



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**GUIA DE USO PARA SOFTWARE EMPOWER™ WATERS
EN LA CUANTIFICACIÓN DE CONSERVADORES EN SUSPENSION
DE SUBSALICILATO DE BISMUTO POR HPLC**

TESIS

Para obtener el título de:

Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta:

ROMEO LÓPEZ VILLATORO

DIRECTOR:

DRA IDALIA LETICIA FLORES GOMEZ

ASESOR:

M en D.I.I.E FRANCISCA ROBLES LÓPEZ

CD. MX. SEPTIEMBRE 2024



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.

INDICE	2
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	4
ÍNDICE DE TABLAS	4
ÍNDICE DE CUADROS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	5
1. INTRODUCCIÓN	6
2. MARCO TEÓRICO.....	8
2.1 La Cromatografía.....	8
2.2. Formas de cromatografía líquida	8
2.3. Instrumentación	9
2.3.1. Sistema de suministro de fase móvil	10
2.3.1.1 La bomba	10
2.3.1.2 Sistemas de mezcla de fase móvil	11
2.3.1.3 Mezclado a alta presión	11
2.3.1.4. Mezclado a baja presión	12
2.3.1.5 Sistemas de inyección.....	13
2.3.1.5a Inyectores de jeringa	14
2.3.1.5b Inyectores de válvula.....	14
2.3.1.6 Conducciones y conexiones.....	14
2.3.1.7 Detectores.....	15
a) Detectores de índice de refracción	197
b) Detectores de ultravioleta/visible	19
c) Tipos de detectores UV/VIS	20
d) Detectores de fluorescencia.....	22
e) Detectores electroquímicos.....	23
f) Detector de conductividad electrolítica.....	24
2.4 La Columna	25
2.4.1 Diámetro de la columna	26
2.4.2 Longitud de la columna	26
2.5 Empower™	27
2.5.1 La adquisición, el procesamiento de datos y la generación de informes ..	29
2.5.2 Opciones que se adaptan a su forma de trabajar	30
2.6 Suspensiones.....	31
2.7 Definición e importancia de estabilidad de los medicamentos.....	49
2.7.1 Tipos de estabilidad	49
2.7.2 Factores que afectan la estabilidad de los medicamentos	50
2.7.3 Forma farmacéutica del medicamento	51

2.7.4 Formulación del medicamento	51
2.7.5 Proceso de fabricación	51
2.7.6 Temperatura.....	51
2.7.7 Humedad.....	52
2.7.8 pH.....	52
2.7.9 Oxígeno.....	53
2.7.10 Luz	53
2.7.11 Productos y mecanismos de degradación de los medicamentos	54
2.7.12 Degradación química	54
2.7.13 Estudios de estabilidad	56
2.7.14 Normativa.....	56
2.7.15 Plazos y condiciones para los estudios de estabilidad.....	59
2.7.16 Programa de evaluación de estabildades.....	60
2.7.17 Vida útil y fecha de caducidad de los medicamentos	60
3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	61
4. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACION.....	62
5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	63
6. OBJETIVO.....	63
7. HIPÓTESIS	63
8. DIAGRAMA DE FLUJO.....	64
9. METODOLOGIA.....	65
10. RESULTADOS.....	67
10.1 GUÍA PARA MANEJO DE SOFTWARE EMPOWER™ EN HPLC WATERS	67
10.2 CROMATROGRAMAS.....	75
11. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	78
12. CONCLUSIONES.....	80
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ppb	Partes por billón
HPLC	Cromatografía de líquidos de Alta Resolución
GC	Cromatografía de gases
PDA	Arreglo de fotodiodos
MS	Espectrómetro de masas
UPLC	Cromatografía de Ultra alta resolución
Cmax	es la mayor concentración de un medicamento en la sangre

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Tipos de estabilidad
Tabla 2	Degradación química
Tabla 3	Mecanismos de degradación física
Tabla 4	Guías en materia de estudios de estabilidad
Tabla 5	Características de las zonas climáticas.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Factores relacionados con la estabilidad de los medicamentos.
Cuadro 2.	Objetivo de los excipientes.
Cuadro 3.	Red o cadena de frío.
Cuadro 4.	Estudios de estabilidad acelerados y a largo plazo.
Cuadro 5.	Elementos del programa de evaluación de estabildades.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Los componentes básicos de un cromatógrafo
- Figura 2. Sistema de mezcla en alta presión
- Figura 3. Sistema de mezcla en baja presión
- Figura 4. Ruido y deriva de la señal de un detector.
- Figura 5. Detector UV/VIS de longitud de onda variable
- Figura 6. Columna cromatográfica
- Figura 7. Estructura base de Datos Empower™
- Figura 8. Factores relacionados con la estabilidad de los medicamentos.
- Figura 9. Frascos color ámbar
- Figura 10. Tabletas envasadas en blíster color naranja
- Figura 11. Mecanismos de degradación de medicamentos
- Figura 12. Distribución de zonas climáticas

ÍNDICE DE ECUACIONES

- Ecuación 1 La Ley de Stokes
- Ecuación 2 Volumen de Sedimentación
- Ecuación 3 Volumen de sedimento
- Ecuación 4 Grado de floculación

1. INTRODUCCIÓN

La cromatografía líquida de alta resolución (mejor conocida por sus siglas en inglés: HPLC: High Pressure Liquid Chromatography) representa el mayor mercado en el mundo del instrumental analítico, la popularidad de esta metodología se debe a su gran versatilidad ya que cubre un amplio espectro de aplicaciones, excelente capacidad para el análisis de trazas (en muchos casos ppb), rapidez y adaptabilidad al análisis cuantitativo. La HPLC se utiliza en casi todos los laboratorios industriales, organismos oficiales, universidades y en otros laboratorios donde se realicen investigaciones químicas o bioquímicas. En los años venideros la HPLC continuará jugando un rol predominante en los laboratorios de investigaciones farmacéuticas, de síntesis orgánicas, bioquímicos, biológicos, de control del medio ambiente y alimentarios.

Aún por extraño que parezca una de las mayores limitaciones de HPLC es la falta de operadores experimentados. El entrenamiento y capacitación en técnicas modernas de HPLC en las universidades es escaso o casi nulo. Esto ocurre debido al alto costo de los instrumentos, consumibles y mantenimiento así como a las áreas requeridas, calificación, junto con experiencia experimental en esta disciplina, por lo cual la capacitación debe recaer o en el fabricante del instrumento o en el químico experimentado en la materia.

Es por ello, que en la actualidad resulta importante el empleo de materiales actualizados y vigentes (manuales, guías, procedimientos de operación) bien escritos, bien ilustrados y organizados que resulten de un apoyo esencial para los químicos analistas así como para estudiantes universitarios, recién egresados e incluso algunos profesionales.

En ese sentido, el objetivo de este informe es presentar de manera detallada y de fácil lectura la información referente a *¿Qué es el Software Empower™? ¿Cuáles son sus ventajas?*.

La interfaz de Empower™ está diseñada para maximizar la productividad y mejorar la adquisición, el procesamiento y la impresión de los datos cromatográficos. Al mismo tiempo, facilita la aplicación de esta técnica en el análisis de una suspensión de subsalicilato de bismuto en particular el contenido de conservadores para comprobar la estabilidad del producto a lo largo del tiempo ya que genera resultados significativos de manera rápida, sencilla y confiable.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 La Cromatografía

La cromatografía de alta resolución HPLC, ha tenido una creciente difusión desde comienzos de la década del '70 y hoy representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico moderno, ya sea que esté dedicado a la investigación básica o aplicada, industrial, biológico o bromatológico.⁽¹⁾

La cromatografía es un método usado primariamente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra se mueve. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar extendida como una capa o distribuida como una película. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa. La idea de la HPLC misma, siglas que se debieron a "High Pressure Liquid Chromatography" debieron ser cambiadas cuando los cromatografistas se dieron cuenta de que la presión sólo constituía una herramienta que forzaba a la fase móvil a atravesar la columna, sin constituirse por sí en una variable del sistema.⁽¹⁾

2.2. Formas de cromatografía líquida

Los diferentes tipos de cromatografía líquida se pueden clasificar de varias maneras, pero la forma más habitual de clasificación es la realizada con base en la naturaleza de la fase estacionaria, ya que es ésta la que impone fundamentalmente el mecanismo de separación; de este modo, se pueden enumerar cuatro tipos de técnicas:

- Cromatografía de adsorción (líquido-sólido).

La fase estacionaria es un adsorbente y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción.

- Cromatografía de reparto/adsorción (fases ligadas químicamente).

La separación en este caso, se basa en un reparto del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria.⁽¹⁾

- Cromatografía de intercambio iónico.

Este tipo de cromatografía se da cuando la fase estacionaria presenta en su superficie grupos ionizados capaces de retener selectivamente a iones de signo contrario que circulan en la fase móvil.

- Cromatografía de exclusión molecular.

La fase estacionaria, en este caso, es un material poroso de tamaño de poro controlado, que permite la entrada de ciertas moléculas de manera selectiva, dejando fuera otras de mayor tamaño. ⁽¹⁾

El mecanismo de retención en los dos primeros casos es similar, variando únicamente el tipo de interacciones que se producen y cual de ellas es la predominante; por esta razón, en la práctica se realiza otra división de los dos primeros tipos de cromatografía atendiendo a polaridad de la fase estacionaria:

- Cromatografía de fase normal:

La fase estacionaria presenta puntos activos de alta polaridad y las interacciones que se producen con el soluto son específicas del grupo activo. La fase estacionaria puede ser un sólido adsorbente (sílice o alúmina), o bien, un soporte al que se unen químicamente moléculas orgánicas que presentan grupos funcionales de alta polaridad (ciano, amino, etc). ⁽¹⁾

- Cromatografía de fase reversa (inversa):

La fase estacionaria tiene una naturaleza apolar (cadenas hidrocarbonadas, grupos fenilo) y las interacciones que se producen son inespecíficas (efecto solvóforo) ⁽¹⁾

2.3. Instrumentación

Si bien es cierto que para realizar una cromatografía líquida tan solo es necesario disponer de las dos fases implicadas en el proceso y de la columna, la moderna cromatografía de líquidos de alta eficacia, debido al pequeño diámetro de las partículas de fase estacionaria que se utilizan, requiere de la utilización de unos dispositivos que constituyen el cromatógrafo. ⁽¹⁾

Los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos son:

- .- Dispositivo de suministro de eluyentes (bomba y dispositivo de mezclado de eluyentes).
- .- Dispositivo de inyección.
- .- Conducciones y conexiones.
- .- Detector y registrador.
- .- Columna.

Los componentes básicos de un cromatógrafo se muestran en la Figura 1. ⁽¹⁾

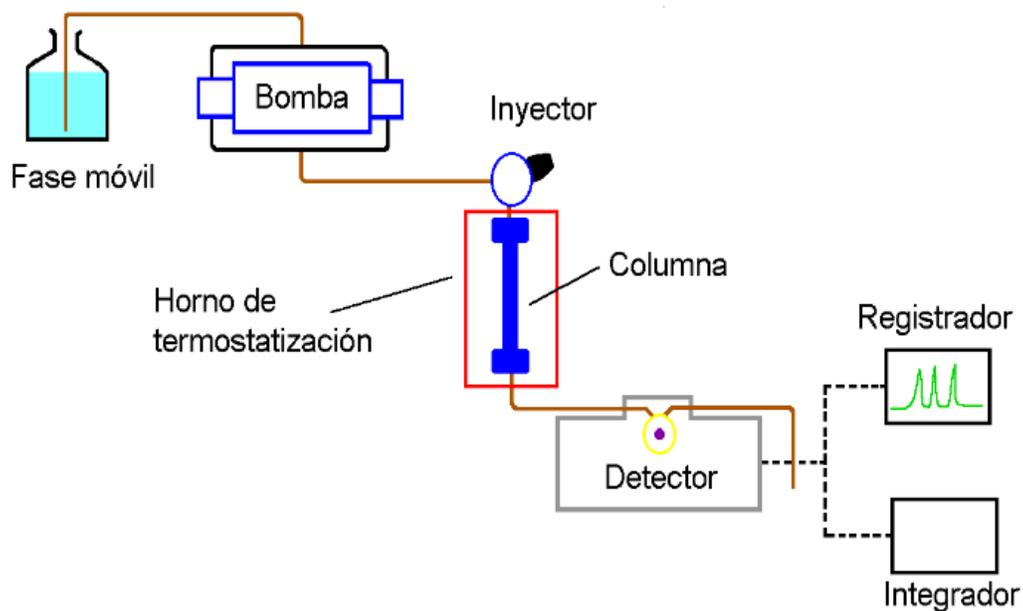


Figura 1.- Esquema de un cromatógrafo de líquidos

(<http://es.scribd.com/doc/19050563/Cromatografia-Principios-y-Aplicaciones>)

2.3.1. Sistema de suministro de fase móvil

2.3.1.1 La bomba

La misión de la bomba es la de suministrar un caudal constante y libre de pulsos de la fase móvil a través de la columna, sin que el flujo sea influido por la presión en cabeza de columna, ya que ésta puede variar por obstrucción de las líneas de conducción, del filtro de la cabeza de la columna, etc. Un sistema de bombeo ideal debe cumplir las siguientes características: ⁽¹⁾

- Estar construido con materiales químicamente inertes frente a la fase móvil.
- Ser capaz de trabajar a presiones elevadas.
- Proporcionar un flujo libre de pulsaciones o llevar asociado un amortiguador de éstas, ya que las pulsaciones, aunque no afectan a la separación en sí, pueden contribuir al ruido de fondo del detector y por lo tanto disminuir la sensibilidad. ⁽¹⁾

2.3.1.2 Sistemas de mezcla de fase móvil

En cromatografía de líquidos, es posible trabajar en dos modalidades; isocrático, cuando la fase móvil mantiene la misma composición durante la elución, y en gradiente, cuando la composición de la fase móvil cambia según una función dependiente del tiempo. ⁽¹⁾

Para trabajar en la modalidad de gradiente, es necesario que el equipo cromatográfico tenga un dispositivo capaz de realizar mezclas de disolventes con un control preciso y reproducible.

Los dos principales métodos de mezclado de los componentes de la fase móvil se conocen como mezclado a alta presión y mezclado a baja presión. ⁽¹⁾

2.3.1.3 Mezclado a alta presión

Este sistema de mezclado utiliza una bomba para cada uno de los disolventes que se van a mezclar, estando la salida de cada bomba conectada a una conexión en "T" o a una pequeña cámara de mezcla. La denominación de mezcla en alta presión es debida a que la mezcla se realiza una vez que los disolventes han pasado la bomba y, por lo tanto, han adquirido la presión de trabajo. Figura 2. ⁽¹⁾

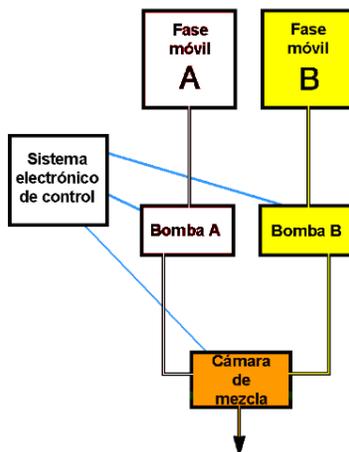


Figura 2. Sistema de mezcla en alta presión
([http://es.scribd.com/doc/19050563/Cromatografia-Principios-y-Aplicaciones.](http://es.scribd.com/doc/19050563/Cromatografia-Principios-y-Aplicaciones))

El mayor inconveniente de este sistema de mezcla, es el alto coste de las bombas si se requieren mezclas con un porcentaje inferior a un 5 % de uno de los componentes, ya que en este caso deben utilizarse bombas de alta precisión y, además, se necesita una bomba para cada uno de los disolventes a mezclar. Como ventajas, se pueden señalar una buena reproducibilidad de las mezclas, una rápida respuesta en los cambios de concentración y, además, la posibilidad de utilizar cada una de las bombas por separado para trabajar con sistemas isocráticos independientes. ⁽¹⁾

2.3.1.4. Mezclado a baja presión

En los equipos de mezcla en baja presión, el mezclado de los diferentes componentes se lleva a cabo antes de que éstos entren en la bomba (en la zona de baja presión del sistema), controlándose el caudal del sistema cromatográfico por medio de una sola bomba. El mezclado de los componentes se realiza por medio de válvulas porcentuales controladas por relés, que están calibradas para dar la mezcla adecuada. El dispositivo de control simplemente abre cada válvula durante un período de tiempo adecuado, que será función del porcentaje de cada componente que se precise en la mezcla. Como se muestra en la siguiente Figura 3. ⁽¹⁾

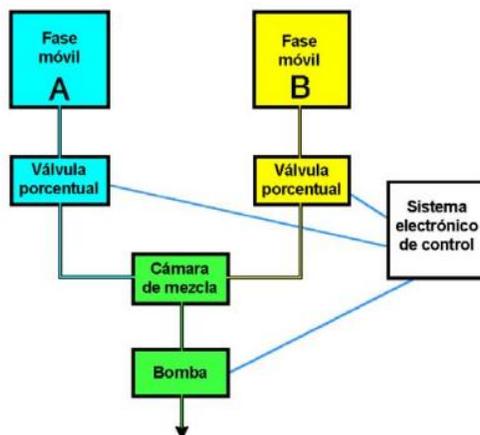


Figura 3. Sistema de mezcla en baja presión
(<http://es.scribd.com/doc/19050563/Cromatografia-Principios-y-Aplicaciones>.)

La principal ventaja de este tipo de mezclado, es que el coste del equipo se reduce considerablemente. El mezclado en baja presión permite la mezcla de dos o más componentes de la fase móvil con una buena reproducibilidad, aunque con unos tiempos de retardo algo mayores respecto a la mezcla en alta presión. Como principal desventaja, se tiene la baja reproducibilidad que se obtiene en mezclas donde uno de los componentes se encuentra en una proporción de menos del 5%.⁽¹⁾

2.3.1.5 Sistemas de inyección

El método de introducción de la muestra en HPLC, es de importancia capital, pues un mal sistema de inyección puede dar lugar a ensanchamientos de la banda cromatográfica que deterioren la eficacia del sistema cromatográfico.⁽¹⁾

Un inyector ideal debe tener las siguientes características:

- Introducir la muestra en la columna como una banda lo más estrecha posible.
- Ser de fácil manejo.
- Dar lugar a resultados reproducibles, tanto en la cantidad de muestra inyectada como en el ensanchamiento que origina en la banda cromatográfica.
- Ser capaz de trabajar a presiones elevadas.

