

26
233



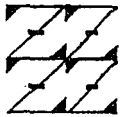
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

EVALUACION DE FACTIBILIDAD DE USO DE DIVERSAS SUBSTANCIAS PARA ELABORACION DE MICROESFERAS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
JOSE PABLO FLORES MEDEL

U N A M
del
ZARAGOZA



LO HUMANO
ES
DE NUESTRA FELICIDAD

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1993



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

JURADO

PRESIDENTE: QFB. FRANCISCA ROBLES LOPEZ.

VOCAL: QFB. MARIA DE LOS ANGELES VIDAL MILLAN.

SECRETARIO: QFB. ANGELICA PEREZ MORA.

SUPLENTE: QFB. GUILLERMINA ROJAS FERNANDEZ.

SUPLENTE: QFB. ROSA ESTELA LAZO JIMENEZ.

INDICE

	Pag.
Introducción.	1
I. Fundamentación del tema.	
A. Antecedentes.	3
B. Liberación sostenida.	4
1. Clasificación de los sistemas de liberación sostenida.	6
a. Liberación prolongada.	6
b. Liberación controlada.	6
C. Técnica de rocío-cogelación para producción de microesferas.	9
D. Análisis térmico.	12
1. Clasificación de las técnicas de análisis termal.	13
a. Análisis térmico diferencial.	13
b. Calorimetría diferencial de barrido.	13
E. Polimorfismo.	15
F. Prueba de disolución.	17
G. Espectroscopia de absorción infrarroja.	22
1. Técnicas de preparación de muestras.	24
H. Monografías de los fármacos empleados.	25
II. Planteamiento del problema.	38
III. Objetivo.	40
IV. Hipótesis.	41
V. Material.	42
VI. Equipo.	43

VII. Metodología.	44
VIII. Resultados.	59
IX. Análisis de resultados.	74
X. Conclusiones.	81
XI. Propuestas.	83
Apéndice 1.	84
Apéndice 2.	91
Bibliografía.	99

EVALUACION DE FACTIBILIDAD DE USO DE DIVERSAS SUBSTANCIAS PARA ELABORACION DE MICROESFERAS.

INTRODUCCION

Las exigencias de los ministerios de salud en todo el mundo y especialmente en los países desarrollados, son cada día mayores. Ellos piden hacer investigaciones exhaustivas que aseguren la eficacia, que evalúen la toxicidad y los efectos secundarios de un nuevo principio activo antes de autorizar su comercialización para uso humano y aún para uso veterinario ^(1,2). Si bien esta actitud ha hecho más seguro el manejo de los nuevos medicamentos y ha obligado el mayor desarrollo de la Toxicología, la Farmacología, y de la Farmacocinética entre otras áreas de la ciencia, también ha hecho impacto en los costos de investigación para la introducción de un nuevo principio activo y ha provocado la reducción del registro de nuevos medicamentos. Así, mientras que durante la década de los 50's las empresas farmacéuticas comercializaron un promedio de 40 nuevos fármacos por año, en 1975 se comercializaron únicamente 7 ⁽³⁾.

La combinación de exigencias de los ministerios de salud y el alto costo de investigación para la introducción de un nuevo principio activo al mercado ha llevado a las empresas farmacéuticas a buscar alternativas en sus investigaciones, enfocadas a principios activos bien establecidos en el mercado, para optimizar su uso terapéutico, esta búsqueda ha creado nuevos sistemas de liberación del fármaco en el organismo, como la liberación controlada cuya finalidad es la de proporcionar una liberación eficiente y prolongada de las dosis terapéuticas de un principio activo, evitando así la frecuente dosificación y al mismo tiempo minimizar los efectos tóxicos, y en algunos casos lograr una terapia localizada ⁽⁴⁾. De tal manera que sin perder ventajas terapéuticas y sí mejorando condiciones comerciales, al permitir la

posibilidad de patentes ⁽²⁾, se le considera a los sistemas de liberación controlada como una forma de dosificación muy ventajosa ⁽⁵⁾.

Debido a lo antes mencionado en el presente trabajo se evaluó la factibilidad de uso de diversas sustancias, Diazepam, Ibuprofen, Indometacina, Lidocaina base, Metoclopramida, Naproxen, Trimebutina base y Colesterol, para la elaboración de microesferas por el método de rocío-congelación con el fin de utilizarlas como un sistema de liberación controlada.

I. FUNDAMENTACION DEL TEMA

A. ANTECEDENTES

Con el panorama actual de la Industria Farmacéutica, las compañías farmacéuticas han enfocado, en parte, sus investigaciones hacia el desarrollo de sistemas de liberación controlada para los principios activos ya existentes. Tal es el caso del Centro AF de Estudios Tecnológicos S.A. (CAFET S.A.) el cual a través de una serie de investigaciones realizadas anteriormente desarrolló un método de rocío-congelación para la fabricación de microesferas con el objeto de emplearlas como un sistema de liberación controlada.

Las primeras investigaciones se encaminaron a seleccionar el método y condiciones más adecuadas para la obtención de microesferas a partir de un material previamente fundido, así como el diseño y desarrollo del equipo empleado para tal método (6).

Una vez seleccionado el método y desarrollado el equipo necesario, se lograron obtener las primeras microesferas, se realizaron las investigaciones correspondientes para optimizar las condiciones de proceso, tales como: reproducibilidad, rendimiento, forma y tamaño de partícula. En el mismo proceso el equipo sufrió modificaciones en su diseño para lograr así mejores resultados. También se realizaron estudios con las microesferas obtenidas en ese entonces, para evaluar la posibilidad de emplearlas como un sistema de liberación controlada (7).

Como resultado de estas investigaciones se cuenta, ahora, con un método y equipo para la fabricación de microesferas, mismo que continúa evolucionando durante el transcurso de las investigaciones. Con este equipo se pretende evaluar la posibilidad de obtener microesferas de varios principios activos y su posible aplicación como sistemas de liberación controlada.

B. LIBERACION SOSTENIDA

La finalidad de un sistema de liberación de un principio activo es el de proveer y mantener la cantidad terapéutica en el sitio de acción farmacológica para que actúe rápidamente. Para lograr esto se debe tener una liberación gradual que controle la velocidad de entrega del principio activo al tejido receptor.

En los sistemas de liberación convencionales (solución, cápsulas, tabletas etc.), al realizar una aplicación monodosis de éstos, se mantienen las concentraciones terapéuticas sólo durante un corto tiempo debido a la falta de habilidad para controlar la liberación gradual del principio activo. Dentro de estos mismos sistemas, se pueden lograr concentraciones terapéuticas por un tiempo más largo si se incrementa la dosis, pero el inconveniente es que se pueden alcanzar niveles tóxicos.

Para salvar este problema se recurre a la dosificación múltiple a intervalos de dosificación constantes, la cual también presenta algunos inconvenientes como son:

- Presencia de picos y valles largos en los niveles plasmáticos del principio activo cuando los intervalos de dosificación no son adecuados.
- Se requieren varias dosificaciones antes de alcanzar los niveles plasmáticos terapéuticos.
- Incomodidad del paciente y posibilidad de incumplimiento del régimen de dosificación múltiple, por los inconvenientes que éste representa.

Como respuesta a las deficiencias que presentan los sistemas de liberación convencionales y para tratar de alcanzar el objetivo de un sistema de liberación de un principio activo, eficacia y seguridad, se han desarrollado a través del tiempo investigaciones tanto tecnológicas como farmacéuticas dando como resultado nuevas

técnicas y conceptos de liberación, cuya finalidad también es la posibilidad de patentar principios activos por la aplicación de conceptos de liberación sostenida (2).

Dentro de los nuevos conceptos de liberación tenemos el de liberación sostenida la cual tiene como finalidad mantener las dosis terapéuticas por un mayor tiempo, al liberar lentamente el principio activo, lográndose disminuir los efectos tóxicos que se tienen por rebasar el rango terapéutico, proporcionar comodidad al paciente al disminuir la frecuencia de dosificación, y en algunos casos, una terapia localizada como por ejemplo la liberación intrauterina e intravaginal, a través de implantes vaginales, por ejemplo el anillo vaginal de elastómero de silicón, y el de acetato de medroxiprogesterona (2). Sin embargo este tipo de sistemas también presentan algunos inconvenientes como:

- Hay pérdida de flexibilidad en el régimen de dosificación y un incremento en el riesgo potencial si falla el sistema de liberación, por ejemplo si se emplean principios activos tóxicos o muy potentes se incrementa el riesgo al administrar grandes dosis en una preparación de liberación sostenida.
- El patrón de liberación no puede ser alterado para acomodarse a los requerimientos individuales del paciente, por ejemplo si el paciente experimenta algunos efectos indeseables el régimen no puede ser rápidamente ajustado (3).

1. Clasificación de los sistemas de liberación sostenida.

Los sistemas de entrega de principios activos por liberación sostenida se pueden clasificar en:

- a. Liberación prolongada.

- b. Liberación controlada.

a. Liberación prolongada.

En un sistema de liberación prolongada no se obtienen niveles constantes del principio activo en la sangre o tejido blanco, pero sin embargo la duración de la acción farmacológica es superior al de la alcanzada en una liberación convencional ⁽¹⁰⁾, ejemplo tabletas de acción repetida.

b. Liberación controlada.

En un sistema de liberación controlada se mantienen niveles constantes del principio activo en la sangre o tejido blanco por un tiempo mayor al de una liberación convencional ⁽¹⁰⁾, se reduce el rango del valor de la concentración máxima disminuyendo así los efectos colaterales y prolongando la concentración plasmática en el estado estacionario, se obtiene además una liberación de orden cero ⁽⁸⁾. Los sistemas de liberación controlada pueden ser administrados vía oral o parenteral. En la vía oral las clases más importantes son los hidrogeles y los comprimidos con liberación por ósmosis. En la vía parenteral las clases más importantes son los sistemas inyectables a base de microesferas y liposomas. Los implantes vaginal y subcutáneos también son usados en forma importante.

Los productos inyectables con microesferas biodegradables son un ejemplo del desarrollo de la más reciente tecnología para formas de dosificación de liberación

controlada de uso parenteral. Los productos en forma de microesferas son polvos con libre flujo que consisten en partículas esféricas con un diámetro menor a 250 micras, idealmente menores de 125 micras ⁽²⁾. Las partículas de este tamaño pueden ser fácilmente administradas suspendiéndolas en un vehículo acuoso adecuado e inyectándolas en la forma convencional.

La velocidad de disolución en las microesferas está controlado por el tamaño de partícula y, dependiendo de las sustancias empleadas para la fabricación, por un fenómeno de difusión, erosión y la misma solubilidad del principio activo ^(1, 12).

Los nombres que reciben estas partículas esféricas en la literatura es variado como se muestra a continuación:

- Microcápsulas.
- Microesferas.
- Micropartículas.
- Nanocápsulas.
- Nanosferas.
- Nanopartículas.

En general los nombres que más se utilizan son microcápsulas y microesferas y entre los cuales se han establecido ciertas diferencias en cuanto tamaño y a la distribución del principio activo en la partícula teniendo así lo siguiente para cada uno:

- Microcápsula. Es aquella partícula esférica que contiene localizado centralmente al principio activo y donde éste es cubierto por una membrana polimérica única ^(1,2).

Microesfera. Es aquella partícula esférica que contiene distribuido al principio activo; esto es, la estructura interna es una matriz del principio activo y el excipiente, generalmente, polimérico (1,2)

En la figura 1 se ejemplifica de manera esquemática las diferencias entre las microcápsulas y las microesferas.

Dentro de las técnicas de preparación de las microesferas tenemos las siguientes:

- Coaservación simple y compleja.
- Evaporación de solvente.
- Rocío-congelación.

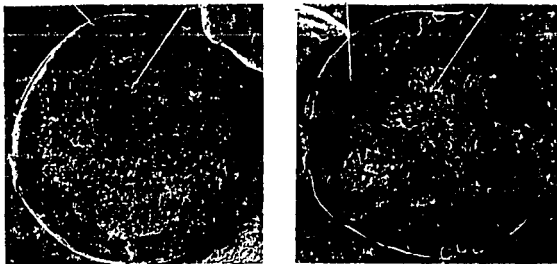
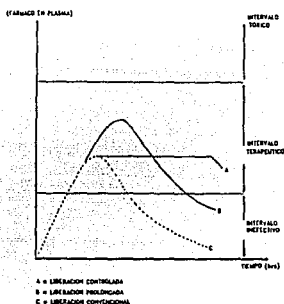


Figura 1. Estructura interna de una microcápsula (izquierda) y una microesfera (derecha).

En el desarrollo de un sistema de liberación controlada se deben considerar ciertas características del principio activo a utilizar tales como coeficiente de partición, el pKa, la estabilidad, tiempo de vida media, la solubilidad en agua etc.

En la gráfica 1 se ejemplifica de manera esquemática las diferencias entre la liberación convencional, la liberación prolongada, y la liberación controlada.



Gráfica 1. Diferencias entre la liberación convencional, prolongada, y controlada.

C. TECNICA DE ROCIO-CONGELACION PARA PRODUCCION DE MICROESFERAS

La técnica de rocío-congelación para la obtención de microesferas sobre el cual desarrollaremos este trabajo fue introducido por Robinson, M.J., Bondi, A., y Swintosky, J.V. en 1958 ⁽⁹⁾ la cual se puede definir de la siguiente manera:

La técnica de rocío-congelación está definida como el rociado de un material, previamente fundido, hacia una cámara a bajas temperaturas, donde las gotas de

rocío solidifican generalmente como partículas esféricas individuales y con una distribución de tamaños de partículas definida. Sus características físicas dependen de las condiciones operacionales. Esto es, con ésta técnica podemos controlar, dentro de ciertos límites, la forma esférica y tamaño de partícula del producto final las cuales son dos variables de gran importancia en el comportamiento de la disolución de principios activos de baja solubilidad en agua (7,10). Otra posibilidad en ésta técnica, es el utilizar una matriz de soporte como polímeros, lípidos y otros materiales con el fin de modificar la cinética de liberación del principio activo. Es obvio que un requisito indispensable para emplear esta técnica es que al fundir la muestra no sufra procesos de degradación.

Las ventajas antes mencionadas confieren al producto obtenido por esta técnica la posibilidad de ser empleado como un sistema de liberación controlada.

Ya han sido reportados anteriormente estudios para obtener microsferas de algunas substancias, se establecieron en estos algunos parámetros que influyen sobre el tamaño promedio de partícula obtenido, la adición de modificadores que regulen la velocidad de disolución, la influencia del tamaño de partícula sobre la velocidad de disolución etc. (11,12).

En el caso particular de este trabajo de tesis, el equipo de rocío-congelación utilizado esta integrado por lo siguiente:

- Reservorio para fusión del producto.
- Sistema de calentamiento.
- Sistema de enfriamiento (cámara fría).
- Sistema de atomización de presión por boquilla.
- Sistema de extracción.
- Sistema colector de partículas.

La función de cada parte del equipo es la siguiente:

- El reservorio es el contenedor y sitio donde funde la muestra.
- El sistema de calentamiento lleva a cabo la fusión y garantiza el estado líquido de la muestra hasta alcanzar el proceso de rocío.
- El sistema de enfriamiento a través de la cámara fría permite la solidificación del producto rociado.
- El sistema de atomización de presión por boquilla genera el rocío del producto para obtener las microesferas.
- El sistema de extracción conduce el producto rociado hacia el sistema colector.
- El sistema colector almacena al producto rociado.

En la figura 2 se muestra el esquema general del equipo de rocío-congelación.

