4**
- C5. Ref. U1T5**
- C6. Prueba. Unidad 1, Tiempo 1**
- C7. Pba. U1T2**
- C8. Pba. U1T3**
- C9. Pba. U1T4**
- C10. Pba. U1T5**

Injection Date : 3/6/2017 1:46:20 PM Seq. Line : 1
 Sample Name : 1 Location : Vial 1
 Acq. Operator : C.Barrera Inj : 1
 Acq. Instrument : Instrument 1 Inj Volume : 80 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ALMA.M
 Last changed : 3/6/2017 1:41:09 PM by C.Barrera
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ALMA.M
 Last changed : 3/8/2017 8:57:34 AM by Ricardo Arana

Injection Date : 3/6/2017 1:57:15 PM Seq. Line : 2
 Sample Name : 2 Location : Vial 2
 Acq. Operator : C.Barrera Inj : 1
 Acq. Instrument : Instrument 1 Inj Volume : 80 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ALMA.M
 Last changed : 3/6/2017 1:59:02 PM by C.Barrera
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ALMA.M
 Last changed : 3/8/2017 8:57:34 AM by Ricardo Arana

Column Description : C18 WATERS
 Product# : WAT045905 Batch#: 02933522912
 Serial# : 2933522923867
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
 Maximum Pressure : 0 bar Maximum pH : 0
 Maximum Temperature : 0 °C
 Comment : USADA

Column Description : C18 WATERS
 Product# : WAT045905 Batch#: 02933522912
 Serial# : 2933522923867
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
 Maximum Pressure : 0 bar Maximum pH : 0
 Maximum Temperature : 0 °C
 Comment : USADA



Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=360,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
5.067	1.99	307.41202	31.06133	0.91	0.1422	7032	-	-

*** End of Report ***

Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=360,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
4.996	1.95	317.92966	31.94703	0.90	0.1444	6626	-	-

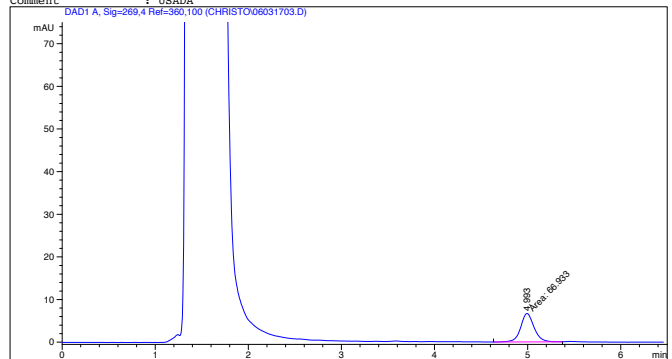
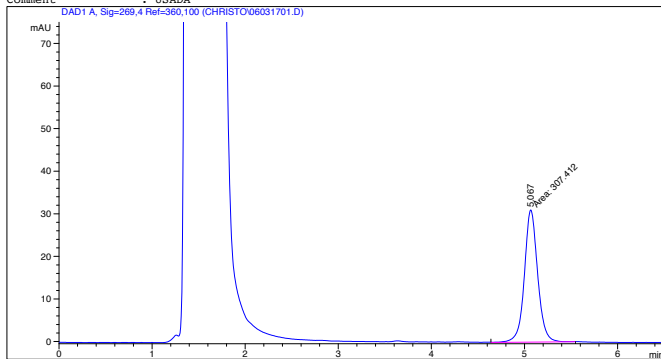
*** End of Report ***

Injection Date : 3/6/2017 1:46:20 PM Seq. Line : 1
 Sample Name : 1 Location : Vial 1
 Acq. Operator : C.Barrera Inj : 1
 Acq. Instrument : Instrument 1 Inj Volume : 80 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ALMA.M
 Last changed : 3/6/2017 1:41:09 PM by C.Barrera
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ALMA.M
 Last changed : 3/8/2017 8:57:34 AM by Ricardo Arana

Injection Date : 3/6/2017 2:11:35 PM Seq. Line : 1
 Sample Name : U1T3 Location : Vial 1
 Acq. Operator : C.Barrera Inj : 1
 Acq. Instrument : Instrument 1 Inj Volume : 80 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ALMA.M
 Last changed : 3/6/2017 2:09:56 PM by C.Barrera
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ALMA.M
 Last changed : 3/8/2017 8:57:34 AM by Ricardo Arana