Fundamentalmente existen dos tipos de inyectores manuales: los de jeringa y los de válvula.⁽¹⁾

2.3.1.5.1 Inyectores de jeringa

En este tipo de inyectores, la introducción de la muestra en la columna se realiza por medio de una jeringa cuya aguja entra en el sistema cromatográfico a través de una membrana ("septum"), lo que permite depositar la muestra en la cabeza de la columna. ⁽¹⁾

Las ventajas de este tipo de inyector, radican en su facilidad de construcción y en que permiten sacar todo el partido a la eficacia ofrecida por la columna; por el contrario, son inyectores que presentan una gran falta de reproducibilidad, tienen una presión de trabajo limitada y son de gran dificultad de manejo. ⁽¹⁾

2.3.1.5.2 Inyectores de válvula

Este sistema de inyección consiste en una válvula de seis vías, dos de las cuales están conectadas entre sí por medio de una espira ("loop"). Esta espira es un tubo de volumen conocido, cuya misión es la de contener la muestra antes de efectuarse la inyección. ⁽¹⁾

La introducción de la muestra en la columna se lleva a cabo en dos etapas; la primera se realiza a presión atmosférica, y consiste en cargar la muestra en la espira con ayuda de una jeringa; en la segunda, mediante un giro de la válvula, se hace pasar el eluyente a través de la espira hacia la columna. La inyección mediante válvulas es con mucho la más utilizada, ya que reúne prácticamente todas las características exigibles a un inyector. ⁽¹⁾

2.3.1.6 Conducciones y conexiones

Como ya es conocido, la presencia de volúmenes muertos es uno de los grandes problemas de los equipos de cromatografía de líquidos, ya que éstos dan origen a pérdidas en la eficacia del sistema y, por lo tanto, en la capacidad de separación. En particular, todas las conducciones y conexiones entre inyector y columna, y entre columna y detector son de la máxima importancia. ⁽¹⁾

El tubo de conducción puede considerarse como un volumen muerto del sistema y, por lo tanto, es de vital importancia la utilización para esta finalidad de tubos capilares en los que el diámetro interno sea pequeño y evitar al máximo posible la utilización de grandes longitudes de tubo de conexión; de este modo, se consigue reducir en la medida de lo posible el volumen muerto del sistema. ⁽¹⁾

También es importante conocer la naturaleza del tubo utilizado, ya que éste debe ser inerte frente a la fase móvil y las sustancias a separar; en general se utiliza un tubo de acero inoxidable, pero en casos especiales, se utilizan tubos de titanio (no sufren ataque por ión Cl⁻), y en otros casos, de materiales sintéticos (principalmente politetrafluoroetileno PTFE o mejor conocido como teflón). ⁽¹⁾

Las conexiones tienen la misma importancia que el tubo, ya que en ellas es también necesario el lograr eliminar la presencia de volúmenes muertos. Existen dos tipos de conexiones: las uniones, que se emplean para conectar tubos del mismo diámetro, y las reducciones, que se emplean para modificar el diámetro de la conducción encontrándose, por lo general, las reducciones únicamente en los extremos de la columna. En ambos casos, es imprescindible la eliminación de los volúmenes muertos. ⁽¹⁾

2.3.1.7 Detectores

Un detector para cromatografía es un dispositivo que permite medir, a la salida de la columna, una propiedad física del eluyente, que deberá depender de la composición de éste. La detección en cromatografía se realiza, habitualmente, en continuo, aunque es posible la utilización de colectores de fracciones para la identificación y cuantificación de pequeñas fracciones del eluyente. ⁽¹⁾

Las características de un detector para cromatografía, son principalmente:

- *Características que no afectan a la eficacia de la separación.*
- Respuesta.- Es la señal ofrecida por el detector ante una determinada variación de la propiedad física del eluyente que es medida. Esta propiedad debe ser proporcional a la variación de masa del soluto que sale de la columna o a su concentración.

- b) Detector de ultravioleta y/o visible.
- c) Detector de fluorescencia.
- d) Detector de conductividad eléctrica.
- e) Detector electroquímico.

Fundamentos

El detector de índice de refracción, es el detector de uso corriente de respuesta más universal. ⁽¹⁾

El índice de refracción es una característica física definida de todos los compuestos. ⁽¹⁾

La detección se basa en equilibrar el detector, a caudal constante, con fase móvil pura y medir el cambio de índice de refracción cuando aparece la muestra eluida junto con la fase móvil. ⁽¹⁾

Resulta obvio que cuanto mayor sea la diferencia entre los índices de refracción de la muestra y de la fase móvil, mayor será el desequilibrio, por tanto, la máxima sensibilidad se obtendrá cuando exista una diferencia máxima entre los respectivos índices de refracción. Sin embargo, aparecen ocasionalmente algunos problemas al efectuar la elección de un sistema de fase móvil, que sea compatible con el tipo de separación y con los componentes del instrumento, para que su índice de refracción sea diferente del de la muestra. ⁽¹⁾

Por otra parte, en mezclas complejas, los índices de refracción de los componentes de la mezcla pueden cubrir un amplio intervalo de valores y algunos de ellos pueden ser muy cercanos al de la fase móvil, con lo que resultarán invisibles para el detector. ⁽¹⁾

Otro inconveniente de la detección por índice de refracción, es la necesidad de reequilibrar el detector cada vez que se produce un pequeño cambio en la composición de la fase móvil.

Este factor resulta muy limitativo, puesto que convierte al detector de índice de refracción en inutilizable en las separaciones con elución por gradiente, en las que la composición de la fase móvil cambia durante el análisis; por supuesto, es posible intentar la preparación de mezclas de disolventes de alta y baja polaridad, mezclados cuidadosamente para mantener igual el índice de refracción a lo largo de todo el análisis, pero resulta sumamente difícil de realizar a menos que se trabaje solamente a baja sensibilidad. ⁽¹⁾

El índice de refracción de un compuesto es función de su densidad molecular. Una variación en la densidad se traduce en un cambio en el índice de refracción, por lo que un refractómetro es sensible a los cambios en la concentración de la muestra o del eluyente, a los cambios de presión y a los de temperatura, ya que todos ellos dan lugar a cambios en la densidad. ⁽¹⁾

Un detector de índice de refracción apropiado para su uso en HPLC debe ser sensible a un cambio del índice de refracción del orden de 10^{-7} unidades (correspondiente a un cambio en la concentración de 1 ppm). La presencia de aire disuelto, los cambios en la composición del disolvente, un mezclado incorrecto o el arrastre de fase estacionaria de la columna, provocan deriva de la línea de base. ⁽¹⁾

Un líquido orgánico de los normalmente utilizados como fase móvil, sufre una variación de 1×10^{-6} unidades de índice de refracción al variar la presión en 1 atm (15 psi), y de 6×10^{-8} unidades de índice de refracción al variar la temperatura en 1 °C; por tanto, es evidente que estas condiciones deben controlarse con precisión, en especial la temperatura. Para trabajar a gran sensibilidad, un detector de índice de refracción debe estar termostatzado en $\pm 0,01^\circ\text{C}$, mediante un baño de agua conectado a la cabeza del detector, o bien, alternativamente, debe poseer una camisa de gran volumen que establezca la temperatura. ⁽¹⁾

Los detectores comerciales normalmente llevan un tubo de pequeño calibre en su entrada que permite estabilizar la temperatura del material que eluye antes de que penetre en la celda. ⁽¹⁾

b) Detectores de ultravioleta/visible

Fundamentos

Cuando se hace pasar una radiación electromagnética a través de compuestos que presentan determinados grupos funcionales, éstos experimentan una excitación electrónica a causa de la absorción de energía, a una longitud de onda que será específica para cada grupo funcional. Esta energía, provoca el paso de un electrón desde el estado fundamental hasta un nivel de energía superior. ⁽¹⁾

La absorción de energía, se traduce en una disminución de la intensidad del haz luminoso que se ha hecho pasar a través de la muestra, pudiéndose medir esta disminución de intensidad haciendo incidir el haz sobre una fotocélula. En los detectores de absorción ultravioleta, la línea de base representa la máxima transmisión de luz, y cualquier desviación de ella indicará pérdida o absorción de radiación. ⁽¹⁾

La utilización de la absorción de luz ultravioleta o visible para el control de una corriente líquida y analizar los distintos componentes que lleva en disolución, es una extensión natural de la espectrofotometría. Al contrario de lo que ocurre con el índice de refracción, la absorción UV o visible es un parámetro específico para cada compuesto, ya que éste debe presentar una absorción adecuada en alguna región del espectro o, en su caso, debe combinarse con un reactivo adecuado para formar un derivado que presente absorción. ⁽¹⁾

La posibilidad de realizar el control de una corriente líquida por medio de su absorción a una determinada longitud de onda es muy sencilla de evaluar, ya que las características de la absorción UV de una determinada muestra se pueden conocer por medio de trabajos previos en este tipo de detectores, o bien pueden obtenerse fácilmente registrando su espectro de absorción en un espectrofotómetro. ⁽¹⁾

Cuando la muestra no absorbe la radiación por si misma, el hallar un reactivo adecuado que dé lugar a un derivado coloreado para poder medir la absorción en visible, requiere mucho más trabajo químico, aunque el procedimiento final de evaluación sea el mismo. ⁽¹⁾

La mayoría de los compuestos orgánicos pueden analizarse por cromatografía líquida utilizando detectores de UV-visible. Se considera que, por lo menos, el 65 % de las muestras analizadas por CLAE presentan alguna absorción en la zona de 254 nm (longitud de onda con la que trabajan la mayoría de los detectores de longitud de onda fija de uso general), y más del 90% absorben en algún punto del espectro que cubren los algo más sofisticados detectores de longitud de onda variable. Este hecho, junto con la relativa sencillez de su manejo, hace que el detector de UV sea el más útil y el más ampliamente utilizado de los detectores de CLAE. ⁽¹⁾

c) Tipos de detectores UV/VIS

* Detectores de longitud de onda fija.

La fuente luminosa más corrientemente utilizada en los detectores de UV, emite la mayor parte de la energía a una longitud de onda fija de 253,7 nm. Es posible seleccionar, por medio de filtros adecuados, una de las longitudes de onda, retirando las de emisión más débil. La mayoría de los detectores que trabajan con longitud de onda fija, utilizan la línea de 254 nm, que presenta una gran estabilidad y emisión y permite obtener una alta sensibilidad, pudiéndose medir incluso cantidades por debajo del nanogramo en sustancias que presenten una gran absorción. ⁽¹⁾

El espectrofotómetro de 254 nm, ha sido el detector de bajo coste más ampliamente utilizado en HPLC, ya que la mayoría de los compuestos que absorben en UV presentan cierta absorción a esta longitud de onda.

Muchos detectores de longitud de onda fija también ofrecen la posibilidad de utilizar otros filtros, lo que permite una utilización limitada del detector a otras longitudes de onda para la detección de aquellos compuestos que no presentan absorción a 254 nm, pero que sí absorben en algún otro punto del espectro ultravioleta; sin embargo, la estabilidad de la línea de base y la intensidad de la señal que se obtiene al trabajar con estas líneas más débiles, no suelen ser nunca comparables a las que se obtienen con la línea de 254 nm. ⁽¹⁾

* Detectores de longitud de onda variable.

Los detectores de longitud de onda variable son particularmente útiles en tres casos:

En el caso de que pueda obtenerse una mejor sensibilidad a una longitud de onda distinta de 254 nm o de otras longitudes de onda para las que existen filtros.

Figura 5. ⁽¹⁾

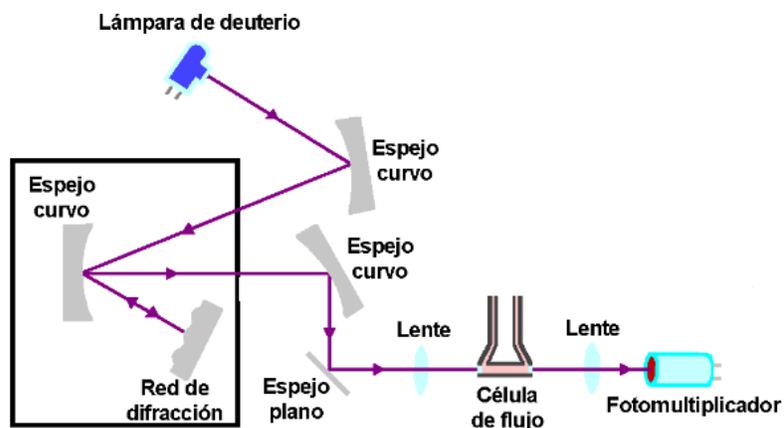


Figura 5. Detector UV/VIS de longitud de onda variable
([http://es.scribd.com/doc/19050563/Cromatografía-Principios-y-Aplicaciones.](http://es.scribd.com/doc/19050563/Cromatografía-Principios-y-Aplicaciones))

En el caso de que los distintos componentes de la muestra presenten gran absorción a diferentes longitudes de onda y, por tanto, el trabajo a una única longitud de onda reduzca la sensibilidad e incluso pueda resultar imposible la detección de algunos de los componentes de la muestra. ⁽¹⁾

En el caso de que se desee una operación con paro del flujo combinada con un registro del espectro completo de los picos.

Los modernos detectores de UV son capaces de trabajar a cualquier longitud de onda comprendida entre 190 y 900 nm.

d) Detectores de fluorescencia.

Fundamentos

El fenómeno de fluorescencia tiene lugar cuando compuestos que poseen determinados grupos funcionales específicos, se excitan con la energía de ciertas longitudes de onda y emiten radiación de mayor longitud de onda que la absorbida.⁽¹⁾

En fluorescencia, la radiación emitida se mide normalmente, con objeto de evitar interferencias, en dirección perpendicular a la de incidencia del haz de excitación. Naturalmente la posibilidad real de detectar por fluorescencia grupos químicos específicos, es función de las longitudes de onda seleccionadas, tanto la de excitación como la de emisión.⁽¹⁾

Los detectores de fluorescencia representan el tercer tipo de detectores más comúnmente utilizados en la cromatografía líquida moderna. Para los compuestos que presentan fluorescencia natural, así como para los que pueden convertirse en fluorescentes por medio de una derivatización simple, es el tipo de detección más sensible que se puede aplicar de rutina a la CL; normalmente la sensibilidad del detector de fluorescencia es 1.000 veces mayor que la del detector UV, para compuestos con absorción UV intensa, y la sensibilidad del detector UV es, por su parte, 1.000 veces mayor que la del detector de índice de refracción.⁽¹⁾

En la detección por fluorescencia, además de aumentar la sensibilidad, también aumenta la especificidad. Los detectores de fluorescencia son los más específicos de todos los detectores ópticos, lo que se usa ventajosamente para la

determinación de especies con una fluorescencia específica en muestras complejas; de hecho, una de las mayores ventajas potenciales de la detección por fluorescencia, en especial si se usa instrumentación que permita efectuar tanto barridos de excitación como de emisión, reside en la posibilidad de proporcionar datos para la identificación de los picos a través de sus espectros de excitación y de emisión, utilizando técnicas de registro con paro de flujo.

Los espectros de excitación y de emisión de una sustancia, proporcionan una gran cantidad de información; con instrumentación sofisticada, que permita obtener los espectros corregidos, se puede llegar a realizar una interpretación estructural de los espectros de fluorescencia, lo que permite llegar a la identificación de los compuestos que eluyen de la columna. ⁽¹⁾

e) Detectores electroquímicos.

Fundamentos

Este tipo de detectores, están basados en la oxidación del analito eluido mediante un electrodo adecuado, registrándose la intensidad de la corriente, mantenida mediante la electrolisis de los analitos, a lo largo del cromatograma. La detección en este caso está basada en el conocido polarógrafo de gota de mercurio; este instrumento consta de un par de electrodos a los que se aplica un potencial de oxidación (potencial de semionda) suficiente para crear una corriente de difusión. Puesto que la cantidad de corriente es una medida directa de la concentración de analito en un momento dado, el proceso es cuantitativo. ⁽¹⁾

Para poder aplicar esta técnica a la detección en cromatografía líquida, se han desarrollado nuevos materiales para los electrodos y se han diseñado cubetas de electrolisis de escaso volumen y con geometrías muy eficaces.

Como electrodos de medida, se utilizan los de pasta de carbón, carbón pulimentado y amalgama de oro y mercurio, normalmente con un contraelectrodo de plata-cloruro de plata. ⁽¹⁾

El campo de aplicación de la detección electroquímica no es tan extenso como el de la detección por índice de refracción, UV/VIS o fluorescencia. Su gran especificidad y su elevada sensibilidad (de 50 a 100 veces mayor que en los otros tipos de detectores) convierte a esta técnica de detección en un medio muy útil para el análisis de mezclas complejas, tales como los fluidos biológicos y los extractos de muestras naturales.

La sensibilidad de estos detectores para compuestos tales como el fenol, las nitrosaminas y muchos ácidos orgánicos es del orden del picomol (nanogramo).⁽¹⁾

A pesar de sus ventajas, los detectores electroquímicos presentan también una serie de limitaciones; básicamente, estas son:

La fase móvil debe ser conductora de la corriente eléctrica, lo cual normalmente se consigue por adición de una sal adecuada. Esto limita o impide la realización de muchas separaciones en fase normal, en las que se utiliza hexano u otras fases móviles apolares. Las cromatografías de intercambio iónico y de fase reversa, son dos buenos campos de aplicación para estos detectores. Sin embargo, no debe olvidarse que la adición de sales a la fase móvil puede provocar cambios en la cromatografía.⁽¹⁾

La fase móvil debe ser purgada de oxígeno, contaminantes metálicos y haluros, para reducir la corriente de fondo y, por tanto, el ruido y la deriva de la línea de base.