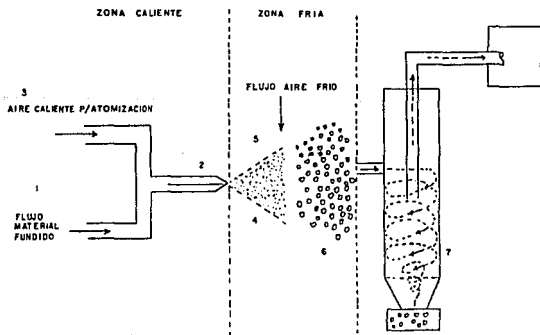


Figura 2. Esquema general del equipo de rocío-congelación. En la figura se observa: 1-Flujo de material fundido, 2-rocío de material fundido, 3-flujo de aire caliente para generar rocío, 4-patrón de rocío resultante, 5-interface material rociado-flujo de aire frío, 6-solidificación de las gotas de rocío, 7-sistema colector, 8-filtro de aire.

D. ANALISIS TERMICO

Durante el proceso de manufactura de las microesferas, por el método de rocío-congelación, se lleva a cabo un proceso de solidificación, por lo que es importante evaluar el comportamiento térmico de las microesferas obtenidas y de las materias primas correspondientes para detectar posibles cambios en el grado de cristalinidad entre éstos, así como también la posibilidad de formación de polimorfos, ya que estos factores influyen directamente sobre la velocidad de disolución de las microesferas obtenidas. El análisis térmico es una herramienta que nos ayudó a conocer estos parámetros.

El análisis térmico está definido, de acuerdo con la Confederación Internacional de Análisis Térmico (ICTA), como la serie de técnicas en la cual una propiedad física de una sustancia y/o sus productos de reacción es medida como una función de la temperatura, mientras la sustancia es sujeta a un programa de temperatura controlada ⁽¹³⁾. El calentamiento o enfriamiento de una sustancia a una velocidad específica de calentamiento o enfriamiento puede causar varios cambios como son fusión, cristalización, deshidratación, descomposición, y otros. Estos cambios ocurren a una temperatura conocida para cada sustancia, mientras que el grado o velocidad de cambio es afectado por la estructura del cristal, aditivos o impurezas en la sustancia. El análisis térmico es un método ampliamente utilizado para caracterizar las sustancias o materiales como por ejemplo las empleadas en la Industria Farmacéutica, en el campo de manipulación de polímeros ⁽¹⁴⁾.

1. Clasificación de las técnicas de análisis termal.

Dentro de las técnicas del análisis térmico las más usuales en farmacia son el análisis térmico diferencial (DTA), y la calorimetría diferencial de barrido (DSC), a continuación se describen brevemente ambos métodos.

a. Análisis térmico diferencial.

El DTA es una técnica en la cual la diferencia de temperatura entre la substancia y un material de referencia, térmicamente inerte, es medida como una función de la temperatura mientras la substancia y material de referencia son sujetos a un programa de temperatura controlado. La detección de esta diferencia de temperatura se realiza por termopares los cuales tienen una sensibilidad de detección muy alta.

Los cambios de temperatura en la muestra son debidos a cambios físicos (fusión, sublimación, cambios de forma cristalina, cristalización, etc.) o cambios químicos (oxidación, reducción, etc.), y se manifiestan en forma de emisión o absorción de calor llamándose a éstas respuestas exotermas y endotermas respectivamente.

b. Calorimetría diferencial de barrido.

La calorimetría diferencial de barrido se divide en dos métodos:

- 1) Por flujo de calor.
- 2) Por compensación de calor.

1) Calorimetría diferencial de barrido por flujo de calor. Es una técnica en la cual la diferencia en la energía introducida en una substancia y un material de referencia es medida como una función de la temperatura mientras la substancia y el

material de referencia, térmicamente inerte, son sujetos a un programa de temperatura controlado.

Como material térmicamente inerte o de referencia se usa generalmente la alfa-alúmina, la cual no presenta ningún cambio térmico a una temperatura menor a 500°C sólo eleva su temperatura sin llegar a presentar fusión, sublimación, o descomposición.

Las ventajas que presenta la calorimetría diferencial de barrido por flujo de calor son: Bajo nivel de ruido, línea base estable, y alta sensibilidad en la medición.

Las limitaciones que presenta son: No es adecuado para sustancias que descompongan, por lo cual cuando se analiza una muestra de este tipo no se debe permitir que ésta alcance su temperatura de descomposición pues los termopares y los platillos son atacados (al menos en el DSC-50 marca Shimadzu), la atmósfera de medición es limitada a gas inerte, como son nitrógeno y helio (estos gases permiten una homogeneización de la temperatura del horno y además ayudan a eliminar impurezas durante el análisis).

Durante la evaluación térmica de las muestras empleadas en este trabajo se usará la calorimetría diferencial de barrido por flujo de calor.

2) Calorimetría diferencial de barrido por compensación de calor.. Es una técnica muy similar al método por flujo de calor pero donde la diferencia en la energía introducida es obtenida por el suministro de poder eléctrico a la substancia y material de referencia.

La diferencia práctica entre un DTA y un DSC es que el DSC permite el cálculo directo del calor de fusión de la muestra y el DTA No.

E. POLIMORFISMO

Durante el proceso de fabricación de las microesferas se emplean condiciones drásticas de calentamiento-enfriamiento que pueden favorecer la formación de diferentes tipos de sistemas cristalinos (polimorfos) por tal motivo es importante conocer a cerca de este fenómeno.

El polimorfismo es la capacidad de una sustancia para presentarse en forma sólida, amorfa, o en más de una forma cristalina. Por convención las formas polimórficas cristalinas, son designadas por números romanos. La forma I es generalmente la mas estable a la temperatura ambiente. Las otras formas son numeradas en orden a su descubrimiento, el cual frecuentemente, pero no necesariamente, sigue un orden de estabilidad. Estas diferentes formas cristalinas pueden presentar también, diferencias en sus propiedades físicas tales como: Color, dureza, punto de fusión, solubilidad y otras más. Dentro de estas diferencias en propiedades físicas la solubilidad es muy importante, para nuestro estudio, pues es bien sabido que la eficacia de un principio activo depende de su solubilidad en la sangre, fluidos corporales o en los fluidos gastrointestinales para poder ser absorbido y llegar así a su sitio de acción terapéutica, y como entre las formas cristalinas existen diferencias en solubilidad resulta importante evaluar la velocidad de disolución como un parámetro de control, para garantizar un buen control de calidad (prueba de disolución) de los medicamentos que contengan este tipo de sustancias. Se ha encontrado que el polimorfo metaestable es el de mayor solubilidad y casi siempre el de menor punto de fusión. Esto significa que si se utiliza la forma metaestable en un medicamento puede sufrir una transformación y pasar a la forma mas estable, la cual tiene una menor velocidad de disolución y un punto de fusión mas alto, trayendo como consecuencia diferencias en la velocidad de disolución y por consiguiente diferencias en su efectividad terapéutica (15).

A pesar de estos inconvenientes hay varios principios activos que son utilizados en la forma metaestable, como por ejemplo el Barbital, Estrona, y Sulfatiazol por presentar una velocidad de transformación muy lenta. También es posible lograr una transformación lenta con la ayuda de sustancias que la retarden y poder utilizar así las formas metaestables que son más solubles ⁽¹⁵⁾.

Si bien la forma metaestable puede ser en algunos casos aceptable clínicamente, la forma estable es preferida desde el punto de vista de la estabilidad física y química por las ventajas que esto representa.

Por otra parte las sustancias pueden cristalizar de diferente forma dependiendo de las condiciones usadas para cristalizar como por ejemplo: Cristalización de los diferentes polimorfos a partir de un disolvente adecuado, por superenfriamiento de la sustancia fundida, debajo de los puntos de fusión, cristalizando primeramente la forma metaestable, y si se deja esta a temperatura ambiente debe pasar sucesivamente a las formas más estables hasta llegar a la de mayor estabilidad.

De lo anteriormente dicho se deduce la importancia de determinar la presencia de polimorfismo en las diferentes sustancias a ser estudiadas en este trabajo, antes y después del tratamiento ya que durante el proceso de fabricación de las microsferas se utilizan condiciones drásticas de calentamiento y enfriamiento que pueden favorecer la formación de diferentes formas cristalinas.

F. PRUEBA DE DISOLUCION

La prueba de disolución surge como una necesidad para tratar de solucionar los problemas de biodisponibilidad biológica de los medicamentos utilizados en el mercado y así garantizar su eficacia terapéutica; todo esto atrajo cada vez más y más la atención de la industria, de los organismos encargados de la regulación farmacéutica, y de los expertos en esta área. Conduciendo este problema, desde los 60's, a la búsqueda de métodos oficiales para el desarrollo de pruebas de disolución y asegurar así la biodisponibilidad biológica. Siendo hasta 1970 donde se implantaron como métodos de disolución oficiales el método de canastillas y el de paletas, aparato 1 y 2 respectivamente (16).

Siendo actualmente la prueba de disolución un requerimiento legal para los medicamentos compendiales y además para los aún no compendiales, estos incluyen vitaminas (usada como complemento alimenticio) productos veterinarios, supositorios, y preparaciones de liberación sostenida.

La prueba de disolución es básicamente una herramienta que nos permite evaluar de manera simple y relativamente barata la velocidad de disolución de un producto y resulta muy útil en los siguientes casos:

- Estudios de bioequivalencia.
- Estudios de disolución intrínseca.
- Durante el desarrollo y control de calidad de un producto farmacéutico.

Dentro de los conceptos teóricos que se manejan en la prueba de disolución se tienen los siguientes:

Todos los métodos de disolución se basan en que hay una renovación continua en la interface sólido-líquido entre la forma de dosificación y el fluido de disolución siendo esto definido y controlado para poder ser repetible.

La velocidad de disolución se define como la cantidad de un principio activo en una forma de dosificación disuelto por unidad de tiempo bajo condiciones normalizadas de interfase líquido-sólido, temperatura, y composición de medio. Una expresión matemática para esta definición es la ecuación de Noyes-Whitney la cual se expresa de la siguiente manera:

$$\frac{dW}{dt} = KS(C_{sat} - C_{sol})$$

Donde:

$$\frac{dW}{dt} = \text{velocidad de disolución.}$$

K = constante de disolución

S = superficie del sólido

C_{sat} = concentración de saturación

C_{sol} = concentración a un tiempo x

El principal parámetro experimental que debe ser controlado durante una prueba de disolución es la concentración de saturación la cual debe ser mayor a la concentración a un tiempo "x", lo cual se logra colocando de cinco a diez veces el volumen de medio de disolución requerido para alcanzar el punto de saturación, a esto se le conoce como condiciones "de no saturación (sink)".

En 1978 Underwood y Cadwallader consideraron a la superficie del sólido expuesta al disolvente como una constante y redujeron la ecuación a:

$$\frac{dW}{dt} = K$$

Donde:

dW/dt = velocidad de disolución

K = constante de disolución

Esta expresión se utiliza para los estudios de disolución intrínseca.

Sin embargo la velocidad de disolución se ve afectada por muchos factores como los siguientes:

- El área de la forma farmacéutica no es constante, al disminuir debido a la disolución gradual o por el efecto de la desintegración.
- Por variación en el tamaño de partícula, forma, y densidad; incrementándose con la disminución del tamaño de partícula.
- Influencia de lubricantes en tabletas, como el estearato de magnesio.
- La adsorción de gases.

Por lo que es sumamente difícil encontrar un modelo que considere todos estos factores durante una disolución.

Aunque hay métodos de disolución oficiales perfectamente estandarizados muchas técnicas de disolución tienen que ser concebidas, improvisadas, y ocasionalmente reemplazadas según el producto a evaluar (forma farmacéutica) ya que los métodos oficiales no producen resultados satisfactorios en todos los casos y

sobre todo en los sistemas de entrega de principios activos por liberación controlada en donde las grandes limitaciones de tales métodos impiden su uso ⁽¹⁷⁾.

A continuación se describen las limitantes de los métodos de disolución oficiales para evaluar la disolución de un sistema de entrega del principio activo por liberación controlada ^(16, 17, 18):

- Volumen de medio de disolución limitado a 900 mL, siendo una limitante para los productos que contienen principios activos de baja solubilidad. Para salvar este inconveniente se propone el uso de vasos de 2 y 4 litros para mantener condiciones "sink" al incrementar el volumen de medio de disolución.
- No es factible el cambio de medio de disolución ni el cambio de pH durante la prueba.
- No son adecuados para evaluar la disolución de cápsulas, supositorios, y polvos debido a que flotan.
- Son adecuados sólo para formas de dosificación con principios activos de moderada o alta solubilidad.

Un método que recientemente fue aceptado por la USP para evaluar la prueba de disolución en sistemas de liberación controlada es el sistema de disolución de celda con flujo continuo ⁽²⁴⁾ el cual presenta las siguientes ventajas ^(16, 17, 18):

- Util para productos con principios activos de baja solubilidad en agua, al proporcionar condiciones "sink" infinitas.
- Facilidad en cambio de medio de disolución y pH durante la prueba.

- Mínima estancia del medio de disolución con el producto para evitar problemas de degradación durante el proceso de disolución.
- Adaptación del sistema para ser empleado como sistema abierto o cerrado.
- Fácil muestreo y automatización.
- Adaptabilidad a los calibradores USP, tabletas desintegrantes y no desintegrantes por ejemplo: tabletas de prednisona y ácido salicílico.
- Adecuado para polvos, cápsulas de gelatina dura y blanda, supositorios, tabletas y formas de liberación controlada.
- Velocidad de flujo variable, generalmente de 4,8 y 16 mL/min.

Las desventajas que presenta el sistema de disolución de celda con flujo continuo son:

- Se utilizan grandes volúmenes de medio de disolución cuando el sistema es abierto, con un flujo de 16 mL/min en 24 hrs, se requieren 138 L utilizando seis celdas.
- La validación de la velocidad de flujo durante la prueba es difícil.
- Alteraciones en la velocidad de flujo cuando se tapan los filtros.
- El sistema de bombeo debe ser a través de una bomba de pistón para evitar las pulsaciones.

En la siguiente figura se muestra un esquema del equipo de disolución de celda con flujo continuo.

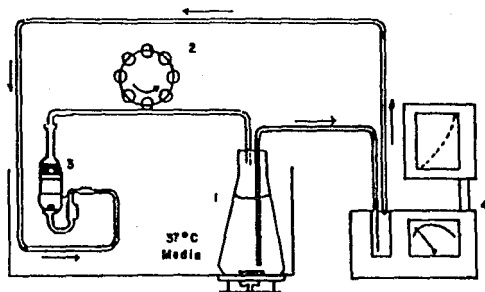


Figura 3. Esquema del equipo de disolución de celda con flujo continuo. En la figura se observa: 1-Reservorio del medio de disolución, 2-Bomba peristáltica, 3-celda de disolución, y 4-espectrofotómetro.

Debido a las características del método de disolución de celda con flujo continuo y en base a resultados de estudios realizados anteriormente, la prueba de disolución se realizará por este método. Aunque hay algunos trabajos donde se a evaluado el comportamiento en disolución in vitro de microesferas utilizando el método de canastillas ⁽¹¹⁾ y a través de un baño de agitación ⁽¹²⁾ en donde se obtuvo además, una velocidad de disolución mayor para las microesferas pequeñas con respecto a otras de mayor tamaño.

G. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION INFRARROJA

Para garantizar que los principios activos ensayados no sufren degradación alguna al ser sometidos al proceso de fabricación de microesferas se debe realizar a cada principio activo, con el cual se obtuvieron microesferas, un análisis

comprobatorio tal como: Un espectro de absorción al infrarrojo antes y después del proceso.