Column Description : C18 WATERS
 Product# : WAT045905 Batch#: 02933522912
 Serial# : 2933522923867
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
 Maximum Pressure : 0 bar Maximum pH : 0
 Maximum Temperature : 0 °C
 Comment : USADA

Column Description : C18 WATERS
 Product# : WAT045905 Batch#: 02933522912
 Serial# : 2933522923867
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
 Maximum Pressure : 0 bar Maximum pH : 0
 Maximum Temperature : 0 °C
 Comment : USADA



Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=360,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
5.067	1.99	307.41202	31.06133	0.91	0.1422	7032	-	-

*** End of Report ***

Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=360,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
4.993	1.95	66.93301	6.67403	0.88	0.1450	6568	-	-

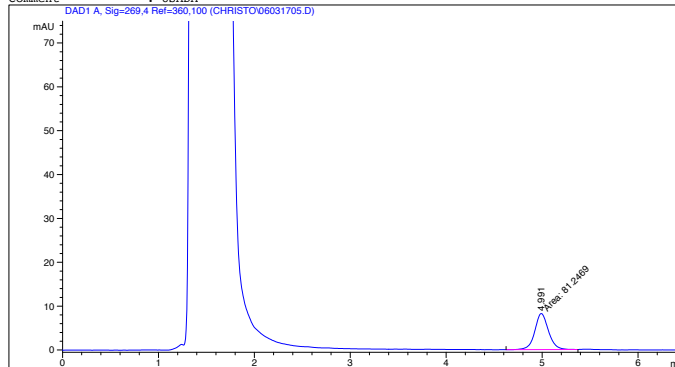
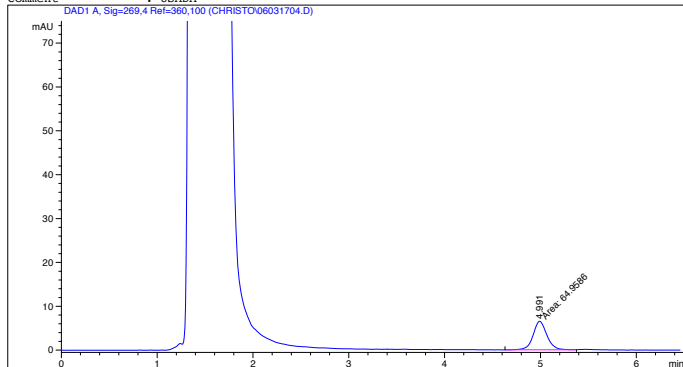
*** End of Report ***

Injection Date : 3/6/2017 2:22:17 PM Seq. Line : 2
Sample Name : UIT4 Location : Vial 2
Acq. Operator : C.Barrera Inj : 1
Acq. Instrument : Instrument 1 Inj Volume : 80 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ALMA.m
Last changed : 3/6/2017 2:20:19 PM by C.Barrera
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ALMA.m
Last changed : 3/8/2017 8:57:34 AM by Ricardo Arana

Injection Date : 3/6/2017 2:33:00 PM Seq. Line : 3
Sample Name : UIT5 Location : Vial 3
Acq. Operator : C.Barrera Inj : 1
Acq. Instrument : Instrument 1 Inj Volume : 80 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ALMA.m
Last changed : 3/6/2017 2:20:19 PM by C.Barrera
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ALMA.m
Last changed : 3/8/2017 8:57:34 AM by Ricardo Arana

Column Description : C18 WATERS
Product# : WATO45905 Batch#: 02933522912
Serial# : 2933522923867
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 0 bar Maximum pH : 0
Maximum Temperature : 0 °C
Comment : USDA

Column Description : C18 WATERS
Product# : WATO45905 Batch#: 02933522912
Serial# : 2933522923867
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 0 bar Maximum pH : 0
Maximum Temperature : 0 °C
Comment : USDA



Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=360,100
Results obtained with enhanced integrator!

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Width [min], Plates, Resol, Selectivity. Row 1: 4.991, 1.94, 64.95861, 6.50006, 0.88, 0.1450, 6565, -, -

*** End of Report ***

Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=360,100
Results obtained with enhanced integrator!