Los componentes de las muestras deben ser oxidables, a un valor de potencial que no dé lugar también a electrolisis en la fase móvil o en los restantes componentes de la muestra.⁽¹⁾

f) Detector de conductividad electrolítica

En los detectores de conductividad electrolítica se mide de manera continua la conductividad de la fase móvil que eluye de la columna, indicándose la presencia de un analito por medio de un cambio en la conductividad.⁽¹⁾

Para la utilización de esta técnica como sistema de detección cromatográfico, la célula de inmersión utilizada normalmente para medir conductividad, se substituye por una célula de flujo de pequeño volumen, registrándose continuamente las variaciones en la conductividad de la fase móvil. La respuesta de los detectores conductimétricos es lineal frente a la concentración en un intervalo muy amplio, de manera que es posible cuantificar la señal de salida por medio de una correcta calibración preliminar.

Los mejores resultados con este detector se obtienen en los análisis isocráticos, ya que los gradientes dan lugar a una deriva proporcional en la línea base. ⁽¹⁾

Uno de los inconvenientes de los detectores de conductividad electrolítica, es su inestabilidad debido a variaciones térmicas de la cubeta, por lo que son necesarios buenos sistemas de termostatación. Estos detectores se han utilizado con éxito en cromatografía de intercambio iónico. ⁽¹⁾

2.4 La Columna

La columna es el elemento fundamental de un cromatógrafo de líquidos, puesto que es en ella donde tiene lugar la separación; por lo tanto, resulta fundamental una correcta elección de la columna adecuada para cada separación, ya que con una columna inadecuada o de mala calidad nunca se obtendrán buenos resultados aunque se disponga del mejor instrumental. ⁽¹⁾

Las columnas más utilizadas en cromatografía de líquidos son las de relleno; estas columnas consisten en un tubo, generalmente de acero, relleno de una fase estacionaria adecuada al tipo de separación que se pretende llevar a cabo. El diámetro interno varía entre 2 y 60 mm dependiendo su utilización, a escala analítica o semipreparativa, y su longitud varía entre 5 y 30 cm. Las características de la columna que influyen sobre su capacidad de separación son:

- Diámetro interno
- Longitud
- Conexiones (reducciones)
- Relleno
- Tamaño de partícula del relleno



Figura 6. Columna cromatográfica

2.4.1 Diámetro de la columna

La elección del diámetro interno de la columna se realiza en función de la cantidad de muestra a separar. Para las separaciones a escala analítica (algunos microgramos de muestra por inyección) se suelen usar columnas de pequeños diámetros (1 a 6 mm) mientras que en los trabajos a escala preparativa se superan los 10 mm de diámetro interno.

Esta selección de diámetros se debe a la pérdida de eficacia, por sobrecarga de la columna, cuando se inyecta una masa excesiva de solutos a separar. Se ha comprobado empíricamente que en fase normal, la sobrecarga comienza a partir de 50 μg de muestra por gramo de relleno, mientras que en fase reversa es necesario sobrepasar los 100 $\mu\text{g/g}$ de relleno; parece lógico, por tanto, pensar que mayores diámetros de columna, manteniendo iguales los restantes parámetros, permitan separar mayores cantidades de muestra sin variación de la eficacia del sistema. ⁽¹⁾

El inconveniente de las columnas de gran diámetro consiste en el elevado consumo de disolventes, puesto que se necesitan flujos elevados para conseguir la misma velocidad lineal de eluyente que en las de pequeño diámetro.

Las columnas analíticas de más amplio uso suelen tener 4,6 mm de diámetro interno. ⁽¹⁾

2.4.2 Longitud de la columna

Como se puede comprobar en las ecuaciones que rigen los procesos cromatográficos, la eficacia de la columna depende, entre otros factores, de la longitud de la columna y, a igualdad de otros parámetros, mayores longitudes de la columna permitirán obtener mayores eficacias. Por otra parte, debe tenerse en cuenta que, a mayor longitud de la columna, la presión en cabeza se eleva considerablemente, por lo que hay que alcanzar un compromiso, a la hora de seleccionar la columna, entre eficacia y caída de presión. ⁽¹⁾

Las columnas de cromatografía líquida en ningún caso pueden tener longitudes extremadamente grandes; se ha comprobado que para tamaños de partícula de 10 a 5 μm , resulta difícil conseguir empaquetar buenas columnas de longitud superior a 30 cm; para tamaños de partícula de 3 μm , la longitud de la columna no podrá ser superior a 20 cm sin riesgo de que la presión en cabeza de columna sea excesivamente elevada. ⁽¹⁾

2.4.3 Conexiones

Dispositivos que conectan componentes de sistemas de cromatografía; se incluyen microfiltros de precolumna, conectores sin bridas, tuercas, uniones, codos, uniones en T, cruces, así como conectores multipuerto, uniones, empalmes, tapas, reductores y tapones. ⁽¹⁾

2.4.4 Relleno

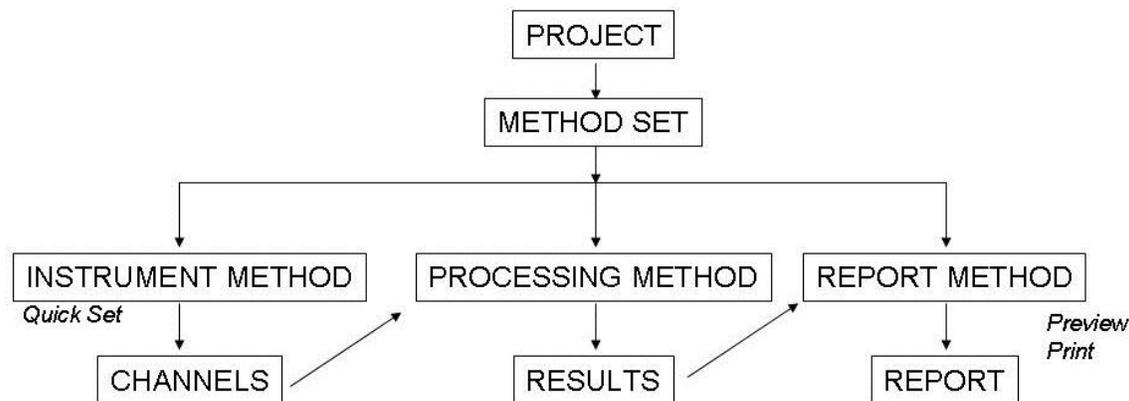
C18 para la mayoría de las muestras, maximiza la retención desde compuestos moderadamente polares hasta compuestos apolares. Deberían considerarse fases de cadenas más cortas si no puede optimizarse la resolución con una fase C18 o si está analizando moléculas más grandes. ⁽¹⁾

2.4.5 Tamaño de partícula del relleno

La elección del tamaño de partícula del relleno se basa en primer lugar, en el tamaño de moléculas que vayan a analizarse. Las moléculas pequeñas típicas pueden difundir fácilmente la entrada y salida de rellenos de tamaño de poro 80 Å. ⁽¹⁾

2.5 Empower™

El sistema cromatográfico de Empower™ es una aplicación desarrollada y estructurada con una base de datos, lo cual le confiere características únicas de operación. Figura 6



De este proceso se generan dos tipos de información:

Métodos:	Datos:
-Instrument Method	-Channels
-Processing Method	-Results
-Report Method	-Curvas de calibración
-Method Set	

Figura 7. Estructura base de Datos Empower^{TM(17)}

Como se puede observar, el Proyecto es la unidad fundamental de trabajo dentro del sistema, por lo que es necesario entenderlo con certeza. Un Proyecto es la unidad Básica de administración y almacenamiento de información en EmpowerTM, físicamente es una porción del disco duro que se reserva para almacenar la información cromatográfica obtenida durante un análisis. El tamaño de este espacio se define durante la creación del proyecto, una característica importante de este tamaño es que una vez establecido se puede hacer más grande. La forma en que se almacena la información cromatográfica tiene una particularidad por el hecho de funcionar como una base de datos: los identificadores de la muestra tales como el nombre, el número de inyección, el número de vial, etc., se encuentran almacenados dentro del proyecto, pero la información cromatográfica cruda se encuentra almacenada fuera del proyecto.

Los recursos de EmpowerTM para la manipulación y búsqueda de la información se denominan:

* Proyectos (Projects): área de almacenamiento de información agrupada con un objetivo particular.

- * Views: Ayuda visual para identificar la información dentro del proyecto.
- * Filtros (filters). Criterios de búsqueda de información dentro del Proyecto.

- * Campos (Fields). Parámetros de identificación de la información (adquisición, cálculo, impresión, modificación).

La Jerarquía de Uso es una característica de Empower™, existiendo usuarios con diferentes privilegios:

- Nivel 1 Administrador del Sistema (System Administrator)
- Nivel 2 Químico (Chemist)
- Nivel 3 Analista (Analyst)
- Nivel 4 Invitado (Guest)

La interfaz de Empower™ está diseñada para maximizar la productividad y mejorar la adquisición, el procesamiento y la impresión de los datos cromatográficos. Entre sus funciones se incluyen:

- Informes personalizables.
- Cálculos personalizados integrados.
- Datos relacionales para que todos sus metadatos sean trazables hasta los datos originales.
- Flujo de trabajo para diferentes usuarios y diferentes análisis.

Empower™ incrementa las posibilidades de administrar la integridad de los datos, las funciones de seguridad avanzadas y los registros de cambios para auditoría alcanzan nuevos niveles. Las firmas electrónicas permiten automatizar el flujo de trabajo del laboratorio y para su tranquilidad en cuanto a la seguridad, la integridad de los datos y las auditorías.⁽¹⁷⁾

2.5.1 La adquisición, el procesamiento de datos y la generación de informes

Diseñado para un entorno de laboratorio regulado con seguridad de datos, Empower™ ayuda a mejorar la eficacia y la seguridad en el trabajo de laboratorio:

- Almacenar y recuperar datos cromatográficos mediante una base de datos relacional integrada; la recuperación de datos es más simple utilizando criterios significativos para el usuario.
- Ahorra tiempo, reduce la integración manual y calcula con mayor precisión la integración de los picos con el algoritmo ApexTrack™ de Empower™.
- Controla fácilmente los sistemas ACQUITY UPLC® y Alliance® HPLC de Waters, así como sistemas de HPLC*, GC*, PDA* y MS* de otros fabricantes.
- Aumente la capacidad de detección con los detectores de masas de Waters o el Detector de matriz de fotodiodos (PDA) de Waters.
- Cambie fácilmente de una estación de trabajo individual a un sistema interconectado con la intranet de toda la empresa, gracias a la arquitectura modular escalable de Empower™. ⁽¹⁷⁾

2.5.2 Opciones que se adaptan a su forma de trabajar

Con el software Empower™ es posible realizar varias tareas con facilidad y sin necesidad de utilizar diversos paquetes de software. Tres interfaces intuitivas ayudan al personal del laboratorio a trabajar de manera más eficiente. ⁽¹⁷⁾

- Permite adquirir datos y controlar diversos instrumentos, como HPLC, UPLC* y GC.
- Es posible aplicar técnicas de detección avanzadas, como MS y PDA, sin tener que recurrir a terceros.
- Utilice aplicaciones como test de disolución, validación de métodos, estructuras químicas integradas y análisis de polímeros o de exclusión por tamaño.

El software Empower™ representa un cambio fundamental en la facilidad de uso de los sistemas de UPLC®, HPLC y LC/MS. ⁽¹⁷⁾

Empower™ está equipado con opciones de interfaz singulares diseñadas para laboratorio, independientemente de la tarea o del nivel de capacitación del usuario.

Cuando los usuarios inician una sesión, se les presenta la aplicación que ofrece el flujo de trabajo adecuado para ellos. Si están autorizados, los usuarios pueden seleccionar otra interfaz de software adecuada para su tarea actual. ⁽¹⁷⁾

2.6 Suspensiones

Las suspensiones orales son preparadas que contienen partículas del fármaco (p.a) finamente divididas y distribuidas en forma uniforme en un vehículo en el cual el fármaco es insoluble o de solubilidad mínima. ^(28,29)

En su mayoría son preparaciones acuosas, con cierta viscosidad y con agentes aromatizantes y edulcorantes. Entre las ventajas para hacer preparaciones farmacéuticas en forma de suspensiones orales están:

1. Permite administrar fármacos que son inestables en disolución, pero químicamente estables cuando se formulan en suspensión. ^(28,29)
2. Emplean fármacos poco solubles en agua que no pueden formularse que, por cuestiones de inestabilidad química, en los disolventes habituales utilizados en los fármacos líquidos orales. ^(28,29)
3. El sabor desagradable de ciertos fármacos se supera o minimiza al formularlos como partículas no disueltas en suspensión, pues su sistema físico-químico es una forma de dosificación palatable. ^(28,29)
4. Fármacos muy amargos se formulan en forma de sales insolubles e insípidas en suspensiones que son mejor aceptables por el paciente que fármaco en su forma libre. ^(28,29)
5. Posibilidad de conseguir una disolución lenta e incluso controlada, que proporciona niveles sanguíneos del fármaco a través del tiempo; lo cual es

posible mediante una adecuada selección del fármaco y de las sustancias auxiliares. ^(28,29)

6. Se puede aumentar la estabilidad y retrasar el proceso de sedimentación, manteniendo reducido el tamaño de las partículas y la uniformidad de los mismos de los productos sólidos que se encuentran en suspensión. ^(28,29)

Una definición formal de suspensión es la siguiente:

Suspensión: Es un sistema disperso compuesto de dos fases, las cuales contienen el o los principios activos y los aditivos. De las dos fases una de ellas se conoce como la fase externa o continua y generalmente es un líquido (o semisólido); y la otra fase es la interna o fase dispersa que está constituida de sólidos insolubles (p.a) pero dispensables en la fase externa. ^(28,29)

Las suspensiones se preparan para uso interno o para ingerirse, cuando:

La toma de sustancias pulverizadas presenta dificultades.

Las sustancias pulverizadas pueden mejorarse por sustancias líquidas.

Han de tomarse simultáneamente con el polvo, medicamentos líquidos.

Suspensiones para uso externo, son generalmente utilizados en dermatología ya que los sólidos se adhieren mejor a la piel usando una suspensión en vez de polvos tópicos. ^(28,29)

La dispersión de los sólidos se ve afectado por la interacción entre las partículas del sólido, lo que da lugar a lo que se conoce como Defloculación y Floculación.

Defloculación: Se produce cuando las fuerzas de repulsión entre dos partículas son mayores que las de atracción y en consecuencia se produce la dispersión es decir las partículas se dispersan. ^(28,29)

Floculado o Floculación: Es la formación de flóculos que se produce como resultado de la aproximación entre las partículas, cuando las fuerzas de atracción entre ellas predominan ante unas fuerzas de repulsión suficientemente disminuidos. ^(28,29)

Las propiedades de las partículas floculadas y defloculadas en suspensión se presentan a continuación. ^(28,29)

Defloculadas

1. Las partículas existen en suspensión como entidades separadas.
2. La velocidad de sedimentación es baja, dado que cada partícula sedimenta por separado y el tamaño de las partículas es mínimo. ^(28,29)
3. Un sedimento en forma lenta.
4. El sedimento se hace finalmente muy compacto, debido al peso de las capas superiores de material sedimentado. Las fuerzas de repulsión entre partículas son superadas y se forma una pasta dura que es difícil o imposible de resuspender. ^(28,29)
5. La suspensión tiene un aspecto agradable, dado que el material suspendido permanece así por un tiempo relativamente largo. El sobre nadante también permanece turbio, aun cuando hay un sedimento visible. ^(28,29)

Floculadas

1. Las partículas forman Flóculos.
2. La velocidad de sedimentación es alta, porque las partículas sedimentan en flóculos, que son grupos de partículas.
3. Un sedimento se forma rápidamente.
4. El sedimento es poco compacto, y tiene una estructura enrejada. Las partículas no se unen fuertemente unas con otras y no se forma una pasta dura y densa. El sedimento es fácil de redispersar, con lo cual se vuelve a formar la suspensión original. ^(28,29)

5. La suspensión es un poco desagradable, debido a la rápida sedimentación y a la presencia de una región de sobrenadante clara evidente. Esto puede atenuarse si se aumenta el volumen del sedimento. Idealmente, el volumen del sedimento debe incluir el de la suspensión. ^(28,29)

En las preparaciones de suspensiones se hace uso de agentes floculantes para lograr la floculación. El agente floculante lo que hace es una adsorción de aniones a la partículas defloculadas en suspensión, cargadas positivamente. ^(28,29)

La velocidad a la cual se produce la floculación es importante para la estabilidad de las dispersiones suspendidas. La rapidez o la lentitud de ese proceso dependen de la presencia o ausencia de una barrera repulsiva entre partículas adyacentes. En un sistema mono disperso, la ausencia de tal barrera, produce floculación rápida. ^(28,29)

Los efectos que se producen en cada uno de los sistemas, floculado o defloculado, son:

Sistema floculado

* Flóculos tienden a caer juntos, lo que permite observar de manera fácil, un límite definido entre el sedimento y el sobrenadante. ^(28,29)

* Las partículas muy finas, son atrapadas en los flóculos.

Sistema Defloculado:

En este tipo de sistema con una determinada distribución del tamaño de partículas, las más grandes sedimentan más rápido. Las más pequeñas permanecen suspendidas por un tiempo considerable y no se forma una separación definida entre el sobrenadante y el sedimento. ^(28,29)

Suspensiones Ideales

La formulación de una suspensión que posee estabilidad física, depende de que las partículas en suspensión sean floculadas o permanezcan defloculadas.