La región infrarroja del espectro abarca radiación de números de onda que varían de aproximadamente 13000 a 33 cm^{-1} , o longitudes de onda de 0.75 a 300 micras. Pero las aplicaciones de mediciones de absorción infrarroja se limitan a la región de 4000 a 667 cm^{-1} (2.5 a 15 micras) ⁽¹⁹⁾.

El principal uso de la espectroscopia de absorción infrarroja ha sido la identificación de compuestos orgánicos, ya que los espectros correspondientes suelen ser complejos y contienen numerosos máximos y mínimos que pueden emplearse para fines de comparación. Por lo que, éste representa una propiedad física verdaderamente única para un compuesto orgánico. Con la excepción de isómeros ópticos, no existen dos compuestos que tengan curvas de absorción idénticas ⁽¹⁹⁾.

Además, debido a su gran selectividad posibilita a veces la cuantificación de una sustancia en una mezcla compleja sin la realización de mucho trabajo previo de separación. Pero a menudo se encuentran otros procedimientos más precisos o más cómodos; por lo que las aplicaciones cuantitativas son de menor importancia que las cualitativas. También es ampliamente utilizado debido a que todas las especies moleculares orgánicas e inorgánicas absorben en la región infrarroja con excepción de las moléculas homonucleares como O_2 , N_2 , o Cl_2 .

Para absorber radiación infrarroja, una molécula debe experimentar un cambio neto en el momento dipolar como consecuencia de su movimiento vibratorio o rotatorio. En otras palabras cuando la frecuencia de la radiación iguala a la frecuencia de una vibración natural de la molécula, ocurre una transferencia neta de energía que da por resultado un cambio en la amplitud de la vibración molecular; en consecuencia hay absorción de la radiación.

1. Técnicas de preparación de muestras.

La técnica empleada para la obtención de un espectro de absorción al infrarrojo depende del tipo de muestra que se va analizar, teniendo así técnicas para preparación de:

- Muestras de gases.
- Muestras de soluciones.
- Muestras de líquidos puros.
- Muestras de sólidos.

A continuación se describe la técnica para sólidos por ser la utilizada en este trabajo.

La técnica para sólidos tiene como limitante que el tamaño de partícula del sólido suspendido sea menor que la longitud de onda de la radiación; si no se cumple, se pierde una parte importante de la radiación por dispersión.

Se emplean dos técnicas:

- Mezclando de 2 a 5 mg de la muestra finamente triturada, con tamaño menor a 2 micras, con una o dos gotas de aceite mineral "nujol". Luego se examina la mezcla como una delgada película entre placas planas de cloruro de sodio.
- Mezclando en un mortero 1.5 miligramos de la muestra finamente triturada con 300 mg de polvo de bromuro de potasio desecado. La mezcla se comprime en una prensa especial a una presión de 68947600 a 103421400 Pa para dar un disco transparente. Es conveniente realizar la compresión utilizando un sistema de vacío para eliminar el aire ocluido. El disco se coloca en el equipo y se obtiene el espectro correspondiente, exhibiendo con frecuencia bandas en 2.9 y 6.1 micras (3448 y 1639 cm^{-1}) debido a humedad absorbida.

La técnica aplicada en este trabajo consistió en suspender la muestra en bromuro de potasio desecado.

II. MONOGRAFIAS DE LOS FARMACOS EMPLEADOS

Para conocer algunas características físicas, químicas, y biológicas de los principios activos seleccionados en base a su solubilidad y punto de fusión y con posibilidad de emplearse en el proceso de fabricación de microesferas a continuación se describe brevemente cada uno de ellos.

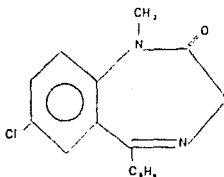
1. Diazepam.

Nombre propio: Alupram; Apozeepam; Novodipam; Paxeil; Valium y otros más.

Nombre químico: 7-Cloro-1,3-dihidro-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona.

Fórmula condensada: $C_{16}H_{13}ClN_2O$, peso molecular 284.7

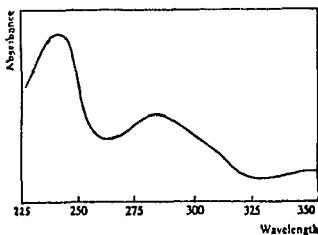
Fórmula semidesarrollada:



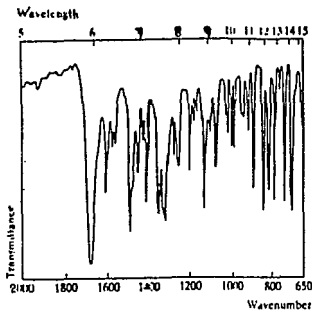
Propiedades físicas: El Diazepam es un polvo cristalino de color blanco o amarillo; con un punto de fusión de 131 a 135°C, descompone a 180°C (23); muy

ligeramente soluble en agua; soluble 1 en 25 de etanol, 1 en 2 de cloroformo, y 1 en 39 de éter; una constante de disociación de 3.3.

El espectro de absorción a la radiación ultravioleta en medio ácido presenta máximos a 242 nm ($A=1020$ a), 284 nm y 366 nm. El espectro de absorción al infrarrojo tiene los picos principales en los números de onda de 1681, 1313, 705, 840, 1125, y 740 cm^{-1} (en un comprimido de bromuro de potasio). En las gráficas 2 y 3 se muestran los espectros de absorción al UV y al IR respectivamente (20).



Gráfica 2. Espectro de absorción al UV para Diazepam.



Gráfica 3. Espectro de absorción al IR para Diazepam.

Farmacología. Se absorbe rápidamente y por completo después de la administración oral. Concentración terapéutica en plasma de 0.1 a 2.5 mcg/mL. Vida media 20-100 horas. Dosis usualmente 5 a 30 mg al día.

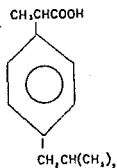
2. Ibuprofen.

Nombres propios: Amersol; Apsifen; Brufen; Ebufac; Nurofen.

Nombre químico: 2-(4-Isobutilfenil)propionico ácido.

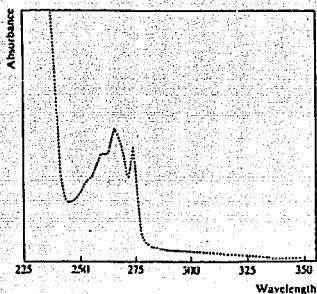
Fórmula condensada: $C_{13}H_{18}O_2$, peso molecular 206.3

Fórmula semidesarrollada:

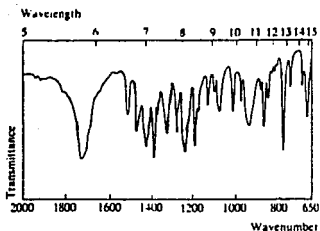


Propiedades físicas: Polvo o cristales blancos, punto de fusión 75 a 78°C. Prácticamente insoluble en agua; soluble 1 en 1.5 de etanol, 1 en 1 de cloroformo, y 1 en 2 de éter. Constante de disociación pK_a 4.4, 5.2.

Espectro a la radiación ultravioleta en solución de álcali presenta máximos a 265 nm ($A = 18.5 a$), 273 nm. Principales picos del espectro de absorción al infrarrojo a los números de onda de 1721, 1232, 779, 1185, 1273, y 870 cm^{-1} en comprimidos de bromuro de potasio. Los espectros de absorción al UV y al IR se muestran en las gráficas 4 y 5 respectivamente ⁽²⁰⁾.



Gráfica 4. Espectro de absorción al UV de Ibuprofen.



Gráfica 5. Espectro de absorción al IR de Ibuprofen.

Farmacología. Rápido y completamente absorbido después de una administración oral. Concentración terapéutica en plasma, usualmente de 20 a 30 mcg/mL. Vida media en plasma cerca de dos horas. Dosis 0.6 a 2.4 g diariamente.

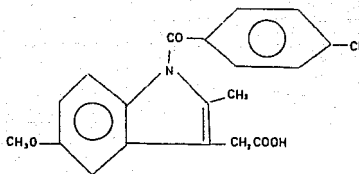
3. Indometacina.

Nombres propios: Artracin; Indoflex; Indolar; Indocin.

Nombre químico: [1-(4-Clorobenzoil)-5-metoxi-2-metilindol-3-il] acético ácido.

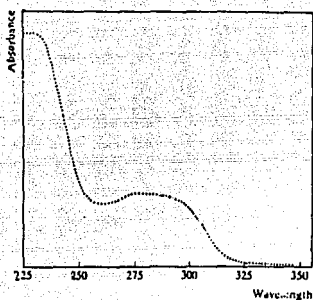
Fórmula condensada: $C_{19}H_{16}ClNO_4$, peso molecular 357.8

Fórmula semidesarrollada:

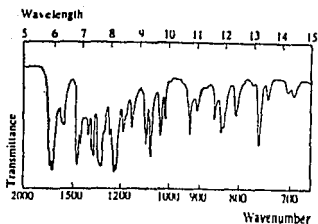


Propiedades físicas: Polvo cristalino blanco a amarillo. Punto de fusión 158 a 162°C, exhibe polimorfismo la forma I funde a 155°C y la II a 162°C (22). Prácticamente insoluble en agua; soluble 1 en 50 de etanol, 1 en 30 de cloroformo, y 1 en 40 de éter; soluble en acetona. Constante de disociación pKa 4.5.

Espectro de absorción a la radiación ultravioleta en álcali acuoso presenta máximos a 230 nm y 279 nm ($A = 213$ a). El espectro de absorción al infrarrojo tiene picos principales a los números de onda de 1681, 1228, 1218, 1706, 299, 1065 cm^{-1} en comprimidos de bromuro de potasio. En las gráficas 6 y 7 se muestran los espectros de absorción al UV y al IR (20).



Gráfica 6. Espectro de absorción al UV de Indometacina.



Gráfica 7. Espectro de absorción al IR de Indometacina.

Farmacología. Rápido y completamente absorbido después de una administración oral. Concentración terapéutica en plasma, usualmente de 0.5 a 3 mcg/mL. Vida media en plasma 3 a 15 horas. Dosis 50 a 200 mg diariamente.

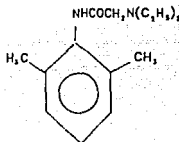
4. Lidocaína.

Nombre propio: Lignocaína.

Nombre químico: 2-Dietilaminoaceto-2',6'-xilidida.

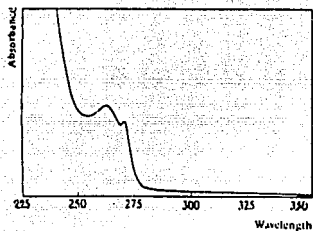
Fórmula condensada: $C_{14}H_{22}N_2O$, peso molecular 234.3

Fórmula semidesarrollada:

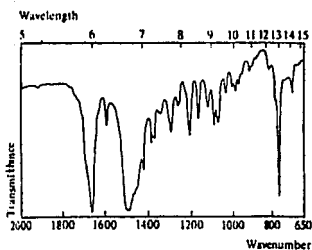


Propiedades físicas: Polvo cristalino de blanco a ligeramente amarillo. Punto de fusión 66 a 69°C. Prácticamente insoluble en agua; muy soluble en etanol y cloroformo; libremente soluble en éter. Constante de disociación pKa 7.9 (25°C).

Espectro de absorción a la radiación ultravioleta en medio ácido presenta un máximo a 263 nm ($A = 19 a$), 272 nm. El espectro de absorción al infrarrojo presenta picos principales en los números de onda 1662, 1495, 762, 1204, 1290, 1086 cm^{-1} en comprimido de bromuro de potasio. En las gráficas 8 y 9 se muestran los espectros de absorción al UV y al IR (20).



Gráfica 8. Espectro de absorción al UV de Lidocaína.



Gráfica 9. Espectro de absorción al IR de Lidocaína

Farmacología. Rápidamente absorbido desde el tracto gastrointestinal, membrana mucosa, y después de una inyección intramuscular. Concentración terapéutica en plasma de 2 a 5 mcg/mL. Vida media en plasma 1 a 2 horas. Dosis no debe exceder 300 mg (4.5 mg/Kg).

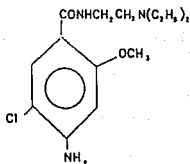
5. Metoclopramida.

Nombre propio: Metoclo; Moriperan; Peraprin.

Nombre químico: 4-Amino-5-cloro-N-(2-dietilaminoetil)-2-metoxibencenamida.

Fórmula condensada: $C_{14}H_{22}ClN_3O_2$, peso molecular 299.8.

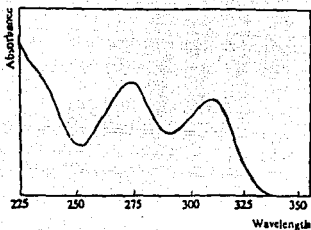
Fórmula semidesarrollada:



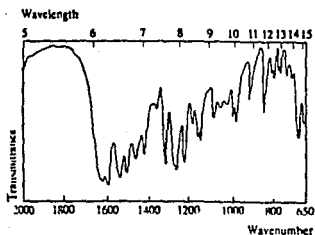
Propiedades físicas. Polvo cristalino blanco. Punto de fusión 146.5-148°C. Prácticamente insoluble en agua; soluble 1 en 45 de etanol y 1 en 15 de cloroformo.

El espectro de absorción a la radiación ultravioleta en medio ácido presenta máximos a 273 nm ($A=467$ b) y 309 nm.

El espectro de absorción al infrarrojo presenta picos principales en los números de onda 1590, 1614, 1530, 1496, 1254, 1311 cm^{-1} para Metoclopramida clorhidrato en comprimido de bromuro de potasio. En las gráficas 10 y 11 se muestran los espectros de absorción al UV y al IR (20).



Gráfica 10. Espectro de absorción al UV de Metoclopramida.



Gráfica 11. Espectro de absorción al IR de Metoclopramida.

Farmacología. Rapidamente absorbido después de una administración oral. Arriba del 60 % de una dosis oral sufre metabolismo del primer paso pero es considerable la variación intersujeto. Arriba del 80% de una dosis es excretada en la orina en 24 hrs con cerca del 10-20% de fármaco inalterado, arriba del 50% como Metoclopramida conjugada. Concentración terapéutica en plasma después de una administración oral a las 0.5 y 2.0 horas fue de 0.04 a 0.06 mcg/mL. Vida media en

plasma de 3 a 6 horas. Volumen de distribución cerca de 3 L/Kg pero hay una variación considerable intersujeto.

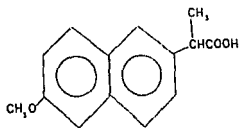
6. Naproxen.

Nombres propios: Equiproxen; Floginax; Proxen; Xenar.

Nombre químico: 2-(6-Metoxi-2-naftil)propionico ácido.

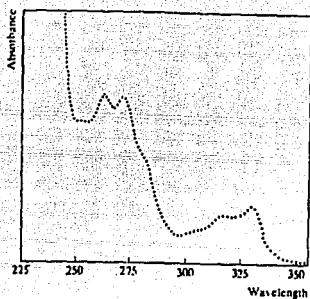
Fórmula condensada: $C_{14}H_{14}O_3$, peso molecular 230.3

Fórmula semidesarrollada:

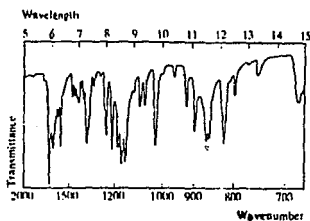


Propiedades físicas: Polvo cristalino blanco. Punto de fusión 152-154°C. Prácticamente insoluble en agua; soluble 1 en 25 de etanol, 1 en 15 de cloroformo, y 1 en 40 de éter.