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Width [min], Plates, Resol, Selectivity. Row 1: 4.991, 1.94, 81.24690, 8.22339, 0.88, 0.1450, 6565, -, -

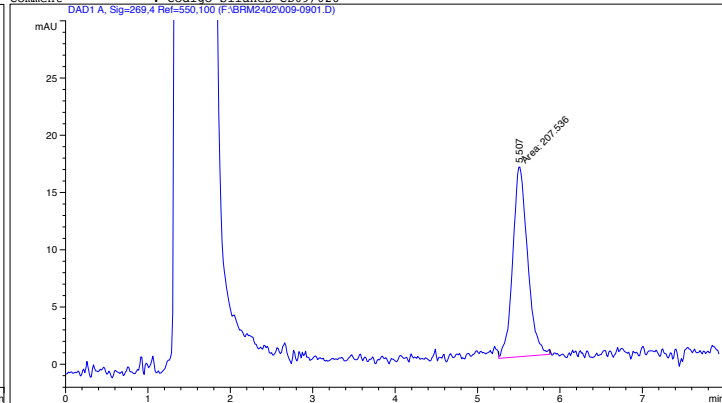
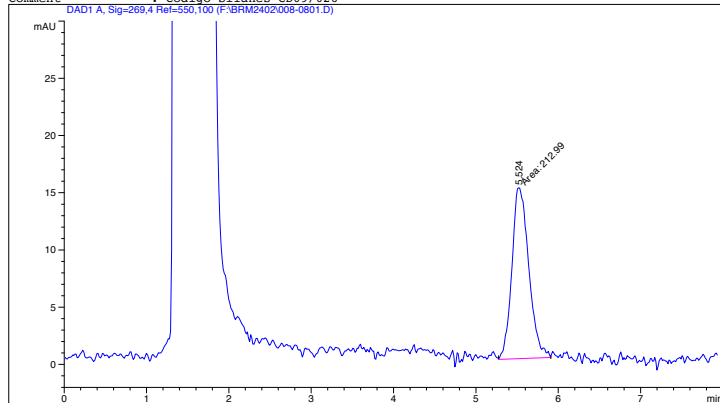
*** End of Report ***

Injection Date : 2/24/2017 1:24:34 PM Seq. Line : 8
Sample Name : UIT1 Vial : 8
Acq. Operator : C. Barrera Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollio Analitico Inj Volume : 80 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRM.M
Last changed : 2/24/2017 1:23:13 PM by C. Barrera
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRM.M
Last changed : 2/27/2017 11:58:49 AM

Injection Date : 2/24/2017 1:34:03 PM Seq. Line : 9
Sample Name : UIT2 Vial : 9
Acq. Operator : C. Barrera Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollio Analitico Inj Volume : 80 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRM.M
Last changed : 2/24/2017 1:33:35 PM by C. Barrera
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOBRM.M
Last changed : 2/27/2017 11:58:49 AM

Column Description : Symmetry C18 5.0 micras
Product# : WATO45905 Batch#: UAC/06
Serial# : 02933522923867
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 30 °C
Comment : Codigo Silanes CD09/026

Column Description : Symmetry C18 5.0 micras
Product# : WATO45905 Batch#: UAC/06
Serial# : 02933522923867
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 30 °C
Comment : Codigo Silanes CD09/026



Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Width [min], Plates, Resol, Selectivity. Row 1: 5.524, 2.26, 212.99014, 14.93030, 0.73, 0.2133, 3714, -, -

*** End of Report ***

Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Width [min], Plates, Resol, Selectivity. Row 1: 5.507, 2.25, 207.53569, 16.67480, 0.78, 0.1840, 4962, -, -

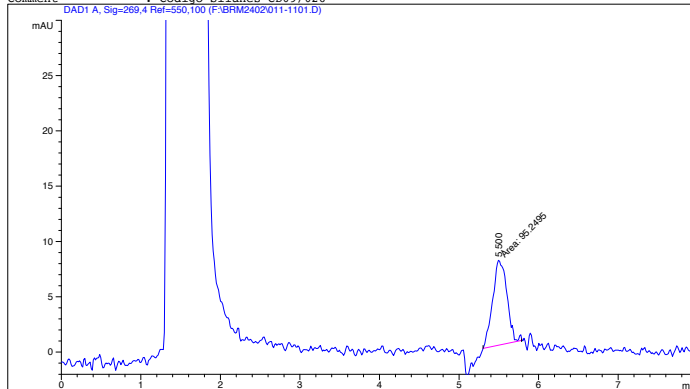
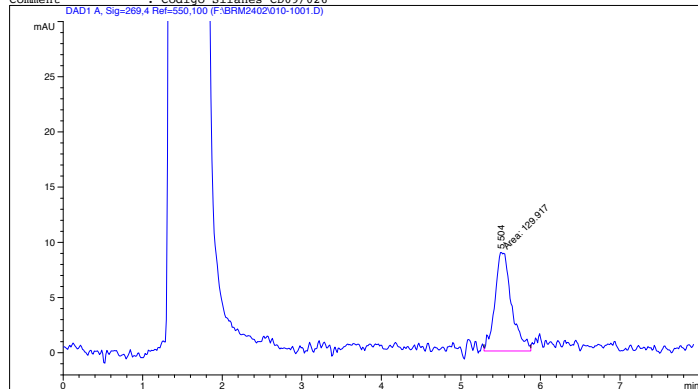
*** End of Report ***