Para la dispersión de las partículas se utilizan agentes tensoactivos o humectantes que mantiene dispersas las partículas en el vehículo, en forma defloculadas. ^(28,29)

Para tal fin se puede agregar una solución concentrada del humectante, para después diluirlo con el vehículo, se puede usar alcohol o gelatina en la cantidad mínima necesaria, pues cantidades excesivas pueden provocar formación de espumas, o provocar un olor y sabor desagradable. ^(28,29)

La formulación ideal parece darse cuando partículas floculadas se apoya en un vehículo estructurado. Este proceso involucra la dispersión de partículas y su subsecuente floculación; por último, se añade un polímero liófilo para formar al vehículo estructurado. ^(28,29)

Como consideración especial se deben ver las incompatibilidades entre el agente floculante y el polímero usado como vehículo estructurado. ^(28,29)

Vehículos Estructurados:

Estos están conformados por aquellas soluciones acuosas de polímeros que se añaden a la formulación, en las que se apoyan las partículas floculadas donde parece darse la formulación ideal. Estos polímeros pueden ser Metilcelulosa, Carboximetilcelulosa, bentonita y carbopol. ^(28,29)

La consistencia depende de la concentración y la sedimentación disminuye al aumentar la viscosidad. ^(28,29)

Floculación Controlada:

El control de la Floculación se logra añadiendo una cantidad tal de floculante que de cómo resultado un volumen máximo de sedimentación. ^(28,29)

Para tal propósito se toma la dispersión de partículas defloculadas humectadas y para lograr la floculación se agrega un agente floculante, como los electrolitos; éstos al reducir la repulsión entre partículas permiten la formación de flóculos. (28,29)

Propiedades Deseables de la Suspensiones orales.

1. Que las partículas dispersas deben ser pequeñas entre 1 y 50 micras.
2. Las suspensiones deben ser de facil redispersión cuando se agitan moderadamente, y deben reconstituirse adecuadamente.
3. La viscosidad debe ser estable
4. Físicamente las suspensiones deben estar estables.
5. La dosis del p.a debe ser uniforme
6. Las características organolépticas deben ser correctas.
7. Debe mantener uniformidad en el contenido. (28,29)

Componentes de las Suspensiones Orales:

Las suspensiones orales se presentan listas para su uso y administración o bien para ser preparadas en forma extemporánea en el momento de su administración. (28,29)

Las preparaciones de suspensiones extemporáneas responden a problemas de inestabilidad del fármaco, comodidad de los sobres monodosis para el paciente a cuestiones de tipo económico. (28,29)

Los componentes sólidos en este tipo de suspensión (extemporánea) se presentan como un polvo o granulado en un frasco aforado, para añadir agua potable hasta el volumen indicado. (28,29)

En las suspensiones extemporáneas, el producto sólido suele ser una mezcla del fármaco con sustancias auxiliares que mejoran la estabilidad de los productos sólidos, o bien de la suspensión final. ^(28,29)

Son habituales el uso de sustancias auxiliares tales como:

Agentes Suspensores: Goma arábiga, xantan o derivados de la celulosa.

Como Estabilizantes: El ácido cítrico, el citrato sódico.

Como Edulcorantes: El azúcar y la sacarina sódica.

Como Conservantes: El Metilparabén, el propilparabén y el benzoato sódico.

En estas suspensiones extemporáneas puede prescindirse del agente floculante ya que no llegan a formarse sedimentos compactos de difícil re dispersión. Para mejorar el sabor y el aspecto pueden incorporarse otras sustancias como son los agentes aromatizantes y colorantes. ^(28,29)

El vehículo suele ser agua purificada, jarabe u otro líquido apropiado. La reconstitución se logra mezclando el producto sólido y el vehículo y luego agitando hasta conseguir una suspensión homogénea. ^(28,29)

En relación con las suspensiones orales que están listas para su administración, sus componentes son el fármaco, el vehículo y las sustancias auxiliares.

Entre estos últimos podemos destacar los agentes viscosantes, los tensioactivos, los coloides hidrófilos, los disolventes, los electrolitos, los agentes floculantes, los conservantes, los aromatizantes y los colorantes. ^(28,29)

En general, se puede resumir que los componentes de las suspensiones están constituidos por el fármaco ó droga y los agentes que se añaden para unificar la droga, controlar la floculación, la viscosidad, ajustar el pH, y la selección del medio externo, que por lo general es agua. Además, se utilizan agentes aromatizantes, edulcorantes, colorantes y agente conservador.

Agentes Humectantes: El objetivo del uso de un Humectante es permitir el desplazamiento del aire del material hidrófobo, para que el líquido rodee a las partículas y posibilite así una buena dispersión. ^(28,29)

Floculantes: El agregar un floculante es para lograr la formación del flóculo (Ej.: electrolitos de NaCl, KCl) ^(28,29)

Viscosantes: La elección de uso de viscosantes dependerá del tipo de uso a que destinará la suspensión, (interno o externo), de la infraestructura para su preparación y de la duración del periodo de conservación. ^(28,29)

Algunos viscosantes usados son las gomas naturales (goma arábica), los derivados de la celulosa (carboximetilcelulosa). A concentraciones mayores de 1% actúan como coloides protectores y a mayor concentración, mayor viscosidad y velocidad de sedimentación baja. ^(28,29)

Buffer: La elección del uso de un buffer está determinada si la droga contiene grupo ionizables, con el fin de mantener una baja solubilidad de la droga.

También se usa para controlar la ionización de conservadores y agentes viscosantes, o para mantener el pH. ^(28,29)

Fase Externa: Para la formación de la fase externa de la suspensión generalmente se utiliza el agua; y su elección está en dependencia del uso que se dará a la suspensión (interno o externo). ^(28,29)

Sirve para controlar la solubilidad, densidad, estabilidad y el sabor.

También se puede utilizar líquidos polares como el alcohol, la glicerina; y líquidos, no polares como hidrocarburos alifáticos; así como también se pueden usar ésteres grasos. ^(28,29)

Fabricación de los componentes de las suspensiones orales.

A nivel piloto se emplea el mortero y el pistilo, ya que algunas veces se requiere reducir el tamaño de las partículas del fármaco. Incluso algunas veces se tiene que tamizar los polvos para uniformar el tamaño requerido para la dispersión. ^(28,29)

Dispersión Uniforme de partículas en el Vehículo

Las partículas del fármaco deben ser insolubles y estar dispersadas en el vehículo elegido de manera homogénea. Esto asegura una dosis uniforme. ^(28,29)

Humectación: Se debe humectar el polvo insoluble para desplazar el aire en la superficie de las partículas. ^(28,29)

En vista de que muchos fármacos con Hidrófos, no son fácilmente humectables, por lo cual es necesario emplear un líquido acuomisible con tensión baja o agregar un humectante al agua para reducir la tensión superficial. ^(28,29)

En las formulaciones la mayor parte está constituida por el agua, la que tiene tensión superficial alta y no humecta con facilidad a aquellos fármacos ó sólidos que son hidrófobos; lo cual no sería un problema, si el líquido tuviera tensión superficial baja ya que humectaría fácilmente al sólido. ^(28,29)

Es por ello que se requiera casi siempre la utilización de aditivos (humectantes) y técnicas especiales o bien cierto orden de mezclado para obtener una suspensión uniforme. ^(28,29)

Si los polvos son hidrófilos se humectarán con facilidad con agua y no necesitarán procedimientos especiales o aditivos. (28,29)

Para elegir el humectante adecuado se debe considerar la vía de administración.

Entre algunos agentes humectantes tenemos: glicerina, propilenglicol y propietilenglicol

Sedimentación: En la preparación de una suspensión es imposible evitar la completa sedimentación de las partículas sólidas, pero si se puede controlar la velocidad de sedimentación. (28,29)

A fin de controlar dicha velocidad de sedimentación en una suspensión, se deben determinar ciertos parámetros de la suspensión y manipularlos apropiadamente para lograr tal propósito. La determinación de tales parámetros se logra a través de la Ley de Stokes que aporta información útil de tales parámetros.

De acuerdo a la Ley de Stokes se pueden manipular los siguientes parámetros:

- a) El radio de las partículas, haciéndolo más fino.
- b) La densidad del líquido, ya que la del sólido no puede cambiarse.
- c) Aumentar la viscosidad del líquido agregando un agente viscosante.

La Ley de Stokes

Ecuación 1.

$$V = \frac{2r^2 (\ell_s - \ell_e) g}{9 \eta}$$

Donde:

- V = Velocidad de sedimentación
- r² = radio de las partículas
- ℓ_s = densidad de la fase dispersa
- ℓ_e = densidad del medio de dispersión
- η = Viscosidad del líquido
- g = aceleración de la gravedad

Cuando el sólido es reducido de tamaño tiende a aglomerarse; y esta aglomeración puede ocurrir en el líquido y en un intento de las partículas por reducir el exceso de energía libre superficial, que se produce cuando se reduce el tamaño de partículas. ^(28,29)

Entre más pequeño es el incremento de energía libre superficial, más estable es la suspensión o la reducción de esta energía, se logra al adicionar un agente humectante para lograr reducir la tensión superficial entre la partícula y el vehículo. ^(28,29)

Desafortunadamente, mientras las partículas se mantienen dispersas (defloculadas) y sedimentan relativamente lento, pueden formar un sedimento duro en el fondo del recipiente, al finalizar de sedimentar. Este sedimento es extremadamente difícil de redispersar. ^(28,29)

Es por ello que las suspensiones se formulan deliberadamente para lograr que las partículas formen agregados suaves (flóculos) que sedimentan rápidamente y que puede ser redispersada con una mínima agitación. ^(28,29)

La formulación de suspensiones oscila entre mantener las partículas en suspensión tanto tiempo como sea posible y una vez finalizada la sedimentación formen sedimentos duros. ^(28,29)

Formar deliberadamente aglomerados que, aunque sedimentan rápidamente, sean fáciles redispersar. ^(28,29)

Movimiento Browniano. Cuando el tamaño de las partículas, que sufren sedimentación, se reducen a aproximadamente 2 μm , se observa movimiento Browniano y la velocidad de sedimentación se aparta marcadamente de las predicciones teóricas de la ley de Stokes. ^(28,29)

Para controlar el sedimento en la suspensión el farmacéutico debe conocer los factores físicos que afectan la velocidad de sedimentación de las partículas.

Efectos de floculación en la estructura, volumen del sedimento, efecto de la floculación.

En un sistema defloculado, que contiene una distribución de tamaño de partículas, las más grandes sedimentaran más rápido que las pequeñas. ^(28,29)

Las partículas más pequeñas se mantienen suspendidas más tiempo, con el resultado que no se observa un límite definido entre el líquido sobrenadante y el sedimento aun con poco sedimento, el líquido sobrenadante se mantiene turbio, debido a las pequeñas partículas suspendidas o a causa del movimiento browniano. ^(28,29)

Volumen de Sedimentación. (F)

Este se define como la relación del volumen de equilibrio del sedimento (Vd.), con respecto al volumen total de la suspensión (Vo) ^(28,29)

Ecuación 2.

$$F = \frac{Vd.}{Vo}$$

Donde:

F = Volumen de sedimentación
Vd. = Volumen de equilibrio de sedimentación
Vo = Volumen total de la suspensión

El valor de F normalmente es aceptable entre 0 y 1; y aumenta al aumentar el sedimento de la suspensión. ^(28,29)

Para la formulación de una suspensión el farmacéutico puede recurrir a: vehículos estructurados, floculación controlada y combinación de las dos anteriores.

Vehículos Estructurados. Generalmente son soluciones acuosas de materiales polímeros, como los hidrocoloides. Funcionan como viscosantes o suspensores, ya que reducen la velocidad de sedimentación de las partículas. ^(28,29)

La mayoría de este tipo de vehículos es de tipo no newtoniano.

Ejemplos de este tipo de vehículo son: metilcelulosa, carboximetilcelulosa, acacia bentonita y carbopol.

Floculación Controlada.

Para efectuar una floculación controlada se toma la dispersión de partículas humectadas, defloculadas y se intenta flocularlas lo cual se logra adicionando un agente floculante, ya sea un electrolito, polímero o surfactante. El objetivo de controlar la floculación, por medio de agregar una cierta cantidad de agente floculante, es obtener un máximo de volumen sedimentado. ^(28,29)

Floculación en Vehículos Estructurados.

Parece ser que la formulación ideal para una suspensión se da cuando las partículas floculadas están en un vehículo estructurado. El proceso implica hacer la dispersión de las partículas, por medio de un vehículo estructurado y luego lograr la floculación por medio de un floculante. ^(28,29)

Debe comprobarse que no existe incompatibilidad entre el agente floculante y el polímero usado como vehículo estructurado. ^(28,29)

La diferencia de las características entre suspensiones floculadas y defloculadas se presentan a continuación:

Suspensiones Floculadas	Suspensiones Defloculadas
Las partículas forman flóculos	Partículas separadas
Velocidad de sedimentación es alta	Velocidad de sedimentación baja
El sedimento se forma rápidamente	Formación de sedimento lentamente
Sedimento poco compacto y fácil de dispersar	El sedimento se vuelve compacto, llamado "CAKING", y de difícil dispersión
Presencia de un sedimento y un líquido sobrenadante; suspensión poco elegante.	Suspensión elegante.

En si la preparación o fabricación de los componentes de las suspensiones se resume así:

Molienda del Fármaco: para obtener partículas del tamaño apropiado, ya que el tamaño y la distribución de las partículas afectan la biodisponibilidad y la velocidad de liberación. (28,29)

Humectación: completa con una pequeña cantidad del solvente miscible en agua. (28,29)

Adición del agente suspensor al medio acuoso.

Adición de electrolitos (buffers), los que deben agregarse con sumo cuidado para evitar cambios en las cargas.

Adición de agentes Conservadores, Saborizantes y Colorantes.

Homogenización, para reducir el tamaño de partículas aglomeradas (usando molino coloidal).

Fabricación de los componentes de la suspensión

Método Patrón

1. Pesar todos los componentes de la fórmula.
2. Calentar (si procede) la cantidad de agua purificada especificada en la fórmula
3. Añadir lentamente y bajo agitación, los conservantes (si procede), agitar hasta su completa disolución. (28,29)
4. Atemperar la solución obtenida anteriormente hasta 25 ° C . – 30° C. Alcanzada esta temperatura, añadir lentamente y bajo agitación, el agente humectante y el o los principios activos. (28,29)
5. Añadir a la fase anterior el agente floculante (si procede).
6. Añadir lentamente y bajo agitación los viscoizantes (si procede).

Se obtendrá así una dispersión de aspecto homogéneo, sin presencia de aglomerados.

7. Incorporar el resto de los componentes de la suspensión y aforar la preparación.
8. Homogenizar la suspensión obtenida mediante agitación.
9. Limpiar los materiales y equipos utilizados según las normas establecidas. (28,29)

Material y equipos

1. Agitador mecánico con o sin calefacción (o calefacción manual).
2. Vasos de precipitados y otros recipientes adecuados.
3. Sistema de producción de calor

Condiciones Ambientales

1. Humedad Relativa 60 %
2. Temperatura $25^{\circ} \pm 5^{\circ} \text{C}$
(Excepto caso que se requiera otras condiciones).

Control de la Fórmula magistral: evaluación de características organolépticas, determinación de la Velocidad de sedimentación, determinación de la viscosidad, determinación de la densidad relativa, determinación del pH y control microbiológico.

Electrolito: Es cualquier sustancia que contiene iones libres, los que se comportan como un medio conductor eléctrico dado que generalmente dichos iones libres se encuentran en soluciones, a los electrolitos se le conoce también como soluciones iónicas. ^(28,29)

Las soluciones de electrolitos normalmente se forman cuando una sal, se coloca en un solvente (como el agua), en los que los componentes individuales se disocian debido a las interacciones entre las moléculas del solvente y al soluto, lo cual es conocido como solvatación. ^(28,29)

También son posibles electrolitos fundidos y electrolitos sólidos.

Los Electrolitos reducen la barrera eléctrica entre las partículas en que una cantidad suficiente para que las partículas entren en contacto y forman una estructura ligeramente compacta. ^(28,29)

Polímeros: Son macromoléculas (generalmente orgánicas) formadas por la unión de moléculas más pequeñas llamadas monómeros. Es decir son sustancias formadas por una cantidad finita de moléculas que le confieren un alto peso molecular, lo cual es una característica representativa de estos compuestos orgánicos (Ejemplo: nailon, polietileno, baquelita (sintéticas); almidón, celulosa (naturales)).^(28,29)

Los polímeros hidrofílicos actúan como coloides protectores.

Tensoactivos

Son llamados también surfactantes, y con sustancias que influyen por medio de la tensión superficial de contacto de dos fases (dos líquidos insolubles uno en otro). Cuando estos tensoactivos son utilizados en la tecnología, se denominan como emulgentes o emulsionantes, es decir sustancias que permiten mantener una emulsión.^(28,29)

El surfactante tanto iónico como no iónico pueda traer la floculación (o defloculación) por lo que la elección de la concentración del surfactante debe ser hecha cuidadosamente.^(28,29)

Resumiendo, los tensoactivos son moléculas adsorbidas en la interface. Sus estructuras moleculares contienen una porción hidrófila y otra lipófila.^(28,29)

Controles. En las suspensiones

Entre los principales controles a realizar al formular suspensiones están: determinar el volumen de sedimento, determinación del tamaño de la partícula, medida de la densidad y viscosidad, determinación de la velocidad de sedimentación, grado de floculación, redispersabilidad, propiedades organolépticas, ensayos físicos-químicos, control microbiológico y estabilidad.

El volumen de sedimento se evalúa por la fórmula.

Ecuación 3.

$$F = \frac{V_d}{V_o}$$

$$0 < F \leq 1$$

El tamaño de las partículas, la densidad y la viscosidad, son parámetros importantes determinar para poder evaluar la velocidad de sedimentación por medio de la fórmula de Stokes (ecuación 1).

El grado de floculación relaciona el volumen de sedimento de la suspensión floculada (V_f), con el volumen de sedimentación de la suspensión defloculada (V_{df}). Así:

Ecuación 4

$$B = \frac{V_f}{V_{df}}$$

Redispersabilidad. La redispersabilidad en forma homogénea de una suspensión estable se puede comprobar por medio de una agitación moderada, para lo cual la suspensión debe fluir fácilmente durante toda su vida útil de almacenamiento, sin variar en forma apreciable la distribución del tamaño de las partículas, forma los cristales o la disponibilidad del principio activo suspendido. ^(28,29)

Valorar las propiedades organolépticas tales como: sabor, olor, color, etc.

Ensayos físicos químicos y control microbiológico.