El espectro de absorción a la radiación ultravioleta en medio ácido presenta máximos a 262 nm ($A = 208b$), 272 nm ($A = 215 b$), 315 nm ($A = 52 b$), 328 nm ($A = 63 b$); en medio alcalino presenta máximos a 261 nm ($A = 218 b$), 271 nm ($A = 218 b$), 316 nm, 330 nm. El espectro de absorción al infrarrojo tiene picos principales en los números de onda de 1724, 1174, 1155, 1223, 1190, 1681 cm^{-1} en comprimido de bromuro de potasio. En las gráficas 12 y 13 se muestran los espectros de absorción al UV y al IR (20).



Gráfica 12. Espectro de absorción al UV de Naproxen.



Gráfica 13. Espectro de absorción al IR de Naproxen.

Farmacología. Rápido y casi completamente absorbido después de una administración oral o rectal. Cerca del 50% de una dosis es excretada en la orina en 24 horas y cerca del 94% en 5 días conjuntamente con cerca de 1 a 2% en heces. Del material excretado en orina, aproximadamente 60% es naproxen conjugado, 5% es

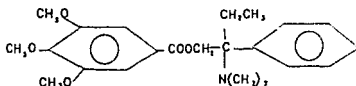
6-O-desmetilnaproxen, y 20% es desmetilnaproxen conjugado. Menos del 10% del material excretado es fármaco inalterado. Dosis 500 mg dos veces al día. Vida media en plasma de 10 a 20 horas.

7. Trimebutina base.

Nombre químico: 3,4,5-trimetoxibenzoico ácido 2-(dimetilamino)-2-fenilbutil ester.

Fórmula condensada: $C_{22}H_{29}NO_5$, peso molecular 387.48

Fórmula semidesarrollada:



Propiedades físicas. Cristales desde etanol, punto de fusión 78-80°C, soluble en cloruro de metileno (21).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El proceso de obtención de las microesferas, desarrollado previamente por CAFET.SA., es de hecho una tecnología con múltiples aplicaciones, sin embargo; el buscar nuevas alternativas tales como otras sustancias medicamentosas susceptibles de emplearse en el proceso mencionado, requiere de un análisis de las características del proceso y de las sustancias que deseen emplearse. Como ya se ha mencionado; el proceso requiere del calentamiento de la sustancia por encima de su punto de fusión y de un enfriamiento posterior lo suficientemente rápido para endurecer las partículas formadas con la masa fundida antes de que éstas sean deformadas nuevamente, de hecho esta había sido la limitante principal con la que se encontraron otros investigadores en el pasado (6).

Con objeto de seleccionar las sustancias, se planteó inicialmente la búsqueda de aquellas que al menos cumplieran con los siguientes requisitos:

1. Punto de fusión entre 40 y 220°C.
2. No sufrir descomposición durante la fusión y durante el tiempo necesario en que permanece fundida la sustancia para su procesamiento.
3. Tener baja solubilidad en agua.
4. Que la masa fundida endurezca de manera apropiada cuando es enfriada por debajo del punto de fusión.

Además, se puede considerar la posibilidad de combinar algunas de estas sustancias con otras que favorezcan el proceso de manufactura de las microesferas, o bien que puedan modificar potencialmente las características de liberación del fármaco.

Por último, tomando como base la experiencia ya existente con la manufactura de microesferas de colesterol y esteroides (Progesterona y Estradiol), será necesario realizar un trabajo exploratorio experimental en el que se intentarán preestablecer las posibles condiciones preliminares de operación del equipo de rocío-congelación para la obtención de las microesferas cuando ésto sea factible o conveniente, así como la evaluación, también preliminar, de las características de las microesferas obtenidas.

III. OBJETIVO

Evaluar un conjunto de sustancias (Diazepam, Ibuprofen, Indometacina, Lidocaína, Metoclopramida, Naproxen, y Trimebutina), de manera exploratoria considerando adecuadas aquellas que sean estables térmicamente y después de fundir solidifiquen rápidamente, para establecer su posible aplicación al proceso de obtención de microesferas por el método de rocío-congelación con el fin de utilizarlas como un sistema de liberación controlada.

IV. HIPOTESIS

Sabemos que las sustancias a ser empleadas en el proceso de rocío-congelación deben ser térmicamente estables y solidificar adecuadamente por lo que si las sustancias a estudiar cumplen con los siguientes requisitos: Tener un comportamiento térmico estable, una velocidad de endurecimiento rápida y consistencia sólida al ser enfriados, es posible evaluar la factibilidad técnica y su aplicación en el proceso de rocío-congelación para obtener microesferas con posibilidad de utilizarse como formas de liberación controlada.

V. MATERIAL

- Vasos de precipitados de 10, 30, 250 mL.
- Termómetro -10 a 400°.
- Cajas Petri.
- Crisoles y tapas de aluminio para sellar marca Shimadzu, modelo P/N 201-53090.
- Tubos de ensayo 16X150.
- Gradilla.
- Pinza para crisoles de aluminio.
- Charola de acero inoxidable 20X36 cm.
- Pipetas Pasteur.
- Fascos de polietileno con tapa de 30 mL.
- Prefiltros de fibra de vidrio de 0.22 micras, marca Sartorius.
- Portafiltros marca Millipore, modelo Swinnex-25.
- Difusor de fibra acrílica.
- Tubo de neopreno C-flex No. 14, marca Cole-Parmer.
- Matraz bola de 6 Lts.
- Pipeta volumétrica de 5, 3 mL
- Matraz volumétrico 10, 50 y 100 mL.
- Barra magnética de 1 y 2 pulgadas.
- Portaobjetos.
- Jeringas de plástico de 10 mL.
- Probeta graduada 1000 mL.

VI. EQUIPO

- Parrilla calentamiento marca Thermolyne modelo Nuova II
- Balanza analítica marca Mettler modelo AE260 Delta Range.
- Balanza granataria marca Ohaus modelo Cent-o-Gram de 311g.
- Prensa con matriz y punzón para sellar crisoles de aluminio marca Shimadzu.
- Calorímetro diferencial de barrido marca Shimadzu modelo DSC-50.
- Procesador de datos marca Shimadzu modelo C-R4A Chromatopac.
- Equipo de rocío-congelación prototipo II para producción de microesferas.
- Prensa con matriz y punzón marca Osyma para elaborar tabletas en el estudio de infrarrojos.
- Espectrofotómetro de absorción al infrarrojo marca Beckman modelo AccuLab 10.
- Disolutor marca Elecsa modelo DIE 25-250.
- Bomba peristáltica marca Cole-Parmer modelo Masterflex No. 7524-00.
- Espectrofotómetro de absorción ultravioleta-visible marca Beckman modelo DU-37.
- Baño de ultrasonido marca Branson.
- Mixer 37600 marca Termolyne, modelo M37615.
- Microscopio compuesto marca Leitz modelo Laborlux K con cámara integrada.

VII. METODOLOGIA

El desarrollo del trabajo se realizó en las siguientes etapas:

1. Búsqueda bibliográfica de las sustancias candidato y primera selección.
2. Observación del comportamiento de la sustancia fundida al enfriarse, evaluación de mezclas con Colesterol y discriminación.
3. Evaluación del punto de fusión y de las posibilidades de descomposición de las sustancias seleccionadas durante la etapa 2.
4. Nueva selección de las sustancias o mezclas, de acuerdo con los resultados de los experimentos anteriores y propuesta de posibles condiciones de calentamiento para la elaboración de microesferas.
5. Elaboración de microesferas.
6. Evaluación de la integridad química de las microesferas obtenidas.
7. Evaluación preliminar "in vitro" e "in vivo" de las microesferas obtenidas.

A continuación se describe en forma resumida la manera en que se llevaron a cabo las actividades en cada etapa:

1. Búsqueda bibliográfica de las sustancias candidato y primera selección.

Por razones prácticas; se partió de aquellas sustancias disponibles en almacén. Los primeros aspectos revisados fueron: Punto de fusión, estabilidad térmica solubilidad en agua y la manifestación de formas polimórficas. A partir de esta información se seleccionaron aquellas con puntos de fusión entre 40 y 240°C en las que no se reportara descomposición y con solubilidad en agua menor o igual a 0.1 mg/mL.

Las sustancias elegidas bajo estos criterios fueron: Diazepam, Ibuprofén, Indometacina, Lidocaína base, Metoclopramida, Naproxén, y Trimebutina. En la tabla 1 página 59 se presentan los datos obtenidos en esta primera selección.

2. Observación del comportamiento de la sustancia fundida al enfriarse, evaluación de mezclas con Colesterol y discriminación. En esta etapa se buscó encontrar un método rápido y práctico que permitiera predecir la factibilidad de procesar las sustancias previamente seleccionadas, por el método de rocío-congelación. Para esto se plantearon las siguientes posibilidades:

- a. **Observación del comportamiento de endurecimiento con dos diferentes velocidades de enfriamiento.**
- b. **En algunas sustancias, el efecto de mezclarla con otra sustancia con buenas características para la fabricación de microesferas.**

El cambio en la velocidad de enfriamiento se realizó permitiendo a las sustancias estudiadas enfriarse a temperatura ambiente (velocidad lenta) y enfriando con ayuda de dióxido de carbono sólido (velocidad rápida), mientras que las mezclas se realizaron con Colesterol para aquellas sustancias con características de sólido blando o con largos tiempos de endurecimiento, aprovechando la experiencia que se había obtenido al desarrollar el proceso de rocío-congelación ⁽⁶⁾, pues fue precisamente esta materia a la que se empleó como modelo experimental. La forma de evaluar el comportamiento de los materiales de estudio fue únicamente cualitativa ya que al tratarse de un ejercicio de exploración, no se tenía un conocimiento preciso de las características a medir por lo que no se justificó pretender cuantificar dichas variables. El procedimiento fue el siguiente:

Para la observación del comportamiento de endurecimiento con dos diferentes velocidades de enfriamiento:

- En un vaso de precipitados de 10 mL., colocar aproximadamente un gramo de la sustancia por evaluar.
- Calentar, con agitación continua sobre una parrilla de calentamiento hasta fusión total, cuidando con la ayuda de un termómetro no exceder en 5°C la temperatura de fusión, -para evitar sobrecalentamientos que puedan alterar la sustancia-.
- Retirar el vaso de la parrilla y dejarlo enfriar a temperatura ambiente o sobre un lecho de dióxido de carbono sólido triturado.
- Observar a intervalos de un minuto los siguientes aspectos: **a. Desplazamiento visual** (líquido poco viscoso), **b. Penetración de un cuerpo punzocortante** (líquido viscoso), **c. Impresión de huellas** (líquido muy viscoso o sólido blando) y **d. Fractura** (producto sólido), de la siguiente manera:
 - a. Mientras se enfría la sustancia, una vez fundida, ladear el vaso de precipitados aproximadamente 45° y observar si la sustancia se desplaza sobre las paredes del vaso o bien si sufre deformaciones, anotar el tiempo en el que ya no se presenta el fenómeno.
 - b. Mientras continúa el enfriamiento de la sustancia en estudio y cuando ésta ya no presenta el fenómeno descrito en el inciso "a", introducir el objeto punzocortante esquematizado en la figura 4 página 47, ejerciendo presión con la mano hasta que penetre en la masa y tope con el fondo del vaso; tomar nota del tiempo en el cual la huella dejada en la masa en enfriamiento por el objeto, no tiende a cerrarse o bien la masa se fractura al intentar introducir el objeto punzocortante.

La interpretación de esta prueba se establece de la siguiente manera:

Si el cuerpo penetra la masa y al retirarlo la huella se cierra, la masa permanece fundida y es muy probable que sea adhesiva por lo que no es apropiada para el proceso de rocío congelación, si al retirarlo la huella permanece, la masa esta en proceso de endurecimiento y es deformable, por lo cual posiblemente sea aplicable pero con dificultades, si la masa se fractura el producto tiene buenas características para este proceso.

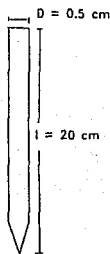


Figura 4. Objeto empleado para la prueba de penetración de un cuerpo punzo cortante.

cy d. Efecto de la presión con una superficie plana: Una vez que la masa fundida alcance la temperatura ambiente, hacer presión manual con ayuda de una barra de acero inoxidable de 4 mm de diámetro y 10 cm de longitud sobre la superficie de la substancia, ver figura 5 en la página 48, observar si queda huella o si ésta se fractura.

Esta prueba se puede interpretar de la siguiente manera: Si el cuerpo deja una huella clara, la masa es deformable pero no está totalmente endurecida o cristalizada y aunque se puede intentar para el proceso, se esperan algunos problemas durante la manufactura como la adhesión a las paredes de la cámara de enfriamiento del equipo o adhesión partícula. Si la masa se fractura y la huella es

apenas perceptible la masa está solidificada o cristalizada y por lo tanto es apropiada para el proceso.

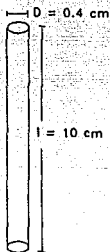


Figura 5. Aditamento empleado para la prueba de introducción de un cuerpo plano.

Los resultados obtenidos se muestran en la página 60 tabla número 2 y 3.

Evaluación de mezclas con colesterol. Para las sustancias evaluadas en la prueba de endurecimiento que presenten características de líquido muy viscoso o sólido blando, como en el caso de la Trimebutina base, se consideró el mezclarlas con Colesterol, a una proporción tal que favorezca la formación de un punto eutéctico, cuando sea posible, para tener solo un punto de fusión y una mezcla homogénea y evaluar las mismas características en la forma descrita en la prueba de endurecimiento.

Los resultados obtenidos se encuentran en la página 61 tabla 5 y 6.

3. Evaluación del punto de fusión y de las posibilidades de descomposición de las sustancias seleccionadas durante la etapa 2. A las sustancias seleccionadas en pruebas precedentes, las cuales presentan tiempos cortos de endurecimiento, y

consistencia de sólido; se les evaluó en esta etapa su punto de fusión, su estabilidad térmica, y la posibilidad de encontrar diferentes formas polimórficas, así como para establecer condiciones preliminares de calentamiento durante el proceso de fabricación de microesferas. El procedimiento consistió en lo siguiente:

- Pesar de 2 a 3 mg de la muestra y material de referencia (alúmina), en forma individual, en crisoles de aluminio para sellar, colocarles la tapa respectiva y con ayuda de la prensa proceder a sellarlos. Colocar los crisoles conteniendo la muestra y referencia en los platillos del horno en el calorímetro y bajo las siguientes condiciones realizar el análisis: suministro de nitrógeno 30 mL/min, tiempo de adquisición de datos cada segundo, velocidad de calentamiento 10°C/min, y un intervalo de flujo de calor de 20 mW. Una vez finalizado determinar el punto y calor de fusión. Realizar el procedimiento descrito anteriormente para cada sustancia.

Los termogramas obtenidos se muestran en el apéndice 1 y en forma resumida los resultados de punto y calor de fusión en la página 62 tabla 7.

4. Nueva selección de las sustancias o mezclas de acuerdo con los resultados de los experimentos anteriores y propuestas de posibles condiciones de calentamiento para la elaboración de microesferas. En esta etapa se pretende seleccionar a las sustancias a ser ensayadas en el proceso de rocío-congelación. La selección se basó en aquellas sustancias con tiempos cortos de solidificación, consistencia de sólido, y con un comportamiento térmico bien definido, sin presencia de descomposición.

Los resultados se muestran en la página 63 tablas 8 y 9.

5. Elaboración de microesferas. Con las sustancias que presentaron rápida velocidad de endurecimiento, consistencia de sólido, y que no sufrieron alteraciones durante la evaluación térmica (Diazepam: Colesterol 1:2, Ibuprofen, Ibuprofen: Colesterol 3:7, Indometacina, Lidocaina base, Lidocaina base: Colesterol 7:3, Naproxen) se procedió a ensayar la fabricación de microesferas por el método de rocío-congelación con el fin de verificar si el proceso de selección de sustancias establecido en este trabajo es apropiado para la obtención de microesferas y poder así establecer el proceso de selección para nuevas sustancias con las cuales se pretende obtener microesferas.