Injection Date : 2/24/2017 1:43:31 PM Seq. Line : 10
 Sample Name : UIT3 Vial : 10
 Acq. Operator : C. Barrera Inj : 1
 Acq. Instrument : Desarollo Analitico Inj Volume : 80 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOB.RM.M
 Last changed : 2/24/2017 1:42:10 PM by C. Barrera
 (modified after loading)
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOB.RM.M
 Last changed : 2/27/2017 11:58:49 AM
 (modified after loading)
 Pioglitazona en BRM

Injection Date : 2/24/2017 1:52:58 PM Seq. Line : 11
 Sample Name : UIT4 Vial : 11
 Acq. Operator : C. Barrera Inj : 1
 Acq. Instrument : Desarollo Analitico Inj Volume : 80 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOB.RM.M
 Last changed : 2/24/2017 1:51:37 PM by C. Barrera
 (modified after loading)
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOB.RM.M
 Last changed : 2/27/2017 11:58:49 AM
 (modified after loading)
 Pioglitazona en BRM

Column Description : Symmetry C18 5.0 micras
 Product# : WAT045905 Batch# : UAC/06
 Serial# : 02933522923867
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
 Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
 Maximum Temperature : 30 °C
 Comment : Codigo Silanes CD09/026

Column Description : Symmetry C18 5.0 micras
 Product# : WAT045905 Batch# : UAC/06
 Serial# : 02933522923867
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
 Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
 Maximum Temperature : 30 °C
 Comment : Codigo Silanes CD09/026



Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
5.504	2.25	129.91655	8.99019	0.58	0.2000	4196	-	-

*** End of Report ***

Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

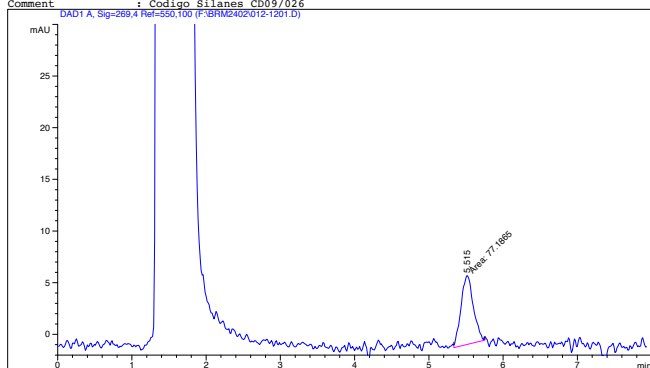
Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
5.500	2.24	95.24947	7.71697	0.77	0.1920	4545	-	-

*** End of Report ***

Injection Date : 2/24/2017 2:02:30 PM Seq. Line : 12
 Sample Name : UIT5 Vial : 12
 Acq. Operator : C. Barrera Inj : 1
 Acq. Instrument : Desarollo Analitico Inj Volume : 80 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOB.RM.M
 Last changed : 2/24/2017 2:01:08 PM by C. Barrera
 (modified after loading)
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PIOB.RM.M
 Last changed : 2/27/2017 11:58:49 AM
 (modified after loading)
 Pioglitazona en BRM

Column Description : Symmetry C18 5.0 micras
 Product# : WAT045905 Batch# : UAC/06
 Serial# : 02933522923867
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
 Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
 Maximum Temperature : 30 °C
 Comment : Codigo Silanes CD09/026



Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=269,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
5.515	2.25	77.18646	6.69110	0.94	0.1756	5467	-	-

*** End of Report ***