La estabilidad se puede evaluar desde el punto de vista físico, químico y microbiológico. ^(28,29)

Suspensiones a reconstituir

Entre las suspensiones podemos encontrar, además de las que ya están preparadas y listas para su curso, las llamadas suspensiones extemporáneas, las cuales son mezclas de polvos que necesitan ser reconstituidas, antes de su uso, en un determinado vehículo. ^(28,29)

Generalmente esta forma de suspensión se prefiere cuando el fármaco tiene un periodo de eficacia muy corto, por lo que se opta por esta forma que se reconstituye solo al momento de una administración. ^(28,29)

Las instrucciones para reconstituir una suspensión pueden variar en dependencia de un fármaco particular; la información para tal efecto se encuentra especificada en cada envase. ^(28,29)

En general la técnica utilizada para reconstituir una suspensión incluye los siguientes pasos:

1. Agitar el frasco para remover el polvo a constituir. Esto se hace para lograr que el polvo se suelte de las paredes del envase donde se encuentra adherido, y así poder obtener una suspensión que resulte lo más homogénea posible.

2. Para reconstituir utilice agua recién hervida y fría. El agua a utilizar para añadir al polvo debe ser hervida y luego dejarla enfriar, pues de utilizarla caliente o tibia, la temperatura podría afectar la efectividad del producto. ^(28,29)

Agregar cierta cantidad del agua (hervida y fría), utilizando el vaso de medicamento que normalmente traen estos productos, o bien agregando el agua hasta cierta marca indicada en el envase. ^(28,29)

Cerrar el frasco y agitar. Debido a que gran parte del medicamento se encuentra en los gránulos que se depositan en el fondo del envase, el medicamento debe ser distribuido en forma homogénea para lograr una dosificación estable, durante el tratamiento, así como un efecto terapéutico óptimo. ^(28,29)

2.7 Definición e importancia de estabilidad de los medicamentos

La estabilidad de los productos farmacéuticos (medicamentos, principios activos, excipientes, remedios herbolarios, vacunas, etcétera) se define como la capacidad de mantener las características, especificaciones y propiedades de identidad, potencia y pureza establecidas, durante el periodo de tiempo determinado por el fabricante del producto ^(33,34).

La estabilidad es una característica que impacta directamente sobre la calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos (Figura 7) por lo que es un factor que debemos tener en cuenta para obtener el efecto terapéutico deseado. ^(33,34)



Figura 8. Factores relacionados con la estabilidad de los medicamentos.

<https://bmeditores.mx/entorno-pecuario/estabilidad-de-medicamentos/>

2.7.1 Tipos de estabilidad

Existen tres tipos o categorías principales de estabilidad en los medicamentos: física, química y biológica⁽¹⁾, sin embargo, otros autores también contemplan otros dos tipos de estabilidad: terapéutica y toxicológica⁽³⁴⁾. En la Tabla 1 se describen las categorías o tipos de estabilidad.

Estabilidad	Descripción	Ejemplo
Química	Los componentes (principios activos y excipientes) mantienen la integridad de la estructura química y la potencia declarada en la etiqueta.	La formación o destrucción de enlaces químicos puede provocar que el medicamento pierda potencia.
Física	Se deben mantener las características físicas del medicamento: apariencia, color, olor, sabor, textura, uniformidad, disolución y suspensión.	Cambios en la solubilidad del medicamento y/o cambios en su apariencia física.
Microbiológica	Se debe mantener la esterilidad o resistencia al crecimiento bacteriano. En el caso de utilizar antimicrobianos como conservadores, deben seguir siendo efectivos.	Los microorganismos pueden aprovechar los compuestos de la formulación del medicamento para su desarrollo (lactosa, por ejemplo).
Terapéutica	El efecto terapéutico no debe alterarse.	La adición de excipientes que eviten la oxidación o un envasado que impida la fotodegradación son estrategias que favorecen que el producto conserve su efecto terapéutico.
Toxicológica	No debe presentarse toxicidad.	Los productos de degradación pueden ser tóxicos para el paciente.

Fuente: Loftsson (2014), Sanches & Barata (2012)

Tabla 1. Categorías o Tipos de Estabilidad

<https://bmeditores.mx/entorno-pecuario/estabilidad-de-medicamentos/>

2.7.2 Factores que afectan la estabilidad de los medicamentos

Hay una gran cantidad de factores que deben ser contemplados desde la preformulación hasta la utilización de los medicamentos, porque pueden influir en su estabilidad. Es por eso que es importante conocerlos. Algunos de estos factores están enlistados en el Cuadro 1. ⁽³⁴⁾

<ol style="list-style-type: none"> 1. Forma farmacéutica 2. Preformulación 3. Proceso de fabricación 4. Temperatura 5. Humedad 6. Oxígeno 7. Luz 8. pH

Cuadro 1. Factores relacionados con la estabilidad de los medicamentos

<https://bmeditores.mx/entorno-pecuario/estabilidad-de-medicamentos/>

2.7.3 Forma farmacéutica del medicamento

Evidentemente, no es lo mismo una solución inyectable que se administra por vía intramuscular y una tableta diseñada para la liberación controlada del principio activo que se administra por vía oral porque cada forma farmacéutica tiene características particulares en su formulación, fabricación, almacenamiento y administración que pueden influir en la estabilidad del producto final.⁽³³⁾

2.7.4 Formulación del medicamento

Para formular un medicamento estable y biofarmacéuticamente adecuado, se deben de considerar las propiedades farmacodinámicas, biofarmacéuticas, fisiocoquímicas y la compatibilidad de los excipientes y de los principios activos que se van a utilizar⁽³³⁾.

El objetivo de los excipientes es facilitar la administración del medicamento, protegerlo de la degradación, promover una adecuada liberación para favorecer su biodisponibilidad; por lo que los excipientes elegidos idealmente son aquellos que no interactúan con el principio activo o aquellos que no degraden ni afecten las propiedades del principio activo.

Cuadro 2. Objetivo de los excipientes

<https://bmeditores.mx/entorno-pecuario/estabilidad-de-medicamentos/>

2.7.5 Proceso de fabricación

El proceso de fabricación puede influir en la estabilidad de los medicamentos de diferentes maneras, por ejemplo, cuando el tamaño de partícula es muy pequeño después de la molienda, los excipientes y los principios activos pueden ser mucho más reactivos⁽³⁴⁾.

2.7.6 Temperatura

Los aumentos de temperatura pueden provocar un incremento en la velocidad de reacción o la velocidad de degradación del medicamento^(34, 37).

Algunos medicamentos y la mayoría de las vacunas deben conservarse en temperaturas de refrigeración para mantener poder en sus propiedades, es decir, deben mantener una cadena de frío. Ver Cuadro 3. ^(34, 37).

La red o cadena de frío se define técnicamente como el conjunto de sistemas logísticos diseñados para mantener los productos en condiciones específicas de temperatura ininterrumpidas, durante su almacenamiento, transporte y distribución. Se involucra al personal, la infraestructura, los equipos y los procedimientos¹ del establecimiento.

Cuadro 3. Red o cadena de frío.

Fuente: NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos.

¹ Procedimientos Normalizados de Operación o PNO son documentos escritos que sirven para indicar cómo realizar una operación de manera reproducible. ^(34, 37).

2.7.7 Humedad

El agua puede influir en la estabilidad de los medicamentos dependiendo si está ligada a la estructura química del principio activo o no; porque si las moléculas de agua se adsorben a la superficie pueden provocar la degradación del medicamento⁽³⁴⁾.

2.7.8 pH

El pH es uno de los factores más importantes que están relacionados con la estabilidad de los medicamentos porque la mayoría de los mecanismos de degradación de los medicamentos son catalizados por iones hidrógeno (H+) e hidroxilo (OH-)⁽³⁴⁾.

2.7.9 Oxígeno

La presencia y la concentración de radicales libres pueden provocar la degradación del principio activo y/o de los excipientes del medicamento porque generan reacciones de oxidación^(34,37).

2.7.10 Luz

En la industria farmacéutica se utilizan frascos y/o blisters de colores opacos (ámbar o naranja) para proteger los medicamentos de la luz; porque la luz puede proporcionar la energía necesaria para activar las reacciones de degradación del medicamento y/o de los excipientes^(34,37).



Figura 8 Frascos color ámbar

<https://bmeditores.mx/entorno-pecuario/estabilidad-de-medicamentos/>

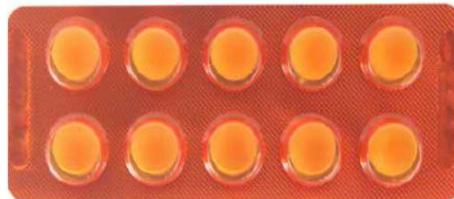


Figura 9 Tabletas envasadas en blíster color naranja

<https://bmeditores.mx/entorno-pecuario/estabilidad-de-medicamentos/>

2.7.11 Productos y mecanismos de degradación de los medicamentos

Los productos de degradación son aquellas sustancias que se producen a partir de reacciones químicas irreversibles que pueden aparecer cuando los medicamentos son inestables⁽³⁴⁾. Los productos de degradación no son deseables porque no tienen efectos terapéuticos y pueden presentar riesgos de toxicidad para los pacientes (personas o animales). Los mecanismos por los que se obtienen los productos de degradación de los medicamentos pueden clasificarse tal y como se muestra en la Figura 10.⁽³⁴⁾

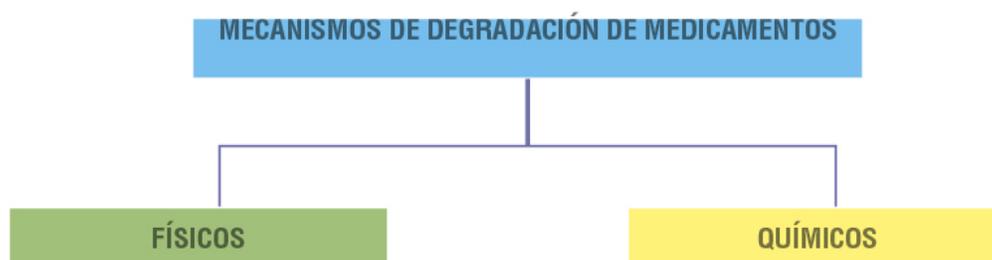


Figura 10. Mecanismos de degradación de medicamentos

<https://bmeditores.mx/entorno-pecuario/estabilidad-de-medicamentos/>

2.7.12 Degradación química

La degradación química se puede asociar con la pérdida de potencia y calidad de los medicamentos^(34,38). En la Tabla 2 se describen brevemente algunos de los mecanismos de degradación química más importantes.⁽³⁴⁾

Mecanismo de degradación	Descripción
Hidrólisis	Es uno de los mecanismos de degradación más comunes y está caracterizado por la degradación de los componentes del medicamento provocada por su interacción con el agua.
Deshidratación	Se refiere a la pérdida de moléculas de agua en la estructura química de las moléculas del principio activo y/o del excipiente.
Oxidación	También es uno de los mecanismos de degradación más comunes porque afecta a diferentes tipos de medicamentos y se caracteriza por la interacción de radicales libres que se unen a otras moléculas,
Isomerización	El medicamento tiene la misma fórmula y composición química, pero tienen una diferente configuración espacial, lo que les confiere propiedades fisicoquímicas distintas.
Racemización	Se refiere a cambios en la actividad óptica de las moléculas.
Fotodegradación / Fotoquímica	Es un mecanismo más complejo porque suelen influir otros factores (pH, oxígeno, luz) y además participan otras reacciones como la deshalogenación, descarboxilación y reordenamiento.
Polimerización	Se unen dos o más moléculas idénticas para la formación de moléculas más complejas.

Fuente: Loftsson (2014), Sanches & Barata (2012)

Tabla 2 Mecanismos de degradación química de los medicamentos

<https://bmeditores.mx/entorno-pecuario/estabilidad-de-medicamentos/>

Las reacciones de degradación pueden ser de orden cero, de primer, segundo o tercer orden^(34,37), sin embargo, estas reacciones no serán descritas en este trabajo porque para explicarlas se requiere emplear vocabulario técnico mucho más especializado y complejo que excede los objetivos de este trabajo.

2.7.13 Degradación física

Los mecanismos de degradación física de los principios activos y/o excipientes del medicamento incluyen la formación de polimorfos, cristalización, evaporación y adsorción⁽³⁴⁾. En la Tabla 3 se describen brevemente estos mecanismos.^(34,37)

Mecanismo de degradación	Descripción
Formación de polimorfos	Las partículas del principio activo y/o los excipientes pueden existir en diferentes estados físicos que pueden cambiar con el tiempo, por lo que este cambio de forma o estado modifica propiedades como la solubilidad, disolución, la liberación y por ende, el efecto terapéutico del medicamento.
Cristalización	
Evaporación	El incremento en la temperatura puede provocar la pérdida de componentes sensibles.
Adsorción	Los principios activos y/o excipientes pueden unirse a los filtros, envases, jeringas o cualquier material con el que estén en contacto.

Fuente: Loftsson (2014), Sanchez & Barata (2012)

Tabla 3. Mecanismos de degradación física de medicamentos

<https://bmeditores.mx/entorno-pecuario/estabilidad-de-medicamentos/>

2.7.14 Estudios de estabilidad

El objetivo de los estudios de estabilidad es proporcionar evidencia sobre cómo la calidad del medicamento se modifica con el tiempo bajo la influencia de factores ambientales como temperatura, humedad y luz; además también son útiles para determinar la vida de anaquel y dar recomendaciones sobre las condiciones de almacenamiento del producto^(34,39,40,41).

2.7.15 Normativa

Los fabricantes que quieran comercializar un medicamento deben presentar los resultados de los estudios de estabilidad de los principios activos y del producto terminado que han realizado antes de solicitar el registro o autorización del producto; es por ello que existen organismos internacionales especializados que elaboran guías para la que los fabricantes puedan evaluar la estabilidad de sus productos. La ICH está enfocada en los medicamentos de uso humano⁽³⁹⁾, mientras que la VICH se encarga de los medicamentos de uso veterinario⁽⁴²⁾. En la Tabla 4 se muestran las guías en materia de estudios de estabilidad que han sido publicadas tanto por la ICH como por la VICH.

Guía	Nombre
ICH Q1A (R2)	Pruebas de estabilidad de nuevas sustancias farmacéuticas y productos
ICH Q1B	Pruebas de estabilidad: Pruebas de fotosensibilidad de nuevas sustancias y productos farmacéuticos
ICH Q1C	Pruebas de estabilidad de nuevas formas de dosificación
ICH Q1D	Esquemas de asociación y matrización de pruebas de estabilidad en nuevas sustancias y productos farmacéuticos
ICH Q1E	Evaluación de los datos de estabilidad
ICH Q1F	Paquete de datos de estabilidad para solicitudes de registro en las zonas climáticas III y IV
VICH GL3 (R)	Pruebas de estabilidad de nuevas sustancias y medicamentos veterinarios
VICH GL4	Pruebas de estabilidad: Requerimientos de nuevas formas de dosificación
VICH GL5	Pruebas de estabilidad: Pruebas de fotoestabilidad de nuevas sustancias y medicamentos
VICH GL8	Pruebas de estabilidad de premezclas medicadas
VICH GL17	Pruebas de estabilidad de nuevos medicamentos biotecnológicos y biológicos veterinarios
VICH GL45	Esquemas de asociación y matrización para pruebas de estabilidad en nuevas sustancias y medicamentos veterinarios
VICH GL51	Evaluación estadística de los datos de estabilidad
VICH GL58	Pruebas de estabilidad de nuevos sustancias farmacéuticas veterinarias y productos medicinales en las Zonas Climáticas III y IV

Fuente: Elaboración propia a partir de ICH y VICH.

Tabla 4. Guías publicadas por organismos internacionales sobre estabilidad de medicamentos (de uso humano y veterinario)

<https://bmeditores.mx/entorno-pecuario/estabilidad-de-medicamentos/>

En México, los estudios de estabilidad para medicamentos de uso humano tienen su fundamento legal en la Ley General de Salud, el Reglamento de Insumos Para la Salud; la NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos⁽⁴³⁾; la NOM-073-SSA1-2015 Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios⁽⁴⁴⁾

Zonas climáticas

Como vimos anteriormente, hay factores del medio ambiente (temperatura y humedad) que influyen en la estabilidad de los medicamentos, es por eso que cuando se desarrollen e interpreten los estudios de estabilidad los fabricantes deben tener en cuenta la zona climática del lugar donde se realicen.⁽⁴⁴⁾

Para estos efectos, se reconocen cuatro zonas climáticas (I, II, III y IV) que se encuentran distribuidas tal y como se muestra en la Figura 5.⁽⁴⁴⁾

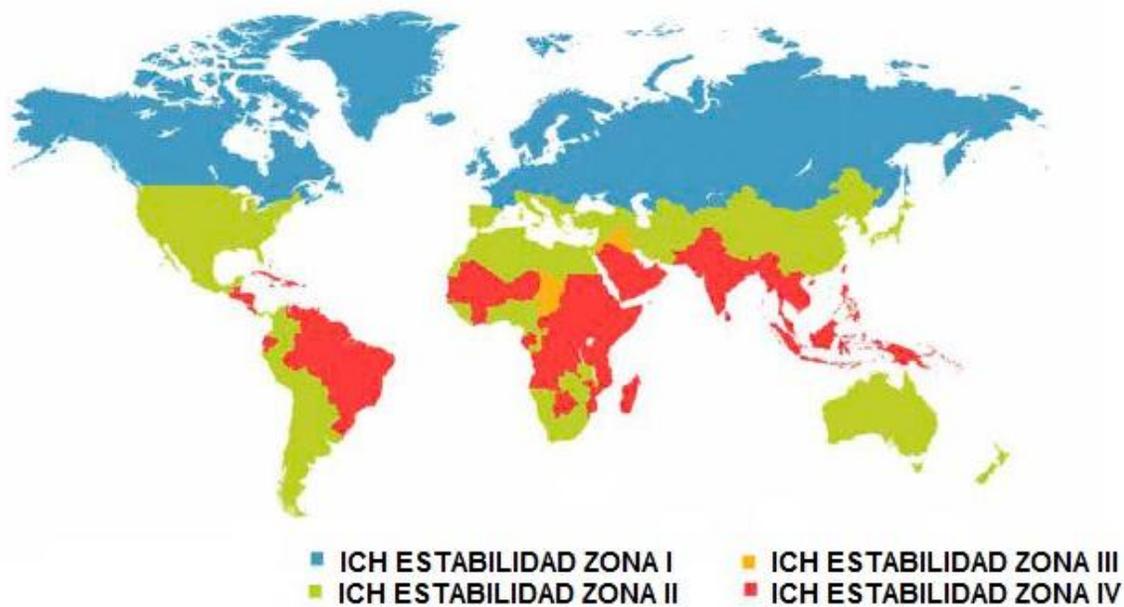


Figura 11. Distribución de zonas climáticas

<https://bmeditores.mx/entorno-pecuario/estabilidad-de-medicamentos/>

Como podemos ver en la Figura 11, México está clasificado en la Zona Climática II, mientras que en la Tabla 5 se muestran las características de cada una de las zonas climáticas. ⁽⁴⁴⁾

Zona	Definición	Condiciones a largo plazo
I	Clima templado	21°C / 45% HR
II	Subtropical y climas mediterráneos	25°C / 60% HR
III	Caluroso y seco	30°C / 35% HR
IV a	Caluroso y húmedo	30°C / 65% HR
IV b	Caluroso y muy húmedo	30°C / 75% HR

Tabla 5. Características de las zonas climáticas

<https://bmeditores.mx/entorno-pecuario/estabilidad-de-medicamentos/>

2.7.16 Plazos y condiciones para los estudios de estabilidad

Hay algunas condiciones y plazos que se deben cumplir para realizar los estudios de estabilidad que permiten categorizarlos en acelerados, intermedios y a largo plazo (o a tiempo real); sin embargo, cada uno de estos estudios tiene sus particularidades porque no duran lo mismo, se realizan bajo condiciones de humedad y temperatura distintas; además la frecuencia de análisis también es diferente⁽⁴⁴⁾.