El procedimiento empleado consta de los siguientes pasos:

- Lavado y ensamblado del equipo de rocío-congelación prototipo II para obtención de microesferas.
- Fusión de la muestra, - aproximadamente 25 gramos.
- Suministro de aire frío.
- Sistema de extracción.
- Formación del rocío.
- Recolección y observación microscópica de la muestra.

Las condiciones de proceso empleadas para cada sustancia se muestran en la página 64 tabla 11.

Las observaciones realizadas durante el proceso de fabricación para cada sustancia se muestran en la página 65 tabla 12.

Se recolectó el producto y se realizaron observaciones microscópicas para verificar la formación de microesferas.

Se obtuvieron microesferas de las siguientes sustancias mezcla Diazepam: Colesterol 1:2, Naproxen, y de Indometacina las cuales se pueden observar en las páginas 66 y 67 figuras 7, 8, y 9 respectivamente.

6. Evaluación de la Integridad química de las microesferas obtenidas. Para comprobar que las sustancias con las cuales se obtuvieron microesferas no sufrieron ninguna alteración química durante el proceso de fabricación se realizó un análisis calorimétrico y un espectro de absorción a la radiación infrarroja de las microesferas obtenidas y las materias primas correspondientes.

El espectro de absorción a la radiación infrarroja se realizó de la siguiente manera:

- Pesar 1.5 mg de la sustancia a evaluar y 300 mg de bromuro de potasio, previamente desecado.
- Moler y homogeneizar hasta polvo fino.
- Obtener un comprimido con la muestra.
- Realizar el barrido.

El análisis calorimétrico se realizó en la misma forma que la etapa 3.

Los espectros de absorción al infrarrojo se muestran en el apéndice 2 y en la página 66 tabla 13 se muestran en forma resumida los resultados de dichos espectros. Los termogramas obtenidos se muestran en el apéndice 1 y los resultados de temperatura y calor de fusión en la página 62 tabla 7.

7. Evaluación preliminar "in vitro" e "in vivo" de las microesferas obtenidas.

7. A. Pruebas de perfil de disolución. Las microesferas obtenidas de Diazepam: Colesterol 1:2, Indometacina, y Naproxen se evaluaron paralelamente con

las materias primas correspondientes para comparar su comportamiento en disolución, a través de un sistema de disolución de celda con flujo continuo. Se utilizó como medio de disolución una solución de polisorbato 80 al 0.01% en agua para permitir la humectación de las partículas y favorecer así la disolución, ya que de otra manera los tiempos de disolución serían demasiado largos.

Se utilizó el mismo medio de disolución para las tres sustancias a evaluar pues tienen características de solubilidad similares. La preparación del medio de disolución se realizó de la siguiente manera: Se prepararon 7 litros de una solución de polisorbato 80 al 0.01 % en agua desionizada y se desgasificó a vacío.

La preparación de la muestra consistió en lo siguiente: Separar por medio de un tamizado tanto microesferas como materia prima para tener un intervalo de tamaño definido y una vez hecha la separación colocar en la base de la celda un prefiltro de celulosa y en éste 25 mg de la muestra, luego colocar otro prefiltro sobre la muestra, el empaque del portafiltro, un difusor de fibra acrílica y finalmente la tapa de la celda. En la página 53 figura 6 se muestra el esquema de la celda empleada en la prueba de disolución. Realizar lo mismo con cinco portafiltros más, tres con microesferas y tres con materia prima de la misma sustancia y con el mismo intervalo de tamaño de partícula. Realizar lo anterior para cada una de las sustancias a ensayar.

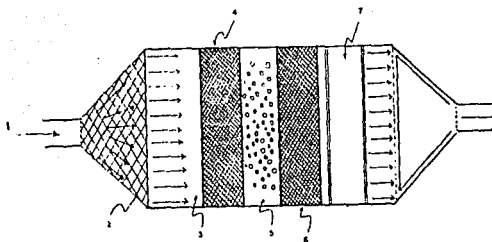


Figura 6. Celda empleada en la prueba de disolución. Se observa lo siguiente: 1-Entrada del medio de disolución, 2-difusor del medio de disolución, 3-distribución uniforme del medio de disolución, 4-primer membrana de soporte, 5-muestra a analizar, 6-segunda membrana de soporte, 7-membrana de filtración, y 8-salida de medio de disolución.

Inmediatamente después ensamblar el equipo de disolución y colocar 900 mL de medio de disolución en cada vaso, ajustar la velocidad de flujo, la velocidad de agitación y la temperatura del medio de disolución. Bajo las condiciones adecuadas de velocidad de flujo, velocidad de agitación, y temperatura iniciar la prueba.

A continuación se describen las condiciones empleadas para las tres sustancias ensayadas Diazepam: Colesterol 1:2, Indometacina, y Naproxen:

- Peso de la muestra 25 mg.
- Intervalo de tamaño de la muestra 44-74 micras, menores de 44 micras para el naproxen.
- Velocidad de flujo 16 mL/min +/- 5 %.
- Velocidad de agitación 50 rpm.
- Temperatura 37° +/- 0.5° .
- Tiempos de muestreo:

0,1,2,4, y 8 horas para mezcla Diazepam: Colesterol 1:2.

0,1,2,4,6,8,10,12, y 24 horas para la Indometacina.

0,1,2,4,6,8,11,12, y 24 horas para el Naproxen.

Los resultados obtenidos se muestran en la páginas 68 a 70 gráficas 17 a 19 donde se comparan los perfiles de disolución de las microesferas y las materias primas correspondientes.

La utilidad de esta prueba es la de permitirnos detectar posibles diferencias en el comportamiento en disolución de las microesferas con respecto a la materia prima.

7. B. Pruebas de biodisponibilidad. La prueba se realizó en conejos y el procedimiento empleado para el seguimiento de los niveles plasmáticos de los principios activos, en forma de microesferas y materia prima respectivamente, contenidos en suspensión se describe a continuación:

Se utilizaron cuatro conejos, dos para administrar la suspensión conteniendo microesferas y dos para administrar la suspensión conteniendo la materia prima, como referencia, se pesaron los conejos y se administró la dosis requerida de cada principio activo por vía intramuscular. Las muestras se obtuvieron por punción cardiaca, 3 mL en cada muestra, y se colocó en tubos vacutainer conteniendo heparina como anticoagulante, se dejó reposar media hora y luego se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos, se separó el plasma (aproximadamente 1.5 mL) y se colocó en cryotubos y se congeló hasta el día de la cuantificación.

El método analítico empleado para la cuantificación fue por cromatografía de líquidos de alta resolución y consistió en lo siguiente: Del plasma se tomó una alícuota de 0.5 mL, se transfirió a un tubo de ensayo y se le adicionó 0.5 mL de una solución de ácido perclórico al 10 %. Se agitó por 10 segundos en agitador tipo

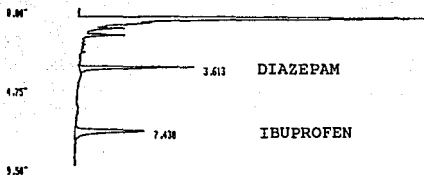
vortex, se adicionó 0.5 mL de una solución de fosfato de potasio 1 M pH 3.5 y se agitó 10 segundos en el vortex. Se adicionó 25 mL de la solución del estándar interno. Se agregó 2.5 mL de cloroformo, se agitó 1 min en vortex, se adicionó 2.5 mL de cloroformo y se agitó 10 seg en vortex, se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min. Se eliminó la fase superior acuosa por succión, se filtro la fase inferior orgánica a través de un embudo con algodón, previamente lavado con 2 mL de cloroformo y se recolectó el filtrado en tubos de ensayo. Se evaporó el cloroformo a sequedad en baño María a $40^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ con ayuda de nitrógeno. Se reconstituyó con 500 mL de fase móvil, se agitó por 2 min en vortex y se inyectó 15 mL al sistema cromatográfico, los cálculos se hicieron por alturas.

Las condiciones empleadas para cada sustancia se describen a continuación:

Para el Diazepam: Colesterol 1:2.

- Número de conejos empleados cuatro.
- Dosis 10 mg/mL/Kg.
- Tiempos de muestreo 0,0.5,1.0,1.5,2,3,4,5,6,23,30, y 32 horas.
- Estándar interno Ibuprofen a 10 mcg/mL.
- Fase móvil solución reguladora de fosfatos 0.02M con pH 3.5/acetonitrilo proporción 59/41.
- Longitud de onda empleada 254 nm.
- Columna versapack C18 con tamaño de partícula de 10 micras, 15 cm de longitud y 4.1 mm de diámetro interno.
- Flujo de 1.5 mL/min.

En la gráfica 14 se muestra el cromatograma obtenido de una muestra estándar, donde se aprecia la separación de los picos correspondientes al Diazepam y al Ibuprofen.

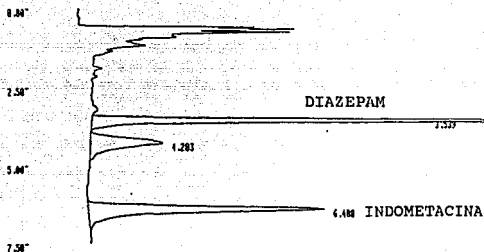


Gráfica 14. Cromatograma de una muestra estándar donde se aprecian los picos correspondientes al Diazepam y al Ibuprofen.

Para la Indometacina:

- Número de conejos empleados cuatro.
- Dosis 100 mg/mL/Kg.
- Tiempos de muestreo 0,0.5,1,1.5,2,3,4,5, y 6 horas.
- Estándar interno Diazepam a 53.6 mcg/mL.
- Fase móvil solución reguladora de fosfatos 0.02M con pH 3.5/acetonitrilo proporción 59/41.
- Longitud de onda empleada 220 nm.
- Columna versapack C18 con tamaño de partícula de 10 micras, 15 cm de longitud y 4.1 mm de diámetro interno.
- Flujo de 1.5 mL/min.

En la gráfica 15 se muestra el cromatograma de una muestra estándar donde se aprecia la separación de los picos correspondientes a la Indometacina y Diazepam.

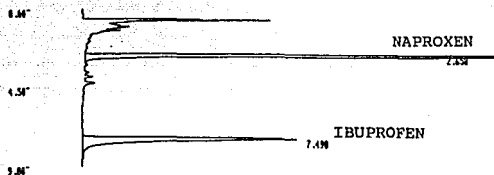


Gráfica 15. Cromatograma obtenido de una muestra estándar donde se aprecian los picos correspondientes a la Indometacina y al Diazepam.

Para el Naproxen:

- Número de conejos empleados cuatro.
- Dosis 200 mg/2 mL/Kg.
- Tiempos de muestreo 0,0.5,1,1.5,2,3,4,5,6 y 7 horas.
- Estándar interno Ibuprofen a 10 mcg/mL.
- Fase móvil solución reguladora de fosfatos 0.02 M con pH 3.5/acetonitrilo proporción 59/41.
- Longitud de onda empleada 220 nm.
- Columna versapack C18 con tamaño de partícula de 10 micras, 15 cm de longitud y 4.1 mm de diámetro interno.
- Flujo de 1.5 mL/min.

En la gráfica 16 se muestra un cromatograma de una muestra estándar donde se aprecia la separación de los picos correspondientes al Naproxen y al Ibuprofen.



Gráfica 16. Cromatograma de una muestra estándar donde se aprecian los picos correspondientes al Naproxen y Ibuprofen.

Los resultados obtenidos se muestran en las páginas 71 a 73 gráficas 20 a 22.

La utilidad de esta prueba es la de evaluar la sustancia en estudio como posible candidato para emplearla en un sistema de liberación controlada.

VIII. RESULTADOS

Resultados obtenidos de la preselección de sustancias, de la evaluación de la velocidad de endurecimiento, y consistencia.

Tabla 1. Sustancias seleccionadas bibliográficamente en base a su punto de fusión, solubilidad, y presencia de polimorfos.

Substancia	Pto. fusión* (°C)	Solubilidad* (mg/L)	Polimorfos *
Diazepam	131-135	100	No
Ibuprofen	75-78	menos de 100	No
Indometacina	158-162 I=155 II=162	menos de 100	I y II
Lidocaina base	66-69	menos de 100	No
Metoclopramida	146.5-148	menos de 100	No
Naproxen	152-154	menos de 100	No
Trimebutina	78-80	menos de 100	No

Nota el asterisco "*" significa que: Todos los valores fueron obtenidos de los datos bibliográficos de cada principio activo, los cuales estan asentados en la monografía respectiva.

Tabla 4. Observaciones de las muestras fundidas.

Substancia	Observaciones
Diazepam	Líquido transparente.
Ibuprofen	Líquido transparente.
Indometacina	Líquido amarillento.
Lidocaina base	Líquido transparente.
Metoclopramida	Líquido transparente, ebullición y desprendimiento de gases el líquido se torna amarillento.
Naproxen	Líquido amarillento.
Trimebutina base	Líquido transparente.

Tabla 5. Comportamiento de endurecimiento de las mezclas Substancia-Colesterol, con una velocidad de enfriamiento lenta.

Substancia	Tiempo (minutos)									
	0	1	2	3	4	5	6	10	20	30
TMB:COL 1:1*	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LV	LV	LV	SB
DIP:COL 1:2**	LP	LV	S							

Tabla 6. Comportamiento de endurecimiento de las mezclas Substancia-Colesterol, con una velocidad de enfriamiento rápida.

Substancia	Tiempo (minutos)									
	0	1	2	3	4	5	6	10	20	30
TMB:COL 1:1	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LV	LV	LV	SB
DIP:COL 1:2	LP	LV	S							

*Nota. Las iniciales significan lo siguiente:

TMB:COL 1:1 = Trimebutina base:Colesterol 1:1.

DIP:COL 1:2 = Diazepam:Colesterol 1:2.

**El Diazepam no se ensayó en forma pura para la fabricación de microesferas por limitaciones de disponibilidad de la materia prima por lo que se hizo una mezcla con Colesterol, conservando aún buenas características.

En la siguiente tabla se muestra en forma resumida los resultados de temperatura y calor de fusión obtenidos de los termogramas de las sustancias con posibilidad de obtener microesferas y de las sustancias con las cuales se obtuvieron microesferas.

Tabla 7. Resultados de temperatura y calor de fusión de las diferentes sustancias evaluadas y de las microesferas obtenidas.

Substancia	Tem.fusión (°C)	Calor fusión (J/g)
Colesterol	148.0	-27.52
Diazepam	131.3	-76.63
DIP:COL 1:2 mat.prima	123.5	-72.94
DIP:COL 1:2 microesferas	117.5 y 128.4	-39.20
Ibuprofen	74.3	-98.68
IBF:COL 3:7	73.1 y 120	-77.34
Indometacina	159.4	-81.17
Indometacina microesferas	153 y 159.2	-46.82
Lidocaina base	66.8	-69.46
LB:COL 7:3	63.2	-47.46
Metoclopramida	152.2	-21.03
Naproxen	156.6	-114.74
Naproxen microesferas	155.3	-116.30
Trimebutina base	80.4	-80.41

En el apéndice 1 se muestran los termogramas de los cuales se obtuvieron estos resultados.

Tabla 8. Substancias seleccionadas para ser utilizadas en el proceso de rocío-congelación.

Substancia
Mezcla Diazepam:colesterol 1:2.
Ibuprofen.
Indometacina.
Lidocaina base.
Naproxen.

Tabla 9. Condiciones de calentamiento tentativas para las substancias a ser ensayadas en el proceso de rocío-congelación.