Cuadro 4. Estudios de estabilidad acelerados y a largo plazo.

- Estudios de estabilidad acelerada: Están diseñados bajo condiciones que pretenden incrementar la velocidad de degradación química, física y biológica (si aplica) del producto.
- Estudios de estabilidad largo plazo o tiempo real: Están diseñados bajo condiciones definidas por el fabricante (bajo un enfoque de gestión de riesgos) que permiten comprobar que se conservan las propiedades del producto durante su periodo de vida útil.

Fuente: Proyecto de modificación a la NOM-241-SSA-2018, Buenas prácticas de fabricación de dispositivos médicos. ⁽⁴⁴⁾Se sugiere consultar la NOM-073-SSA1-2015 Estabilidad de fármacos y medicamentos, porque los plazos y las condiciones de los estudios de estabilidad también dependen si el fármaco es nuevo o ya es conocido; si se trata de un medicamento nuevo, conocido, genérico o remedio herbolario; el tipo de envase (impermeable, semipermeable); y las condiciones de almacenamiento (refrigeración, congelación); entre otras⁽⁴⁴⁾.

2.7.17 Programa de evaluación de estabildades

Los fabricantes deben evaluar continuamente la estabilidad de los productos que comercializan para poder detectar cualquier problema que pueda presentarse durante su vida útil⁽³⁵⁾. Los fabricantes deben contar con los programas para la evaluación de estabildades por escrito, por lo que en el Cuadro 5 se muestran los elementos mínimos que deben contener. ⁽³⁵⁾

1. Número y tamaño de lote.
2. Métodos de prueba físicos, químicos, microbiológicos y biológicos.
3. Criterios de aceptación.
4. Referencias de los métodos de prueba.
5. Descripción del sistema contenedor-cierre
6. Intervalos o frecuencias de las pruebas.
7. Descripción de las condiciones de almacenamiento.
8. Descripción de las condiciones de las pruebas.
9. Orientación de las muestras de prueba.
10. Otras condiciones aplicables al producto.

Cuadro 5. Elementos del programa de evaluación de estabildades
<https://bmeditores.mx/entorno-pecuario/estabilidad-de-medicamentos/>

2.7.18 Vida útil y fecha de caducidad de los medicamentos

La fecha de caducidad indica el fin del periodo de tiempo durante el cual el medicamento conserva las especificaciones establecidas por el fabricante, en otras palabras, el periodo de vida útil⁽³⁵⁾.

El periodo de vida útil, y, por ende, la fecha de caducidad de un medicamento se determina mediante cálculos que emplean fórmulas matemáticas con los datos obtenidos a partir de los estudios de estabilidad tomando en cuenta el envasado y las condiciones de almacenamiento recomendadas para el producto.^(45,46)

Existe la creencia de que es posible utilizar un medicamento tiempo después de la fecha de caducidad que está señalada en el envase, sin embargo, esto NO es recomendable porque hay mayores probabilidades de que la composición y/o estructura química del medicamento sea diferente, y por ende, la probabilidad de que sea menos eficaz e influya negativamente en la salud del paciente y/o del usuario es mayor. Por ejemplo, los antibióticos caducados tienen menos potencia y si son utilizados se corre el riesgo de agravar una infección y favorecer el desarrollo de resistencia porque ya no surten el efecto terapéutico deseado^(45,46).

3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El desarrollo de un producto farmacéutico involucra el desarrollo de la seguridad, eficacia y calidad del producto. El análisis farmacéutico y los estudios de estabilidad, juegan un papel muy importante en el desarrollo exitoso de un producto. Los estudios de estabilidad están involucrados en la determinación y aseguramiento de la identificación, potencia e integridad del fármaco tanto como de la formulación.

La Norma NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de Fármacos y Medicamentos establece las especificaciones y los requisitos de los estudios de estabilidad, su diseño y ejecución, que deben de efectuarse a los fármacos, medicamentos, así como a los remedios herbolarios para uso humano, que se comercialicen en territorio nacional, así como aquellos medicamentos con fines de investigación. La suspensión de subsalicilato de bismuto en particular el contenido de conservadores para comprobar la estabilidad del producto a lo largo del tiempo hacen necesario el empleo de técnicas de análisis por HPLC así como el empleo de software Empower que facilite la cuantificación de benzoato de sodio como conservador de manera rápida, sencilla y confiable.

4. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACION

En el caso de productos farmacéuticos el fabricante de acuerdo con la normatividad vigente debe efectuar estudios de estabilidad continuos y en tiempo real para avalar la fecha de caducidad. Los datos necesarios para confirmar un tiempo de conservación provisional tienen que presentarse al organismo encargado del registro farmacéutico. Con el fin de mantener la calidad y la inocuidad de los productos, con referencia especial a la degradación, las autoridades sanitarias nacionales deberían vigilar la estabilidad y la calidad de las preparaciones presentes en el mercado mediante un programa de seguimiento que comprenda visitas de inspección y pruebas.

Una vez que un producto ha sido registrado, se precisan estudios de estabilidad complementarios siempre que se hacen modificaciones importantes de la formulación, el proceso de fabricación, el envasado o el método de preparación. Los resultados de estos estudios habrán de comunicarse a las autoridades competentes de reglamentación farmacéutica.

El análisis del contenido de conservadores por HPLC para una suspensión resulta de importancia, debido a que actualmente en estudios de estabilidad a largo plazo para el sector farmacéutico la legislación vigente exige como requisito de calidad y cuantificación, además de permitir su posterior registro sanitario. Al mismo tiempo el presente trabajo permite el aprovechamiento de instrumentación novedosa y moderna en el caso de los cromatógrafos Alliance de Waters junto con el software Empower™ brindan al analista la formación profesional necesaria que ayudará al desarrollo de su habilidad y destreza en técnicas analíticas ampliamente difundidas en el sector industrial y la posibilidad de trabajar a la vanguardia en épocas de acelerado desarrollo tecnológico.

5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

La técnica propuesta para la cuantificación de benzoato de sodio en suspensión de subsalicilato de bismuto únicamente cumple lo relacionado a la aplicación de la técnica por HPLC mediante el uso de software Empower™ teniendo de antemano el conocimiento que esta metodología analítica ha sido validada con antelación. El presente trabajo no pretende contemplar la parte de validación de métodos analíticos por HPLC.

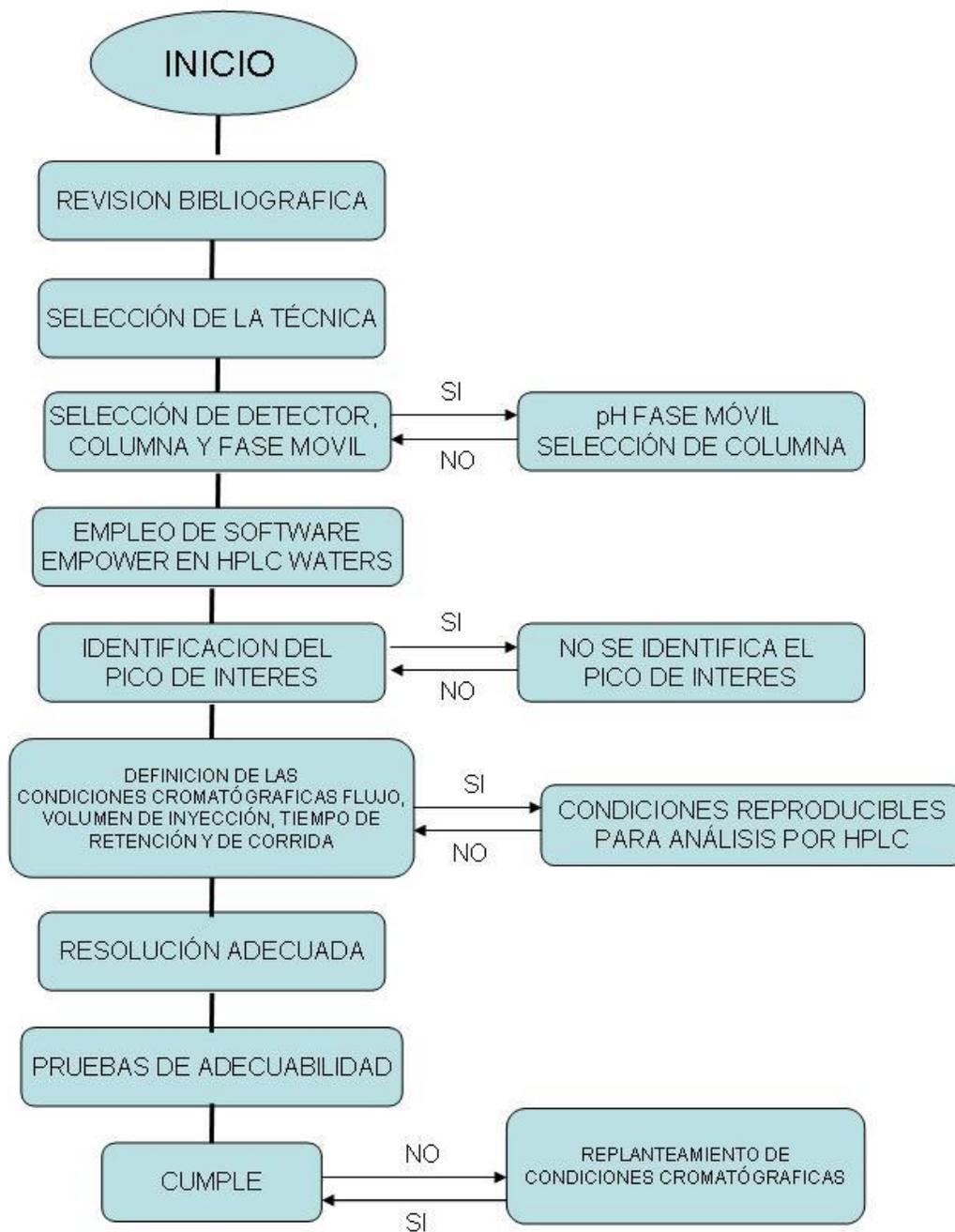
6. OBJETIVO

Implementar una guía para el software Empower™ HPLC Alliance de Waters que permita cuantificar el contenido de conservadores en suspensión de subsalicilato de bismuto.

7. HIPÓTESIS

La implementación de una metodología analítica por HPLC para cuantificar benzoato de sodio como conservador en suspensión de subsalicilato de bismuto, permitirá cumplir con el requerimiento sanitario para esta forma farmacéutica en cuanto a estabilidad y calidad del producto, permitiendo además la aplicación de tecnología de vanguardia en el sector industrial como lo es conocer el software Empower™ de Waters.

8. DIAGRAMA DE FLUJO



9. METODOLOGIA

Se procedió a implementar una técnica por HPLC mediante los siguientes parámetros.

MATERIALES

REACTIVOS

- Ácido fosfórico Supelco
- Agua HPLC JT Baker
- Metanol HPLC JT Baker
- Acetonitrilo HPLC JT Baker
- Estándar Secundario Benzoato de Sodio

EQUIPOS

- Cromatógrafo de Líquidos Waters Software Empower detector UV Visible
- Balanza Analítica Mettler Toledo
- Sonificador Marca Misonix Modelo 3510 R MHT

MATERIAL

- Columna Eclipse Plus C18, 4.6 mm X 250 mm, 5 μ m
- Pipetas volumétricas de 2, 4 mL
- Matraces volumétricos de 25 y 50 mL
- Probeta de 500 mL
- Reservorio de 1000 mL
- Vaso de precipitados de 50 y 100 mL
- Filtros Millipore 0.45 μ m

Solución Stock de Benzoato de sodio 35 mg/25 mL alícuota de 2 mL en 50 mL

Diluyente Agua HPLC

Muestra 4 mL de la suspensión en 50 mL de agua HPLC

- 1.- Se eligió el sistema de detección por absorción ultravioleta a 205 nm.
- 2.- Se seleccionó el tipo de columna cromatográfica:
- 3.- Se seleccionó la fase móvil, compuesta por un Buffer de Fosfatos pH 3.0 (1.36 g de fosfato monobásico de potasio en 1 litro de agua ajustando el pH con ácido fosfórico), acetonitrilo y metanol (60:25:15)
- 4.- Volumen de inyección 15 μ L
- 5.- Una vez que se contó con la columna y la fase móvil más idónea, a través de la experimentación se optimizaron las siguientes variables, a fin de conseguir una adecuada resolución de los picos. Preparación de la muestra, Longitud UV 205 nm, Flujo 1.0 mL/min, Tiempo de Retención aproximado (TR) 7.0 min, Volumen de inyección 15 μ L, Tiempo de inyección 10 min.
- 6.- Con base en los resultados encontrados durante la experimentación, se presenta el método
- 7.- Se realizó una prueba de adecuabilidad.
- 8.- Se realizaron seis inyecciones de las soluciones de referencia de benzoato de sodio
- 9.- Los valores encontrados en la prueba de adecuabilidad estuvieron dentro de los siguientes criterios de aceptación:
Coeficiente de Variación (CV): $\leq 2.0 \%$
Factor de coeio (T): $\leq 20 \%$
Número de Platos Teóricos (N): > 2000

De acuerdo con lo anterior no fue necesario replantearse nuevamente las variables cromatográficas del método y por lo tanto se recomienda la validación.

Dentro del Software Empower se crea un Proyecto de Conservadores estableciendo las condiciones cromatográficas 205 nm así como la velocidad de flujo dentro del Instrument del mismo software Empower se coloca el volumen de inyección salvando todos los parámetros.

10. RESULTADOS

10.1 GUÍA PARA MANEJO DE SOFTWARE EMPOWER™ EN HPLC WATERS

Se logró familiarizar al químico de laboratorio en conocimientos en cuanto a uso y operación de equipo de cromatografía de líquidos (Waters), las buenas prácticas de operación del instrumento, parámetros cromatográficos, mecanismos de detección para la aplicación técnico-científica en desarrollo de métodos analíticos, uso de software Empower™, en creación de método, secuencia, reprocesamiento y método de reporte, para asegurar el propósito del método.

Condiciones de operación (adquisición de datos y/u operación).

Parámetros de integración de picos cromatográficos (anchos de picos, señal/ruido, umbral, eventos de integración, etc.)

10.1.1 Inicia el programa

Doble click icono Empower Login	
Teclee Usuario y clave} Ventana Empower Pro	

10.1.2 Creando un Proyecto

Elige Run Samples Elige HPLC System oprime OK	
----------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------

10.1.2.1 Para crear un Proyecto

Elige **Manage > Create New Project**.
Abrirá el asistente

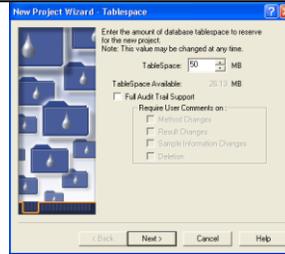
Aceptar default 50 MB

Pulsa Next

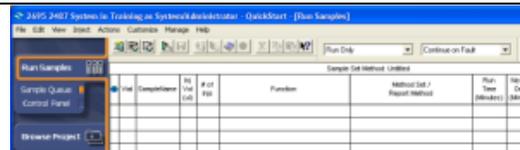
Pulsa Next

Pulsa **Next**.

Pulsa **Next**. Te pedirá nombre del Proyecto



Teclea el Nombre de tu preferencia
Click **Finish** Aparece la ventana
QuickStart
Cerrar ventana QuickStart



10.2 Creando Instrument Method

Click **Browse Project**

Elige el Proyecto pulsa OK

Click FILE > New Method >

Instrument Method

Habilitar **Enable** en la seccion
Channel

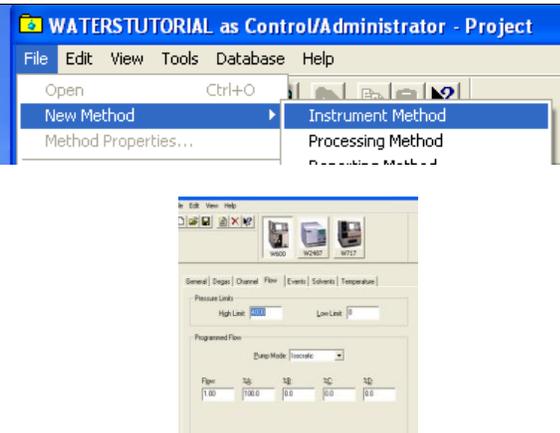
Click seccion **Flow** .

Agrega Pressure limits

Elige la velocidad de Flujo y %A:

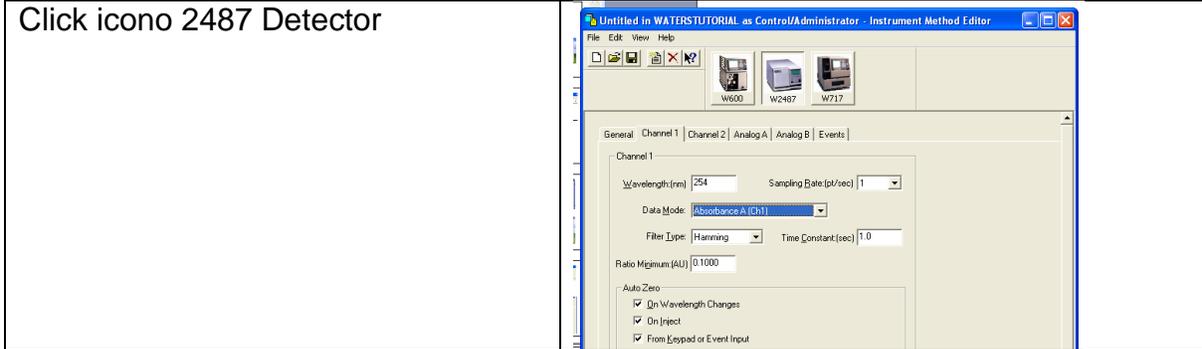
100.0

Aceptar



10.3 Estableciendo parámetros del Detector

Click icono 2487 Detector



10.3.1 Elige la longitud de onda p. Ej. 254 Aceptar

Salvando Instrument Method
Select **File > Save**. Coloca el Nombre que prefieras para Instrument Method



10.4 Creando Processing Method

Define la manera de procesar datos puros obtenidos mediante HPLC y Empower™ software. Lo anterior incluye un Method Set que te permite:

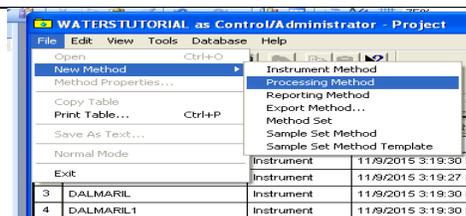
- Integrar datos
- Calibrar Estandares
- Cuantificar Muestras

Click **FILE New Method > Processing Method**

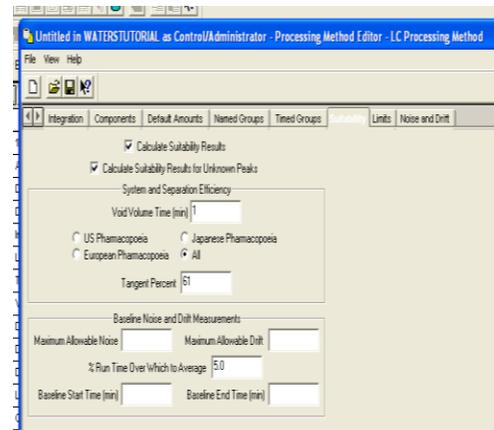
Pulsa OK

Elige Suitability opcion > Calculate Suitability Results

- Calculate Suitability Results for Unknow Peaks
- Void Volume Time (min) 1.00



Elige Components Tab > Name > Retention Time > Fit Linear thru Zero
 Elige Integration Tab > Time > Inhibit Integration > Stop
File > Save



10.5 Creando a Method Set

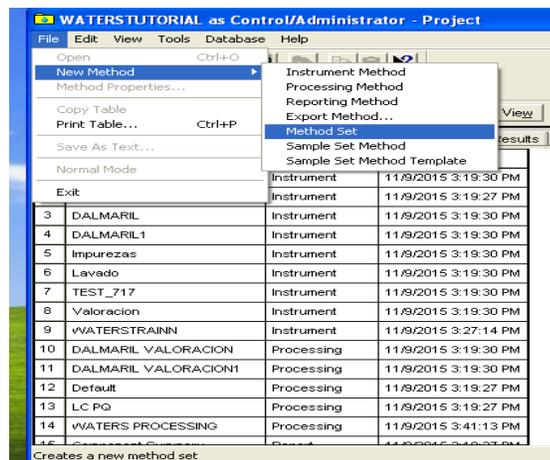
Elige **File > New Method > Method Set**.

Pulsa Yes

De la lista de Instrument Method elige el Instrument Method correcto
 Click Next

Select Processing Method > Report Method > Default Individual Report > Next

Agrega el Nombre del creado > Method Set Name > Finish
 Selecciona Instrument Method > Default Processing Method > Default Report Method > Processing Method > Channel Name > Save
 Adquisicion de Datos
 Click **Run Samples**



Introduce los siguientes parametros

- Mode list: Elige **Run Only**.
- Vial: Enter **1** (o el vial correspondiente de la muestra).
- Sample Name: p.ej. **Test Injection**.
- Injection Volume: agrega **10.0** (o el volumen adecuado de tu muestra).
- Function list: elige la funcion que tendra la inyeccion si es estandar o muestra.
- Method Set list: elige el **Method**

Set correspondiente.

- Run Time: elige el tiempo para la inyeccion p.ej. 10 min (o la duracion apropiada de la muestra).

Select Instrument Method > Monitor
Select Method Set Lavado >
Function Equilibrate or Condition
Colum

Click File > Save Sample Set
Method As

Agrega el nombre del Sample Set o
la

secuencia

Click opcion SINGLE

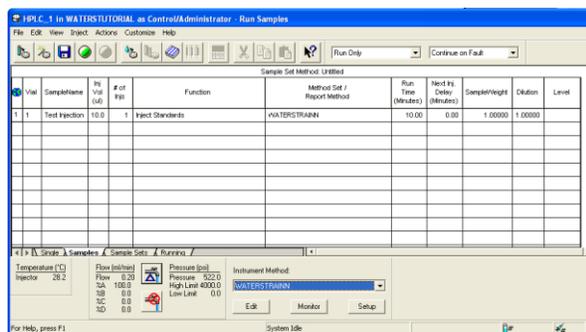
Introduce los siguientes parametros

- Sample Name: STD1
- Function list: elige **Inject Standards**.
- Method Set list: elige el **Method Set correspondiente**.
- Vial: Enter **1** (o la posicion conveniente de la muestra).
- Injection Volume: introduce **10.0 p.ej.** (o el volumen adecuado de la muestra).
- Run Time: Introduce el tiempo de duracion 20 min p.ej (o la duracion apropiada para la inyeccion).

Elige Inject

Finalizando la inyeccion de
Prueba ajusta los parametros

Elige Opcion Samples
Click RUN



10.6 CREANDO UN METODO DE PROCESO

Click browse project

Select project

Click channel column

Pulsa next

Select channel 2487 shift + click mouse in std2

Pulsa next

Click boton derecho + review

Click wizard

Click ok

Click ok

Click peak width 30 default

Next

Threshold default click next elige inicio y fin de la integracion click next

Elige el pico

Click area y altura minima

Next

Elige linear thru zero

Click next, click yes

Introduce nombre del componente click next

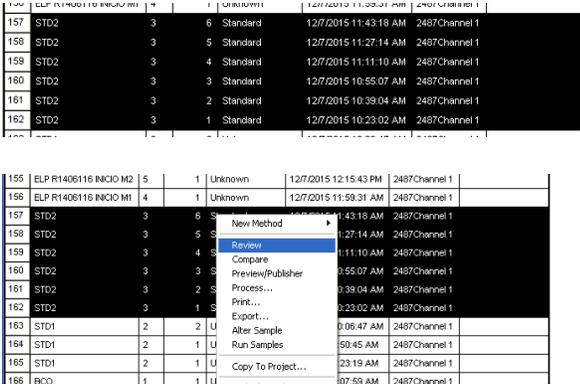
Next, click next

Introduce nombre del metodo de proceso click finish

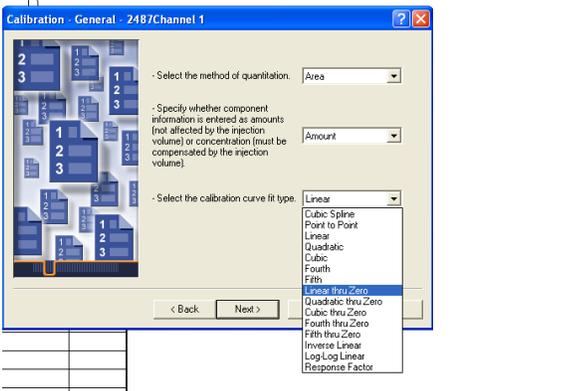


The screenshot shows the Empower Pro software interface. At the top, there are buttons for 'Run Samples', 'Browse Project', 'Configure System', 'Process Data', 'Review Data', and 'Print Data'. Below these is a table with columns 'Date Acquired' and 'Channel'. The table contains several rows of data, including dates like 12/9/2015 and channels like 600 PRESS and 2487Channel 1.

Date Acquired	Channel
12/9/2015 5:40:19 AM	600 PRESS
12/9/2015 5:40:19 AM	2487Channel 1
12/9/2015 5:24:04 AM	600 PRESS
12/9/2015 5:24:04 AM	2487Channel 1
12/9/2015 5:07:51 AM	600 PRESS
12/9/2015 5:07:51 AM	2487Channel 1
12/9/2015 4:51:49 AM	600 PRESS
12/9/2015 4:51:49 AM	2487Channel 1
12/9/2015 4:35:47 AM	600 PRESS
12/9/2015 4:35:47 AM	2487Channel 1



The screenshot shows the 'Calibration - General' dialog box for '2487Channel 1'. It has several sections: 'Select the method of quantitation' (set to 'Area'), 'Specify whether component information is entered as amounts' (set to 'Amount'), and 'Select the calibration curve fit type' (set to 'Linear thru Zero'). A list of fit types is shown, including Linear, Cubic Spline, Point to Point, Linear, Quadratic, Cubic, Fourth, Fifth, Linear thru Zero, Quadratic thru Zero, Cubic thru Zero, Fourth thru Zero, Fifth thru Zero, Inverse Linear, Log-Log Linear, and Response Factor.



The screenshot shows a table of results with columns for 'Run', 'Sample Name', 'Injection Volume', 'Retention Time', 'Date Acquired', and 'Channel'. The table contains several rows of data, including sample names like 'STD1' and 'BCO', and retention times like 12/7/2015 11:43:16 AM.

Run	Sample Name	Injection Volume	Retention Time	Date Acquired	Channel	
157	STD1	3	6	Standard	12/7/2015 11:43:16 AM	2487Channel 1
158	STD1	3	5	Standard	12/7/2015 11:27:14 AM	2487Channel 1
159	STD1	3	4	Standard	12/7/2015 11:11:10 AM	2487Channel 1
160	STD1	3	3	Standard	12/7/2015 10:55:07 AM	2487Channel 1
161	STD1	3	2	Standard	12/7/2015 10:39:04 AM	2487Channel 1
162	STD1	3	1	Standard	12/7/2015 10:23:02 AM	2487Channel 1
155	ELP R1406116 INICIO M2	5	1	Unknown	12/7/2015 12:15:45 PM	2487Channel 1
156	ELP R1406116 INICIO M1	4	1	Unknown	12/7/2015 11:59:31 AM	2487Channel 1
157	STD1	3	6	Standard	12/7/2015 11:43:16 AM	2487Channel 1
158	STD1	3	5	Standard	12/7/2015 11:27:14 AM	2487Channel 1
159	STD1	3	4	Standard	12/7/2015 11:11:10 AM	2487Channel 1
160	STD1	3	3	Standard	12/7/2015 10:55:07 AM	2487Channel 1
161	STD1	3	2	Standard	12/7/2015 10:39:04 AM	2487Channel 1
162	STD1	3	1	Standard	12/7/2015 10:23:02 AM	2487Channel 1
163	STD1	2	2	U	0:06:47 AM	2487Channel 1
164	STD1	2	1	U	50:45 AM	2487Channel 1
165	STD1	2	1	U	23:19 AM	2487Channel 1
166	BCO	1	1	U	10:57:59 AM	2487Channel 1

Select overlay chromatograms save as and print

The screenshot shows a software window titled "PREMOL SUPOSITOF as Control Administrator - Project". The main area contains a table with the following columns: Sample Name, Vial, Injection, Sample Type, Processed Channel Descr, Date Acquired, Date Processed, and Processing Method. The table lists six rows of data, all with "STD0" as the sample name and "Standard" as the sample type. A context menu is open over the first row, with options: New Method, Review, Compare, Review/Publisher, Process..., and Save.

Sample Name	Vial	Injection	Sample Type	Processed Channel Descr	Date Acquired	Date Processed	Processing Method
1 STD0	3	1	Standard		12/7/2015 10:23:02 AM	12/5/2015 9:01:52 PM	PREMOL_SUPOSITOF
2 STD0	3	2	Standard		12/7/2015 10:39:04 AM	12/5/2015 9:01:52 PM	PREMOL_SUPOSITOF
3 STD0	3	3	Standard		12/7/2015 10:55:07 AM	12/5/2015 9:01:52 PM	PREMOL_SUPOSITOF
4 STD0					12/7/2015 11:11:10 AM	12/5/2015 9:01:52 PM	PREMOL_SUPOSITOF
5 STD0					12/7/2015 11:27:14 AM	12/5/2015 9:01:52 PM	PREMOL_SUPOSITOF
6 STD0					12/7/2015 11:43:18 AM	12/5/2015 9:01:52 PM	PREMOL_SUPOSITOF

The "Open Report Method" dialog box contains the following text and options:

Please select the Report Method that you would like to use to preview the data that you have selected.

- Use the Report Method Default Individual Report in the acquisition Method Set PREMOL_SUPOSITOF
- Use the Report Method named Default.
- Use a Report Method that was generated to be appropriate for the selected data.
- Use the following Report Method:
- Use the currently open Report Method named Unlabeled.

Buttons: OK, Cancel, Help

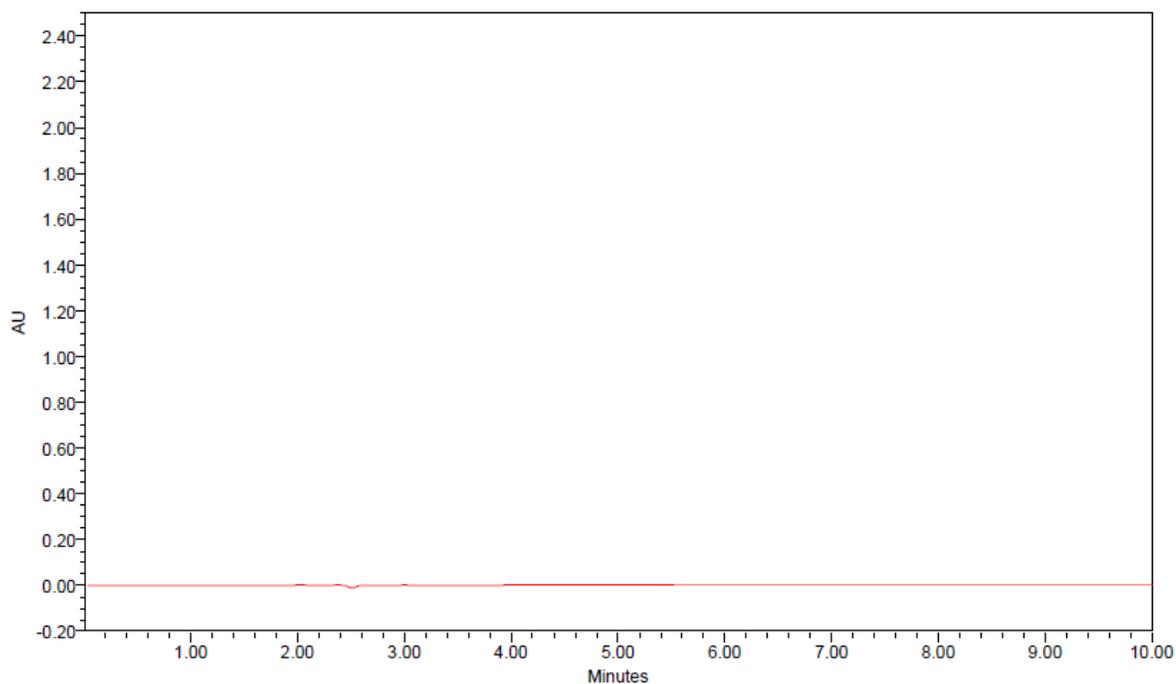
10.7. CROMATOGRAMAS



Peak Summary Report

Reported by User: System

Project Name: BENZOATODESODIO

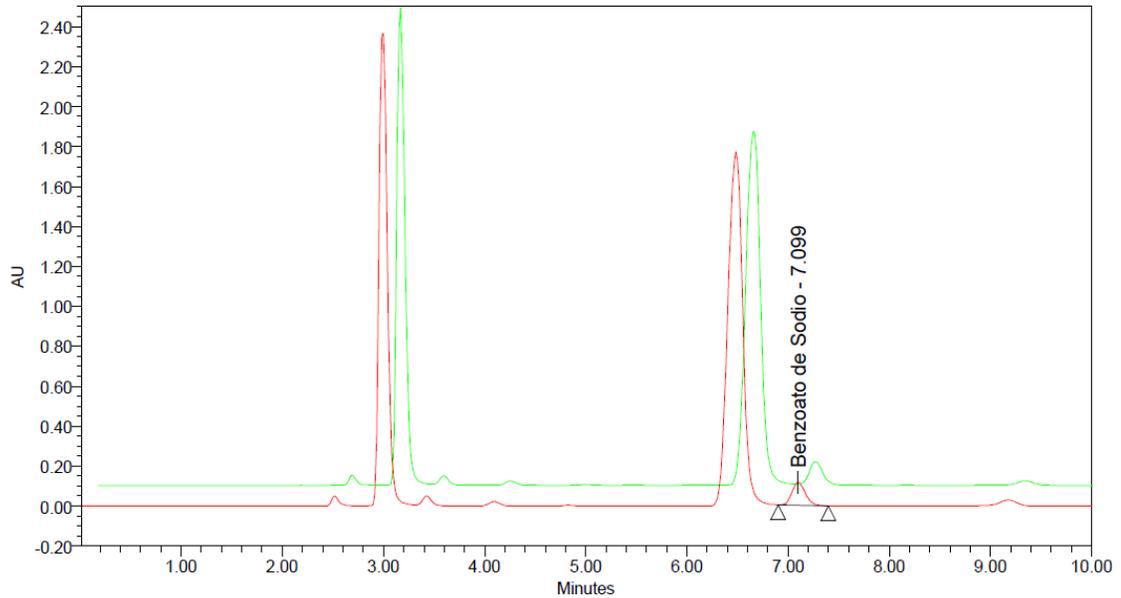


Sample Name: BLANCO; Date Acquired: 4/26/2016 3:26:54 PM; Vial: 26; Injection: 1; Injection Volume 15.00; Date Processed 4/26/2016 6:29:29 PM; Processing Method Benzoato de Sodio Ensayo