Substancia	Temperatura de calentamiento (°C)
DIP:COL 1:2	160
Ibuprofen	90
Indometacina	175
Lidocaina base	85
Naproxen	170

Tabla 10. Substancias con buenas características pero con las cuales no se obtuvieron microsferas, se mezclaron con Colesterol y se evaluó el comportamiento de endurecimiento con una velocidad de enfriamiento rápida.

Substancia	Tiempo (minutos)									
	0	1	2	3	4	5	6	10	20	30
LB:COL 7:3	LP	LV	S							
IBF:COL 3:7	LP	LP	LP	LV	S					

Nota. Las iniciales significan lo siguiente:

LB:COL 7:3 = Lidocaína base: Colesterol 7:3.

IBF:COL 3:7 = Ibuprofen: Colesterol 3:7

Tabla 11. Condiciones de proceso de rocío-congelación empleadas en las diferentes sustancias ensayadas.

SUBSTANCIA	TFS (° C)	TSC (° C)	PR (Kg/cm ²)	PAF (Kg/cm ²)
Lidocaína base	105-110	145-160	0.15	4.0-5.0
LB:COL 70:30	102-105	135-161	0.15	4.0-5.0
DIA:COL 1:2	138-155	144-175	0.12	3.0
Ibuprofen	80-100	80-100	0.50	3.0
IBU:COL 30:70	135-150	155-165	0.20	3.0
Naproxen	158-165	175-178	0.15	3.0
Indometacina	164-167	170-177	0.12	3.0

Nota las iniciales significan lo siguiente:

LB:COL 70:30 = Mezcla Lidocaína base: Colesterol 70:30.

DIA:COL 1:2 = Mezcla Diazepam: Colesterol 1:2.

IBU:COL 30:70 = Mezcla Ibuprofen: Colesterol 30:70.

TFS = Temperatura de fusión de la sustancia en el sistema.

TSC = Temperatura en el sistema de calentamiento.

PR = Presión de rocío.

PAF = Presión de aire frío.

Tabla 12. Observaciones realizadas durante el proceso de rocío congelación de las diferentes sustancias ensayadas.

Substancia	Observaciones
Lidocaína	Se alcanzaron las condiciones de rocío pero no se obtuvieron microesferas, el producto quedo adherido al tubo enfriador.
LB:COL 70:30	Se alcanzaron condiciones de rocío pero no se obtuvieron microesferas, el producto quedo adherido al tubo enfriador.
DIA:COL 1:2	Se alcanzaron condiciones de rocío y se obtuvieron microesferas, en la figura 7 se pueden observar.
Ibuprofen	Se alcanzaron condiciones de rocío pero no se obtuvieron microesferas, el producto quedo adherido al tubo enfriador.
Naproxen	Se alcanzaron condiciones de rocío y se obtuvieron microesferas, en la figura 8 se muestran éstas.
Indometacina	Se alcanzaron condiciones de rocío y se obtuvieron microesferas, en la figura 9 se muestran éstas.
IBU:COL 30:70	Se alcanzaron condiciones de rocío pero no se obtuvieron microesferas, el producto quedo adherido al tubo enfriador y la boquilla.

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos de los espectros de absorción al IR los cuales se utilizaron como una prueba de identificación a través de la cual se determinó que no hay alteración química de las sustancias procesadas y con las cuales se obtuvieron microesferas por el método de rocío-congelación.

Tabla 13. Resultados de los espectros de absorción al IR de las sustancias con las cuales se obtuvieron microesferas y de las materias primas correspondientes.

Substancia	Resultado
Colesterol materia prima	Conforme
Diazepam materia prima	Conforme
DIA:COL 1:2 materia prima	Conforme
DIA:COL 1:2 microesferas	Conforme
Indometacina materia prima	Conforme
Indometacina microesferas	Conforme
Naproxen materia prima	Conforme
Naproxen microesferas	Conforme

Nota. Las iniciales significan lo siguiente:

DIA:COL 1:2= Mezcla Diazepam:Colesterol 1:2

En el apéndice 2 se muestran los espectros de absorción al IR correspondientes.

En las siguientes figuras se muestran las microesferas obtenidas de la mezcla Diazepam:Colesterol 1:2, Naproxen, e Indometacina.



Figura 7. Microesferas de la mezcla Diazepam:Colesterol 1:2. Objetivo 10X.

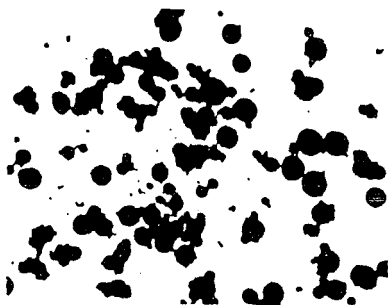


Figura 8. Microesferas de Naproxen. Objetivo 10 X.

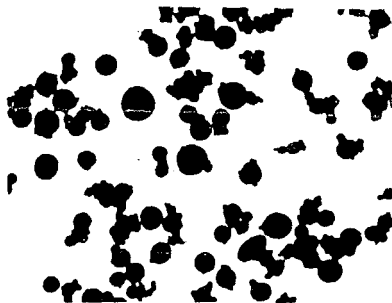
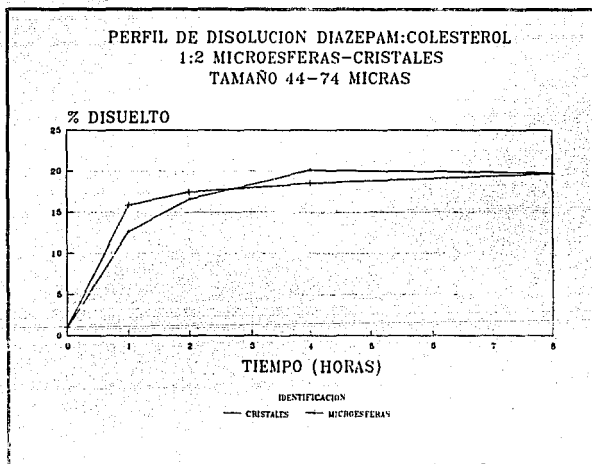


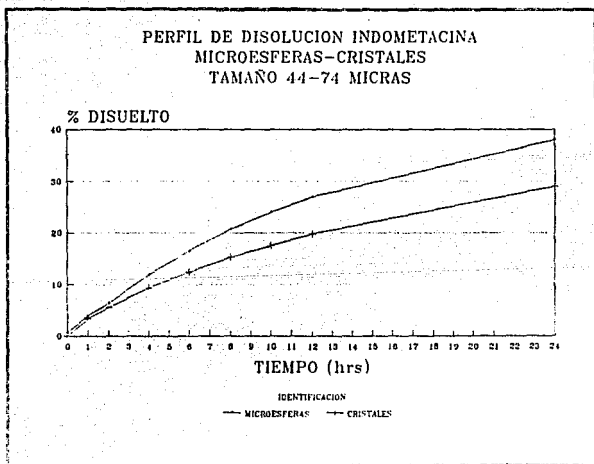
Figura 9. Microesferas de Indometacina. Objetivo 10 X.

Con las microesferas que se obtuvieron se procedió a realizar pruebas comparativas del perfil de disolución entre las microesferas y las materias primas

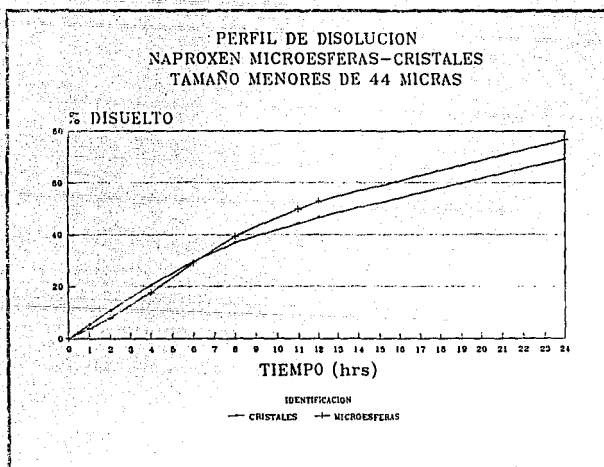
correspondientes para observar posibles diferencias en cuanto a su comportamiento en disolución. En las siguientes gráficas se muestran los resultados obtenidos:



Gráfica 17. Perfil de disolución Diazepam:Coolesterol 1:2 microsferas-cristales, tamaño 44-74 micras.

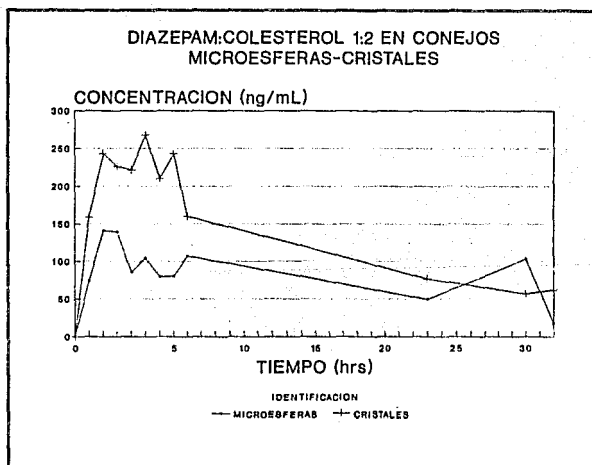


Gráfica 18. Perfil de disolución Indometacina microesferas-cristales tamaño, 44-74 micras.

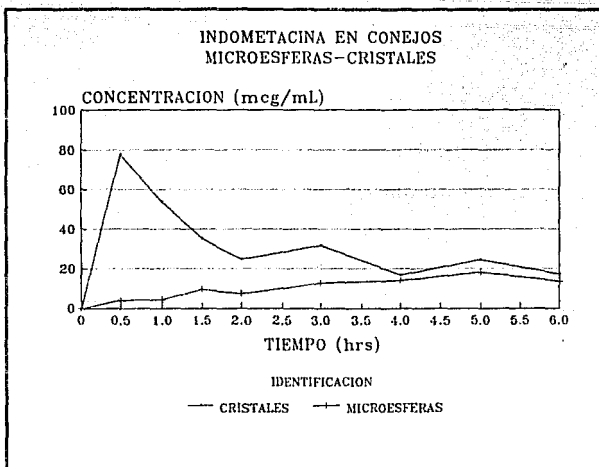


Gráfica 19. Perfil de disolución Naproxen microesferas-cristales, tamaño menores de 44 micras.

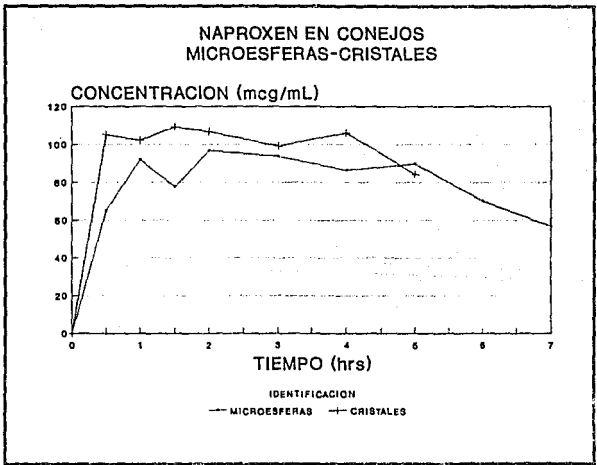
Para evaluar y comparar el efecto de disolución "in vivo - in vitro" se realizó un estudio preclínico en conejos, los resultados que se obtuvieron se muestran a continuación.



Gráfica 20. Concentraciones de Diazepam en plasma de conejo.



Gráfica 21. Concentraciones de Indometacina en plasma de conejo.



Gráfica 22. Concentraciones de Naproxen en plasma de conejo.

IX. ANALISIS DE RESULTADOS

Las sustancias seleccionadas en base a su solubilidad y temperatura de fusión fueron: Diazepam, Ibuprofen, Indometacina, Lidocaína base, Naproxen, Trimebutina base, y Metoclopramida. Para las cuales, en la página 59, tabla 1 se especifican los datos de solubilidad y temperatura de fusión para cada sustancia.

Los resultados obtenidos del comportamiento de endurecimiento de las sustancias evaluadas con dos diferentes velocidades de enfriamiento, lenta y rápida, se muestran en la página 60 tabla 2 y 3 respectivamente, observándose que con velocidades de enfriamiento rápido se disminuye el tiempo para que la sustancia solidifique como es el caso de Diazepam, Indometacina y Lidocaína base en donde el tiempo necesario para obtener un sólido se redujo en un minuto con respecto a los obtenidos con una velocidad lenta, mientras que en el caso del Ibuprofen se redujo en forma considerable el tiempo necesario para solidificar siendo este de 5 minutos y en la velocidad de enfriamiento lenta aún a los 30 minutos permanecía en forma de líquido muy viscoso. También en estas mismas pruebas se realizaron observaciones durante el proceso de fusión encontrándose que todas las sustancias al fundir lo hacen en forma de líquido transparente con la excepción de Indometacina, Naproxen y Metoclopramida la cual además, presenta burbujeo y desprendimiento de gases irritantes, estos resultados se encuentran reportados en la página 61 tabla 4. Se prosiguió con las pruebas posteriores pues en la bibliografía no se reporta que estas sustancias sufran descomposición al fundir.

En el caso de la Trimebutina base se procedió a mezclarla con Colesterol para tratar de inducir la solidificación pero no fue posible, mientras que para el Diazepam se procedió a mezclar también con Colesterol no para tratar de inducir la solidificación si no por razones de disponibilidad de la materia prima, en la página 61

tabla 5 y 6 se muestran los resultados obtenidos al evaluar con las dos diferentes velocidades de enfriamiento.

De lo anterior se deduce que la velocidad de enfriamiento rápida favorece la solidificación de las sustancias previamente fundidas y que con excepción de la Trimebutina base, las otras sustancias tienen tiempos de endurecimiento relativamente pequeños.

El tiempo de endurecimiento es un factor importante dentro del proceso de manufactura de las microesferas por el método de rocío-congelación pues éste es un proceso dinámico relativamente rápido en el cual las gotitas formadas durante el proceso de rocío tienen que solidificar rápidamente para mantener su forma esférica, ya que de otra manera las gotitas formadas (microesferas) si tardan en solidificar viajarán en forma líquida a través del tubo enfriador y fácilmente, al chocar con otras o con las paredes de éste mismo, perderán la forma esférica y nunca se obtendrán microesferas, aunque se alcancen condiciones de rocío adecuadas. De lo anterior podemos deducir que las sustancias con posibilidad a ser evaluadas en el proceso de manufactura de las microesferas son: Diazepam:Colesterol 1:2, Indometacina, Ibuprofen, Lidocaína base, Metoclopramida y Naproxen ya que tienen tiempos pequeños de endurecimiento. Esta prueba es importante pues a partir de aquí es posible descartar las sustancias con tiempos largos de endurecimiento o que no solidifiquen.

A las sustancias con tiempos pequeños de solidificación se les realizaron los termogramas correspondientes para evaluar su comportamiento térmico. Encontrándose lo siguiente: Con excepción de la Metoclopramida se tienen endotermas bien definidas, sin presencia de descomposición aún después de fundir, por lo que, se considera que son térmicamente estables. En el caso del Naproxen se presenta un pequeño hombro al inicio de la endoterma el cual puede ser causado

por alguna impureza, un producto de síntesis. Se observa una diferencia de 2.6°C en cuanto a la temperatura de fusión lo cual probablemente se deba al método empleado para la determinación. Los resultados de temperatura y calor de fusión se encuentran reportados en la página 62 tabla 7, y los termogramas obtenidos en el apéndice 1. La Metoclopramida presenta dos endotermas una corresponde al punto de fusión reportado, pero en una cantidad mínima, y otra con un punto de fusión muy diferente pensamos que es un contaminante o un producto de degradación. Aunado a los resultados observados durante la fusión de la muestra en la prueba de endurecimiento definitivamente se descarta la posibilidad de emplearla en las pruebas de rocío-congelación para la obtención de microesferas.