Peak Summary with Statistics Name: Benzoato de Sodio

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Amount
1	BLANCO	26	1	Benzoato de Sodio	7.023			
Mean					7.023			
Std. Dev.								
% RSD								

Figura 7. Cromatograma correspondiente a inyeccion de Blanco



— Sample Name: R1604752 INICIO M1; Date Acquired: 4/26/2016 4:57:20 PM; Vial: 29; Injection: 1; Injection Volume 15.00; Date Processed 4/26/2016 6:38:08 PM; Processing Method BENZOATO DE SODIO3
— Sample Name: R1604752 INICIO M2; Date Acquired: 4/26/2016 5:08:59 PM; Vial: 30; Injection: 1; Injection Volume 15.00; Date Processed 4/26/2016 6:38:08 PM; Processing Method BENZOATO DE SODIO3

Peak Summary with Statistics Name: Benzoato de Sodio

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Amount
1	R1604752 INICIO M1	29	1	Benzoato de Sodio	7.099	1044725.5283	100.00	103.9028
2	R1604752 INICIO M2	30	1	Benzoato de Sodio	7.099	1030654.8336	100.00	102.5034
Mean					7.099	1037690.1810		103.2031
Std. Dev.					0.000	9949.4836		0.9895
% RSD					0.01	0.9588		0.9588

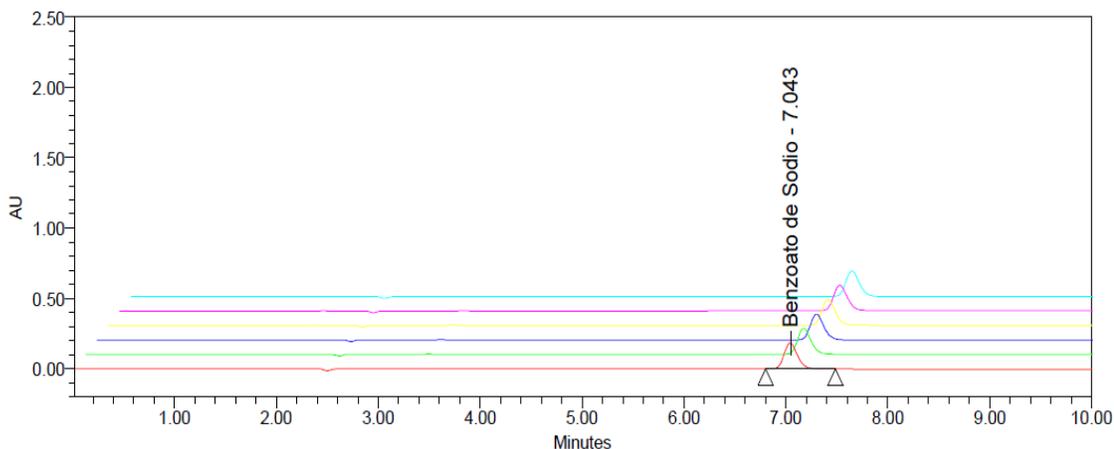
Figura 8. Cromatograma correspondiente a Muestras de Suspensión de Subsalicilato de Bismuto para la cuantificación de Benzoato de sodio como conservador



Peak Summary Report

Reported by User: System

Project Name: BENZOATODESODIO



- Sample Name: STD2; Date Acquired: 4/26/2016 3:38:30 PM; Vial: 27; Injection: 1; Injection Volume 15.00; Date Processed 4/26/2016 6:38:02 PM; Processing Method BENZOATO DE SODIO3
- Sample Name: STD2; Date Acquired: 4/26/2016 3:49:36 PM; Vial: 27; Injection: 2; Injection Volume 15.00; Date Processed 4/26/2016 6:38:02 PM; Processing Method BENZOATO DE SODIO3
- Sample Name: STD2; Date Acquired: 4/26/2016 4:00:42 PM; Vial: 27; Injection: 3; Injection Volume 15.00; Date Processed 4/26/2016 6:38:02 PM; Processing Method BENZOATO DE SODIO3
- Sample Name: STD2; Date Acquired: 4/26/2016 4:11:48 PM; Vial: 27; Injection: 4; Injection Volume 15.00; Date Processed 4/26/2016 6:38:02 PM; Processing Method BENZOATO DE SODIO3
- Sample Name: STD2; Date Acquired: 4/26/2016 4:22:54 PM; Vial: 27; Injection: 5; Injection Volume 15.00; Date Processed 4/26/2016 6:38:02 PM; Processing Method BENZOATO DE SODIO3
- Sample Name: STD2; Date Acquired: 4/26/2016 4:34:00 PM; Vial: 27; Injection: 6; Injection Volume 15.00; Date Processed 4/26/2016 6:38:02 PM; Processing Method BENZOATO DE SODIO3

Peak Summary with Statistics Name: Benzoato de Sodio

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Amount
1	STD2	27	1	Benzoato de Sodio	7.043	1704825.9328	100.00	169.3200
2	STD2	27	2	Benzoato de Sodio	7.064	1702818.0430	100.00	169.3200
3	STD2	27	3	Benzoato de Sodio	7.077	1702990.9175	100.00	169.3200
4	STD2	27	4	Benzoato de Sodio	7.078	1702751.8421	100.00	169.3200
5	STD2	27	5	Benzoato de Sodio	7.084	1699238.0206	100.00	169.3200
6	STD2	27	6	Benzoato de Sodio	7.091	1702283.9661	100.00	169.3200
Mean					7.073	1702484.7870		169.3200
Std. Dev.					0.017	1816.6635		0.0000
% RSD					0.24	0.1067		0.0000

Figura 9. Cromatograma correspondiente a inyección de Estándar de Cuantificación de Benzoato de Sodio

11. ANALISIS DE RESULTADOS

Originalmente se intentó diseñar un método por Espectrofotometría UV para la cuantificación de conservadores en una suspensión de subsalicilato de bismuto, debido a la complejidad de la formulación no resultó viable. Tomando en consideración lo anterior en el presente trabajo se decidió desarrollar una metodología por HPLC.

De acuerdo con la investigación bibliográfica sobre el comportamiento fisicoquímico del benzoato de sodio se eligió el adecuado sistema de detección UV, tomando en consideración que dicho conservador presenta respuesta en el espectro UV y durante el desarrollo del método se pudo corroborar lo anterior.

Debido a que el conservador es una molécula polar, se optó por la elección de una metodología en fase reversa eligiéndose una columna de características no polares C18, durante el desarrollo se encontró que la longitud de la columna era un factor determinante para la separación de los componente por lo tanto se eligió la de 250 mm, debido a que en las columnas de 100 y 50 mm, no se logró la separación de los picos.

Se eligió la fase móvil de acuerdo con lo siguiente: características de solubilidad de las sustancias y características no polares de la columna C18. Por lo anterior se pensó en metanol como la fase móvil, al correr las muestras no se encontraron respuestas, por lo tanto se decidió adecuar la fase móvil adicionándole solución amortiguadora de fosfatos pH 3.0, junto con acetonitrilo con el fin de aumentar la ionización y por ende la retención de las sustancias en el sistema de fase reversa, y con esto se logró encontrar respuesta de ambas sustancias. Se decidió no emplear gradiente en la fase móvil debido a que la proporción final % SA pH 3.0: %ACN:% MeOH (60:25:15) funcionó desde el inicio y logró una eficiente separación del benzoato de sodio como sustancia de interés.

A través de la experimentación se optimizaron las variables como: proporciones de la fase móvil, preparación y concentración de la muestra y estándares, flujo,

volumen de inyección, tiempo de retención y tiempo de corrida, para obtener una adecuada resolución de los picos y finalmente obtener un método por HPLC para la cuantificación de conservadores en suspensión de subsalicilato de bismuto y lograr el propósito de esta guía, el software Empower ofrece una interfaz de usuario gráfica para realizar la adquisición, proceso y gestión de los datos cromatográficos de la base de datos Empower y generar los informes oportunos. Todas las acciones del usuario se pueden realizar haciendo clic con el ratón o con los accesos directos del teclado. Con el software Empower y sus operaciones multitarea, permite tener abiertas varias ventanas al mismo tiempo y ver la adquisición de datos de un análisis en tiempo real y, al mismo tiempo, generar resúmenes de los resultados de datos adquiridos anteriormente o ajustar los parámetros de integración de cualquier inyección anterior mediante el cual el profesional tendrá la base suficiente para el manejo del software Empower de Waters.

Los resultados obtenidos demuestran la especificidad del método propuesto, ya que el mismo es específico para la determinación de benzoato de sodio y de algunos otros componentes de la fórmula que no interfieren con el compuesto de interés, dado que el análisis de los picos correspondientes demuestra la ausencia de analitos que coeluyan. Esto asegura que el mismo no presenta interferencias causadas por los productos de la formulación. El método propuesto tiene una ventaja de aplicación práctica en comparación con el de UV que no pudo ser implementado, ya que permite realizar la evaluación de la pureza cromatográfica de benzoato de sodio conforme al límite especificado, utilizando las mismas condiciones de análisis. Todo esto justifica su uso no solo en el control de calidad rutinario de materias primas, en los laboratorios de análisis farmacéutico, sino también en estudios de estabilidad.

12. CONCLUSIONES

De acuerdo con la investigación bibliográfica sobre el comportamiento fisicoquímico del compuesto benzoato de sodio como conservador en la formulación de una suspensión de subsalicilato de bismuto y a través de la experimentación y experiencia en laboratorio, se logró desarrollar un método de análisis indicativo de estabilidad por Cromatografía de líquidos de Alta Resolución, capaz de cuantificar benzoato de sodio en la formulación, y que a partir de los resultados encontrados se determina que este método es confiable y puede ser utilizado para la cuantificación de conservadores.

La estabilidad es una característica que está ampliamente relacionada con la seguridad y eficacia de los medicamentos, por lo que puede influir en la obtención del efecto terapéutico deseado.

Finalmente, debemos mencionar que es importante mantenernos apegados a los lineamientos establecidos en las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) y las Buenas Prácticas de Almacenamiento y Distribución (BPAD) de medicamentos para mantener la estabilidad durante todos los eslabones de la cadena productiva y de suministro de la industria farmacéutica.

Finalmente se cumple satisfactoriamente con los parámetros de desempeño establecidos, por lo que podemos asegurar su consistencia durante su uso en el análisis del producto terminado o bien en un estudio de estabilidad.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. <http://es.scribd.com/doc/19050563/Cromatografia-Principios-y-Aplicaciones>. Consultada en Febrero 2010
2. Marcel Dekker, "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology", Liquid oral preparations, 2a, Inc., New York, USA
3. NORMA Oficial Mexicana PROY-NOM-164SSA1-2005, Buenas prácticas de fabricación para fármacos.
4. www.sailab.es/02e3cf98dc0daba07/.../index.html. Consultada en Enero 20 de 2010
5. <http://www.losmedicamentos.net/articulo/desarrollo-y-validacion-de-una-tecnica-analitica-por>. Consultada en Enero 26 de 2010
6. <http://www.slideshare.net/Dayshany/soluciones-7719840>. Consultada en Marzo 20 de 2010
7. http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course_files/Tema_10.pdf. Consultada en Febrero 10 de 2010
8. <http://www.fing.edu.uy/iq/analisis/cursos/ainst/hplc.pdf>. Consultada en Marzo 20 de 2010
9. <file:///C:/Users/Invitado/Desktop/CURSO-MONOGRAFICO-DE-HPLC.htm>. Consultada en Marzo 20 de 2010
10. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 9ª edición, Vol. I, Secretaría de Salud, México

11. NOM-059-SSA1-2006, Buenas Prácticas de Fabricación para establecimientos de medicamentos, publicada del 31 de julio de 1998.

12. Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005. Estabilidad de fármacos y medicamentos (modificada a la NOM-073-SSA1-1993, Estabilidad de medicamentos, publicada el 3 de agosto de 1996).

13. <http://es.scribd.com/doc/102022330/49/Preparacion-de-la-fase-movil>
Consultada en Noviembre 25 del 2012

14. <http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/filtro.htm>
Consultada en Noviembre 25 del 2012

15. <http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/hplc.htm>
Consultada en Diciembre 01 del 2012

16. <http://www.slideshare.net/jestval/tablas-de-polaridad-de-solventes-organicos>
Consultada en Diciembre 01 del 2012

17. Empower Software Getting Started Guide Waters 71500031203, Revision A 2002 162 p.

18. Fonseca, D.A., Collins, K.F. and Collins, C.H. J. Chromatogr. A. 1030:209-215, 2004.

19. Kolodsick, K.J., Rossi, D. T. and Kingmill, C.A., Pharmagenomics. p.46 October, 2003.

20. Hsieh, Y., Wang. Y. Chackalamannil, S. And Korfmacher, W.A., Anal. Chem, 75:1812-1818, 2003.

21. Zeng, H., Deng, Y. And Wu J., J. Chromatogr. B. 788:331,2003.
22. Li, A.C. Chen, Y.I., Junga, H. Shou, W.Z., Jiang X. and Naidong, W., Chromatographia, 58:723-731, 2003.
23. Yan, B. Zhao, J., Brown, J.S., Blackwell, J. and Carr, P.W., Anal. Chem., 72:1253-1262, 2000.
24. Thompson, J. D. and Carr, P.W., Anal. Chem., 74:4150-4159,2002.
25. Thompson J. D. and Carr, P.W. Anal. Chem., 74:1017-1023, 2002.
26. Marin, S.J., Jones, B.A., Felix, W.D. and Clark, J., J. Chromatogr. A, 1030:255-262.
27. MacNair, J. E., Patel, K.D. and Jogerson, J.W. Anal. Chem, 71:700-708, 1999.
28. Tolley, I., Jogerson, J.W. and Moseley, M.A., Anal. Chem., 73:2985-2991. 2001
29. Ziang, Y., Yan, B., Yue, B., McNeff, C.V., Carr, P.W. and Lee, M.L., J.Chromatogr. A., 983:83-89, 2003.
30. AOAC. Official Method 967.15 Benzoic Acid in Food. Thin Layer Chromatographic Method. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16 th edition. Volume II (37): 8-9. March 1998.
31. Pylypiw HM Jr., and M.T. Grether Rapid high-performance liquid chromatography method for the analysis of sodium benzoate and potassium sorbate in foods. J. Chromatogr A. 23; 883 (1-2): 299-304,2000.

32. Mikami E; T. Goto; T. Ohno; H. Matsumoto and M. Nishida Simultaneous analysis of dehydroacetic acid, benzoic acid, sorbic acid and salicylic acid in cosmetic products by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. [J Pharm Biomed Anal. 28 \(2\) 261-267.](#) 2002.
33. Loftsson T Chapter 1: Introduction en “Drug stability for pharmaceutical scientists”. 1ª edición. Academic Press, Elsevier. Pp: 1-3(2014)
34. Sanches OR, Barata CP. Capítulo 23: Estudios de estabilidad en “Manual de tecnología farmacéutica” editado por Lozano M del C, Córdoba D, Córdoba M. 1ª edición. Elsevier, España.: 203-204. 2012
35. <https://bmeditores.mx/entorno-pecuario/estabilidad-de-medicamentos/>
36. Romero MCS, de Jesús FF. Capítulo 19: Preformulación de medicamentos en Manual de tecnología farmacéutica editado por Lozano M del C, Córdoba D, Córdoba M. 1ª edición. Elsevier, España.:195-198. 2012
37. Loftsoon T Chapter 2: Principles of drug degradation en ““Drug stability for pharmaceutical scientists”. 1ª edición. Academic Press, Elsevier. Pp: 5-62. (2014)
38. Loftsson T Chapter 3: Degradation pathways en ““Drug stability for pharmaceutical scientists”. 1ª edición. Academic Press, Elsevier. Pp: 63-104. (2014)
39. ICH, International Cooperation Harmonisation. Quality guidelines. [En línea] Disponible en: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines> Último acceso: 28 de enero del 2020
40. ICH, International Cooperation Harmonisation Stability testing of new drug substances and products Q1A (R2) [En línea]

Disponible en:
<https://database.ich.org/sites/default/files/Q1A%28R2%29%20Guideline.pdf> Último
acceso: 28 de enero del 2020

41. Loftsson T Chapter 7: Stability testing en “Drug stability for pharmaceutical scientists”. 1ª edición. Academic Press, Elsevier. Pp: 121-125. (2014)

42. VICH, International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products. VICH Guidelines. Quality: Stability. [En línea] Disponible en:
<https://www.vichsec.org/en/guidelines/pharmaceuticals/pharma-quality/pharma-stability.html> Último acceso: 9 de enero del 2021

43. DOF, Diario Oficial de la Federación (2016) Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015 Buenas prácticas de fabricación de medicamentos. Publicado el 5 de febrero del 2016.

44. DOF, Diario Oficial de la Federación (2016) Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios. Publicado el 7 de junio del 2016.

45. FDA, Food and Drug Administration (2016) No caiga en la tentación de usar medicinas vencidas. [En línea] Disponible en: <https://www.fda.gov/drugs/special-features/no-caiga-en-la-tentacion-de-usar-medicinas-vencidas> Último acceso: 24 de enero del 2021.

46. Gikonyo, D., Gikonyo, A., Luvayo, D., & Ponoth, P. Drug expiry debate: the myth and the reality. African health sciences, 19(3), 2737–2739. (2019).
<https://doi.org/10.4314/ahs.v19i3.49>