Con respecto al termograma de la mezcla Diazepam: Colesterol 1:2 se observa un abatimiento en la temperatura de fusión y la formación de mezclas eutécticas.

Con las materias primas y mezclas que presentan tiempos pequeños de solidificación y un comportamiento térmico estable se procedió a realizar las pruebas de fabricación de microesferas, encontrándose que el Ibuprofen y la Lidocaína base se adhirieron a las paredes del tubo enfriador durante el proceso de rocío y no se lograron obtener microesferas, por lo que se procedió a realizar una mezcla con Colesterol y evaluar nuevamente el proceso de obtención, en la página 63 tabla 10 se muestra el comportamiento de endurecimiento de las mezclas a una velocidad de enfriamiento rápida obteniéndose la forma sólida a los 3 minutos para la mezcla Lidocaína base: Colesterol 7:3 y de 3 minutos para la mezcla Ibuprofen: Colesterol 3:7, se volvieron a ensayar en el proceso de fabricación de microesferas pero se presentó el mismo problema por lo que no fue posible la obtención de microesferas de tales sustancias. Aparentemente la temperatura del tubo enfriador esta jugando un papel importante en el proceso de solidificación de las sustancias pues aunque

ya se había determinado que estas sustancias solidificaban adecuadamente no se obtuvieron microesferas si no que, todo el producto quedó en forma de una masa chiclosa muy viscosa, por lo que resultaría interesante el evaluar la temperatura del tubo enfriador para tratar de obtener microesferas, por otra parte, también se tiene el antecedente de los tiempos de endurecimiento, cuatro y tres minutos, que presentan estas sustancias los cuales pueden ser demasiado largos para este proceso, ya que las sustancias con que se obtuvieron microesferas tienen tiempos de endurecimiento de 2 y 1 minuto, respectivamente.

Con la Indometacina, el Naproxen, y la mezcla de Diazepam: Colesterol 1:2 se lograron obtener microesferas, en las páginas 66 y 67 figuras 7 a 9 se aprecian las microesferas obtenidas, las tres sustancias tienen tiempos de endurecimiento muy similares, a saber 2, 1, y 2 min respectivamente, obtenidos de la prueba de velocidad de enfriamiento lenta. Estos resultados aparentemente sugieren que las sustancias con las cuales se pretendan obtener microesferas deben tener tiempos de endurecimiento menores o iguales a 2 minutos y tener una consistencia sólida, ya que las sustancias (Lidocaína, Ibuprofen, Lidocaína: Colesterol 7:3, Ibuprofen: Colesterol 3:7) con tiempos de solidificación mayores o iguales a 3 minutos no permitieron la obtención de microesferas aún alcanzando condiciones de rocío adecuadas.

Con respecto a los termogramas de las mezclas realizadas de Fármaco: Colesterol se observa un abatimiento en el punto de fusión y la formación de mezclas eutécticas para las mezclas de Lidocaína base: Colesterol 7:3, mientras que para la mezcla Ibuprofen: Colesterol 3:7 hay abatimiento en el punto de fusión del Ibuprofen y del Colesterol, y hay formación, aparentemente, de un punto eutéctico pero en pequeña proporción y aparece a los 40.1°C.

A las microesferas obtenidas se les realizó un análisis térmico encontrándose para la mezcla Diazepam:Colesterol 1:2 microesferas una separación de los componentes, probablemente una endoterma correspondiente a un punto eutéctico, aunque este no es muy claro pues tiene un punto de fusión diferente al obtenido en la mezcla de materias primas por lo que podría pensarse en la formación de un polimorfo o una posible degradación, y otra correspondiente al Colesterol. Para las microesferas de Naproxen no hay cambio, mientras para las microesferas de Indometacina hay presencia de dos endotermas las cuales aparentemente corresponden a polimorfos cuyos puntos de fusión son 153° y 159.2°C muy similares a los reportados para la forma I y II con puntos de fusión de 155° y 162°C respectivamente ⁽²¹⁾ y observándose también que la gran mayoría del producto paso a la forma I mientras que la materia prima presenta la forma II en un 100%, además aparece una exoterma que puede ser de cristalización, por lo que probablemente parte de la esfera pasa de un polimorfo a otro o estando en forma vítrea libera energía para pasar a una forma más estable. Los termogramas obtenidos se muestran en apéndice 1.

Los espectros de absorción al infrarrojo de la mezcla Diazepam:Colesterol 1:2 microesferas y materia prima muestran diferencias en los números de onda de 1300 a 1400 cm^{-1} y de 800 a 900 cm^{-1} aproximadamente y aunado a los resultados de calorimetría se puede considerar la formación de un polimorfo pues se tiene un punto de fusión diferente así como también un espectro al IR diferente con respecto a la mezcla de materias primas y por otra parte la posibilidad de una degradación química, aunque esta última es poco probable pues la materia prima es estable térmicamente hasta una temperatura de 160°C y, además, porque durante el análisis de cromatografía de líquidos no se observaron productos de degradación. Para los infrarrojos de Indometacina microesferas y materia prima se presenta una diferencia

en el número de onda de 1650 a 1750 cm^{-1} la cual podría deberse a la presencia de polimorfismo, lo cual es reforzado por los termogramas realizados donde se observa la presencia de dos endotermas en la muestra de microesferas y las que aparentemente corresponden a los dos polimorfos I y II reportados en la bibliografía (21), por lo que se sugiere también que para espectros de absorción al IR posteriores se utilice la técnica de dispersión en nujol para evitar que la molienda en el caso de una dispersión en bromuro de potasio pueda romper las estructuras cristalinas e impida detectar la presencia de algún polimorfo y, además, se facilite el análisis. En el caso del Naproxen materia prima y microesferas no se observan diferencias por lo que se considera que la substancia no sufrió ninguna alteración química. Aunado a que durante la cuantificación por cromatografía de líquidos no se observaron productos de degradación y en el análisis calorimétrico no se detectaron alteraciones químicas aparentes se considera que la Indometacina y el Naproxen, después del proceso de obtención de las microesferas, mantienen sin alteración su integridad química, solo la Indometacina presenta una mezcla de polimorfos y la mezcla de Diazepam: Colesterol 1:2 parece que también exhibe polimorfismo. Los espectros de absorción al IR se muestran en el apéndice 2 y los resultados en forma resumida en la página 66 tabla 13.

Con las microesferas obtenidas se realizaron pruebas de disolución "in vitro" encontrándose que no hay una diferencia real en el comportamiento en disolución, ya que hay intervalos de tiempo en el cual la materia prima tiene una disolución más lenta que las microesferas y posteriormente este efecto se invierte, este fenómeno se observó tanto para las microesferas de Diazepam: Colesterol 1:2 como para las microesferas de Naproxen. Para las microesferas de Indometacina se observa una disolución más rápida que la materia prima lo cual, puede deberse a un cambio de solubilidad debido a una transformación de un polimorfo a otro, al pasar de la

materia prima a la formación de microesferas, lo cual se aprecia en el análisis calorimétrico y en el espectro de absorción al IR. Se propone un estudio en disolución más profundo para tratar de entender los resultados obtenidos pues éstos no son lo que se esperaba teóricamente (una disolución más lenta para las microesferas y más rápida para las materias primas, por tener las microesferas una superficie expuesta menor que las materias primas), además, buscar un procedimiento o tratamiento posterior a la obtención de microesferas para garantizar la obtención de un solo polimorfo. Los resultados obtenidos se muestran en las páginas 68 a 70, gráficas 17 a 19.

Los resultados de las pruebas de biodisponibilidad en conejos muestran concentraciones plasmáticas más bajas para las microesferas que para las materias primas, sin embargo, la caída en dichas concentraciones es similar para ambas muestras a excepción de la Indometacina, donde en lugar de disminuir se incrementa, lo cual puede deberse también a la presencia de la mezcla de polimorfos.

Para obtener resultados más confiables y al mismo tiempo evaluar la variabilidad biológica se puede realizar esta prueba con un mayor número de animales. Los resultados obtenidos se muestran en las páginas 71 a 73, gráficas 20 a 22.

X. CONCLUSIONES

- Con el proceso de selección empleado en este trabajo es posible determinar si una sustancia puede ser utilizada en el proceso de obtención de microesferas por el método de rocío-congelación.
- La sustancia a ser empleada en el proceso de rocío-congelación para la obtención de microesferas debe cumplir con las siguientes características: solidificar en máximo 2 minutos y ser térmicamente estable.
- Se obtuvieron microesferas de la mezcla Diazepam-Colesterol 1-2, Indometacina y Naproxen.
- El proceso de fabricación de microesferas empleado favorece la formación de diferentes formas polimórficas cuando las características de la sustancia lo permiten.
- El Colesterol aunque disminuyó el tiempo de endurecimiento del Ibuprofen y la Lidocaína base, no logró que se obtuvieran microesferas con estas sustancias, que por sí solas no lo permitieron.
- La prueba de disolución "in vitro" no detectó diferencias claras entre las microesferas y las materias primas correspondientes debido en parte a la presencia de polimorfismo.

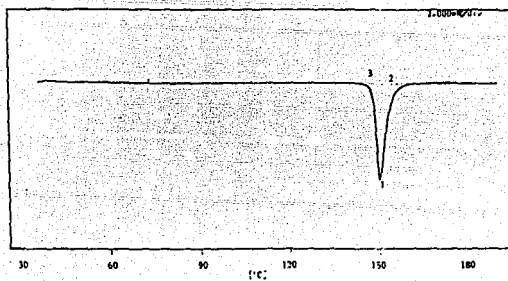
- Se requiere estudiar un proceso posterior, probablemente en base a un tratamiento térmico, a la obtención de microesferas que nos permita tener un control sobre las formas polimórficas que se generen.
- Las pruebas de biodisponibilidad en conejos aparentemente muestran una liberación del principio activo más controlada para las microesferas, aunque los niveles en concentraciones plasmáticas a tiempos finales son muy similares tanto para las microesferas como para las materias primas.
- El control de temperatura en el tubo enfriador puede ser un factor crítico para la obtención de las microesferas, pues aunque ya se había determinado que la Lidocaína y el Ibuprofen solidificaban adecuadamente no se obtuvieron microesferas de estas sustancias.

XI. PROPUESTAS

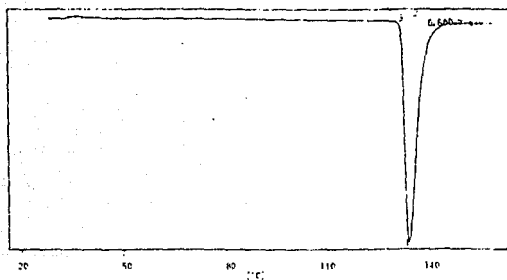
- Realizar una nueva selección de sustancias considerando, además de la solubilidad en agua y la estabilidad térmica, el tiempo menor o igual a 2 minutos para alcanzar el estado sólido y verificar si esto es suficiente para garantizar que con la sustancia seleccionada en esta forma se obtendrán microesferas.
- Realizar más estudios de disolución, pero en un equipo de flujo continuo comercial, para tratar de disminuir las posibles deficiencias que se tienen en el equipo empleado para esta prueba, ya que éste fue un equipo improvisado.
- Con respecto a las pruebas de biodisponibilidad realizarlas con el mayor número de conejos para evaluar la variabilidad biológica y al mismo tiempo sean más representativas.
- Buscar otra sustancia que pueda favorecer las características de velocidad de endurecimiento de los principios activos con los cuales no se logró obtener microesferas y evaluar nuevamente el proceso de obtención de microesferas.
- Implementar un sistema de detección de temperatura en el tubo enfriador, para que ésta pueda ser controlada.

APENDICE 1

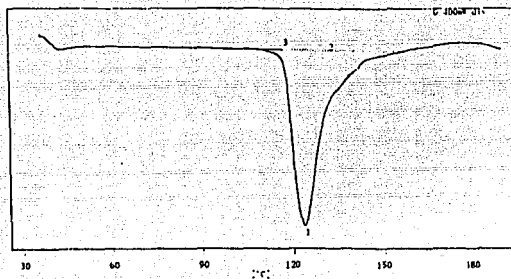
A continuación se muestran los termogramas obtenidos de las sustancias evaluadas durante el proceso de selección así como también de las microesferas obtenidas.



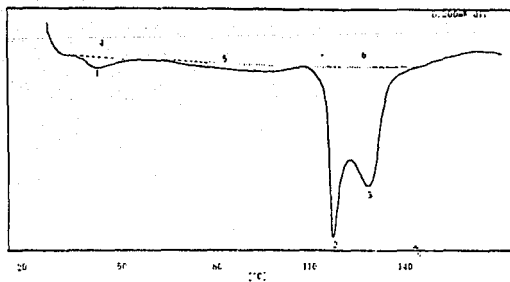
Gráfica A1.1. Termograma de Colesterol materia prima.



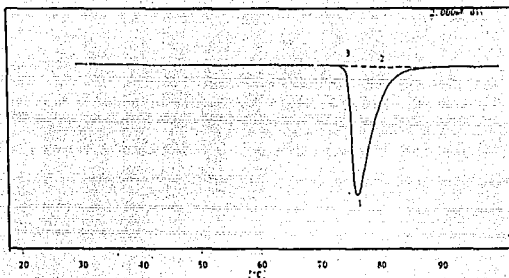
Gráfica A1.2. Termograma de Diazepam materia prima.



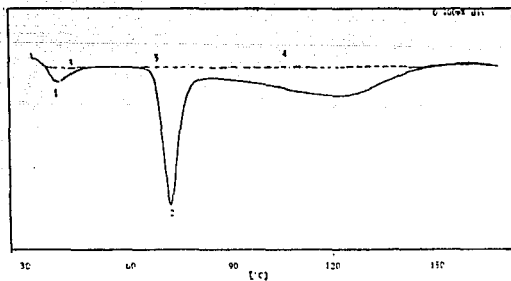
Gráfica A1.3. Termograma de la mezcla Diazepam: Colesterol 1:2 materia prima.



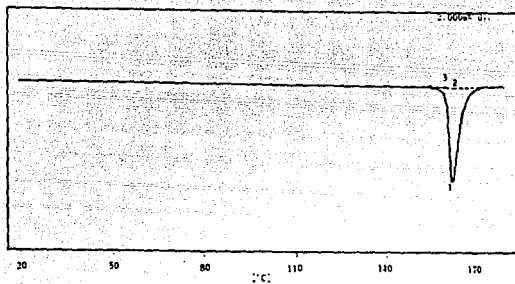
Gráfica A1.4. Termograma de Diazepam: Colesterol 1:2 microesferas.



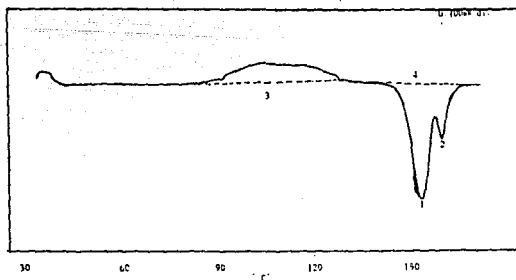
Gráfica A1.5. Termograma de Ibuprofen materia prima.



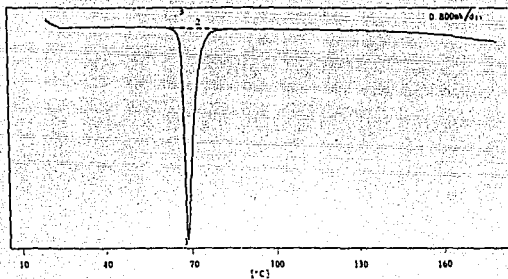
Gráfica A1.6. Termograma de la mezcla Ibuprofen: Colesterol 30:70 materia prima.



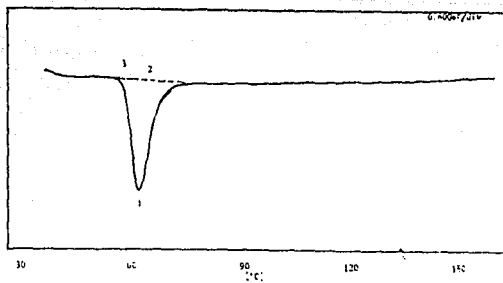
Gráfica A1.7. Termograma de Indometacina materia prima.



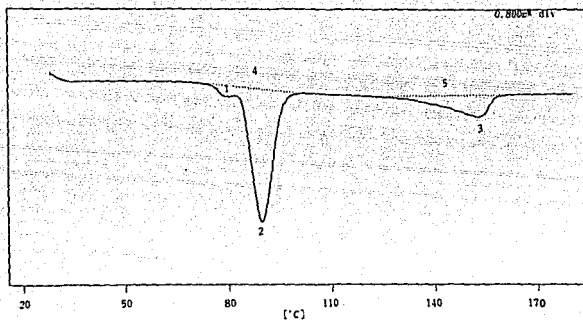
Gráfica A1.8. Termograma de Indometacina microesferas.



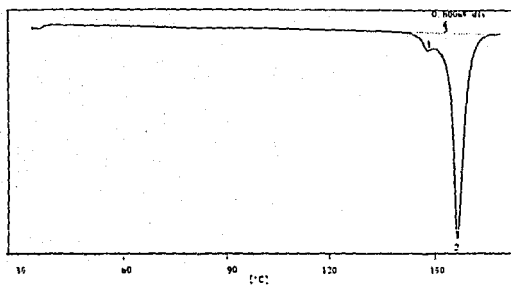
Gráfica A1.9. Termograma de Lidocaína base materia prima.



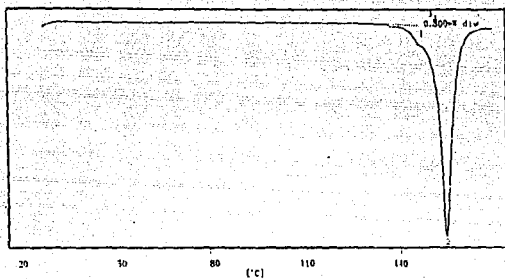
Gráfica A1.10. Termograma de la mezcla Lidocaína base: Colesterol 70:30.



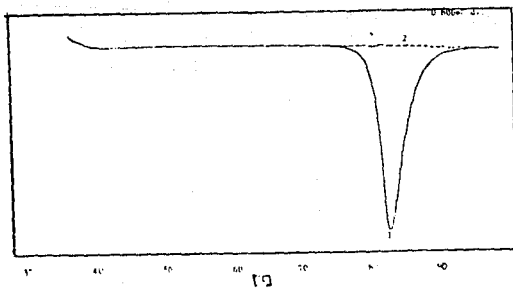
Gráfica A1.11. Termograma de Metoprolamida base materia prima.



Gráfica A1.12. Termograma de Naproxen materia prima.



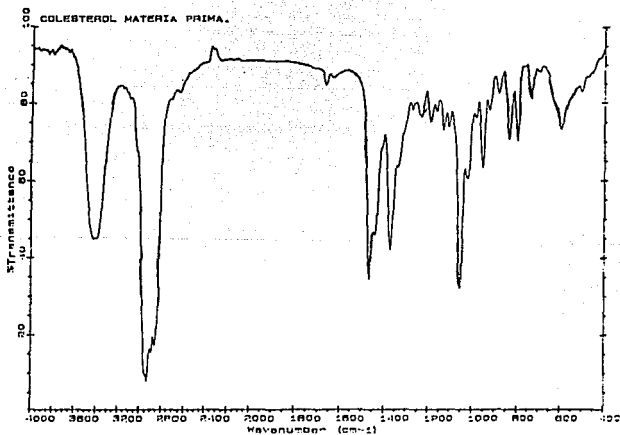
Gráfica A1.13. Termograma de Naproxen microsferas.



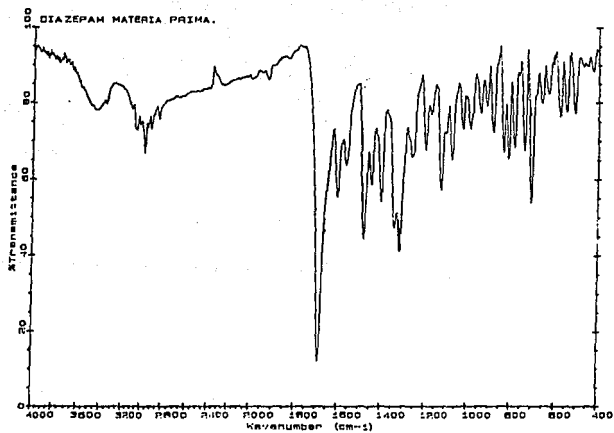
Gráfica A1.14. Termograma de Trimebutina base materia prima.

APENDICE 2

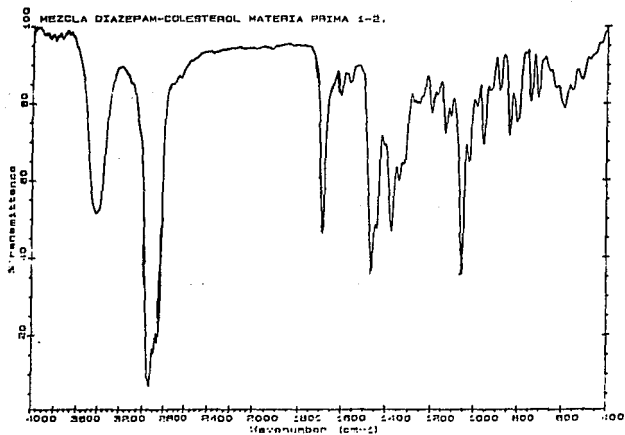
En las siguientes gráficas se muestran los espectros de absorción a la radiación infrarroja de las microsferas obtenidas y de las materias primas correspondientes.



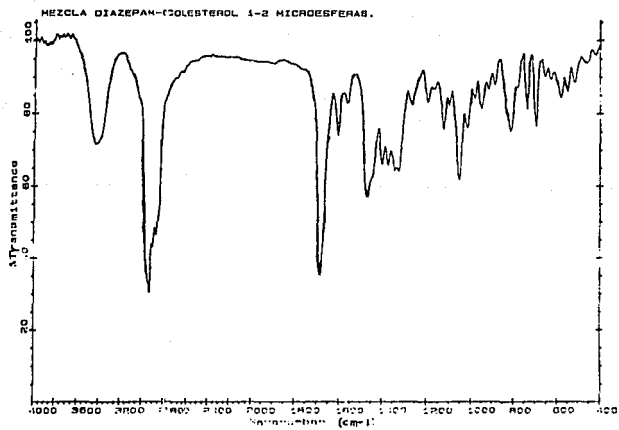
Gráfica A2.1. Espectro de absorción al infrarrojo de Colesterol materia prima.



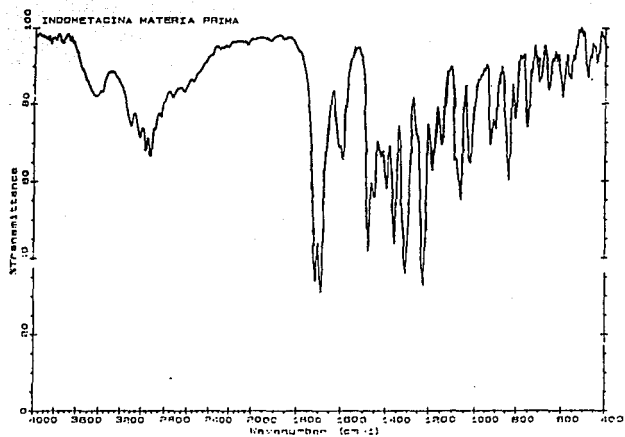
Gráfica A2.2. Espectro de absorción al infrarrojo de Diazepam materia prima.



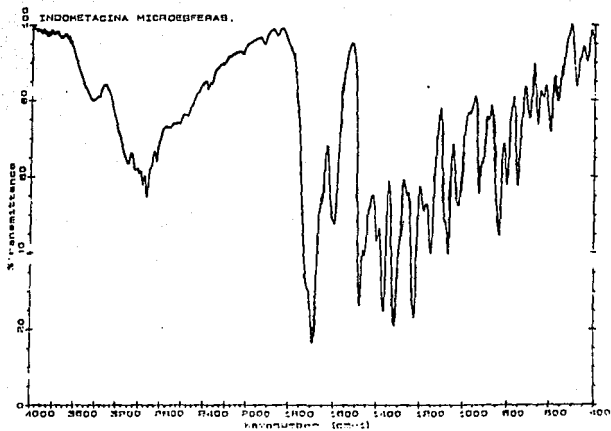
Gráfica A2.3. Espectro de absorción al infrarrojo de la mezcla Diazepam: Colesterol 1:2 materia prima.



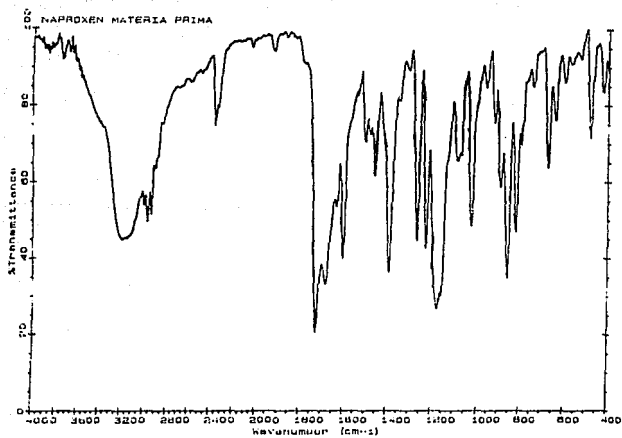
Gráfica A2.4. Espectro de absorción al infrarrojo de Diazepam:Coolesterol 1:2 microesferas.



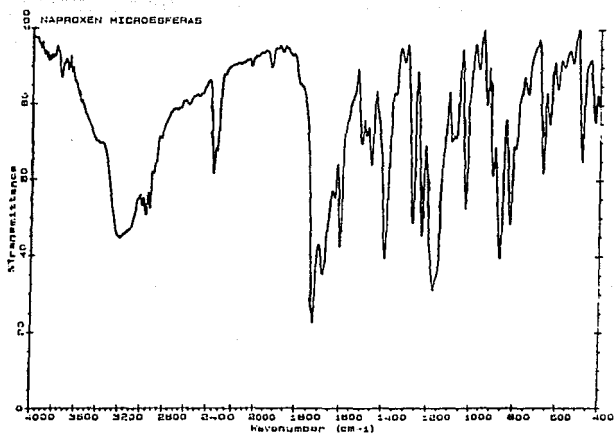
Gráfica A2.5. Espectro de absorción al infrarrojo de Indometacina materia prima.



Gráfica A2.6. Espectro de absorción al infrarrojo de Indometacina microsferas.



Gráfica A2.7. Espectro de absorción al infrarrojo de Naproxen materia prima.



Gráfica A2.8. Espectro de absorción al infrarrojo de Naproxen microsferas.

BIBLIOGRAFIA.

1. Lim, F. **BIOMEDICAL APPLICATIONS OF MICROENCAPSULATION.** CRC PRESS. Boca Raton, Florida USA . 1984. 8, 12 y 13.
2. Kydonieus, A. **TREATISE ON CONTROLLED DRUG DELIVERY.** Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 1992. 5-14, 37-39, 199, 315-325, 465-468.
3. Chien, Y. W. **NOVEL DRUG DELIVERY SYSTEMS. Vol 14 Fundamentals Developmental Concepts Biomedical Assessments..** Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 1982. 1-11.
4. Martin, A., Swarbrick, J., Cammarata, A. **PHYSICAL PHARMACY. Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences.** Third edition. Lea y Febiger. USA. 1983. 579.
5. Hamed, M. A. **DISSOLUTION, BIOAVAILABILITY Y BIOEQUIVALENCE.** MACK. USA. 1989. 215-220.
6. González Aguilar, P., Laiseca Soto, L.P. **Estudio preliminar para optimizar las condiciones de liberación sostenida de esteroides en suspensión inyectable.** Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza. México, D.F. (1989).
7. Guillén Pichardo, J.V. **Microesferas como modelo de liberación controlada: Técnica de roco-congelación.** Posgrado. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. 1990.
8. Notari, R. E. **BIOPHARMACEUTICS AND CLINICAL PHARMACOKINETICS AN INTRODUCTION.** 4nd. edition. Marcel Dekker, Inc. USA. 1987. 191,194.
9. Krowczynski, L. **EXTENDED-RELEASE DOSAGE FOORMS.** CRC PRESS. Inc. USA. 1987. 136-137.

10. Alfonso, R. G. REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES. MACK. Easton, Pennsylvania USA. 1990. 1676-1679.
11. Suranjana, R., et. al. "Indomethacin loaded microspheres: Desing and preparation by a multiple-emulsification technique and their in vitro evaluation". *Pharmaceutical Research*. 9(9) 1132-1136 (1992).
12. Kojima, T., et. al. "Preparation and evaluation in vitro of polycarbonate microspheres containing local anesthetics". *Chem. Pharm. Bull.* 32(7) 2795-2802 (1984).
13. Thermal analysis. Applications in the field of pharmaceutical industry. Shimadzu Corporation. International Marketing Division. Japan.
14. Shimadzu 50 series thermal analyzers application to foods and pharmaceuticals. Shimadzu Corporation. International Marketing Division. Japan.
15. Parrott, E. L. PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY. FUNDAMENTAL PHARMACEUTICS. Alpha Editions. Minneapolis, Minnesota USA. 1970. 116-122 y 124-129.
16. Hanson, W.A. HAND BOOK OF DISSOLUTION TESTING. 2nd. Edition. Aster Publishing Corporation. USA. 1991. 2-6, 8-10, 13-20, 45-52.
17. Langenbucher, F., et. al. "Standardized flow-cell method as an alternative to existing pharmacopoeial dissolution testing". *Pharm. Ind.* 51(11)1276-1281 (1989).
18. Moller, H. et. al. "Dissolution testing of different dosage forms using the flow-through method". *Pharm. Ind.* 45(6)617-622 (1983).
19. Skoog, D.A. ANALISIS INSTRUMENTAL. Interamericana. D.F., México. 1983. 133-154.

20. Moffat, A.C., Jackson, J.V., Moss, M.S., Widdop, B. **CLARKE'S ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DRUGS. In Pharmaceuticals, Body Fluids, and Post-Mortem Material.** 2nd edition. The Pharmaceutical Press. London, Great Britain. 1986. 526-527, 677-678, 681-682, 705-706, 776-777, 799-800.
21. **THE MERCK INDEX.** Eleventh edition. Merck Co., Inc. Rahway, New York USA. 1989.
22. Florey, K. A., et. al. **ANALYTICAL PROFILES OF DRUG SUBSTANCES.** Vol. 13. Academic Press, Inc. Orlando, Florida USA. 1984. 211-238.
23. Florey, K. A., et. al. **ANALYTICAL PROFILES OF DRUG SUBSTANCES.** Vol. 1. Academic Press, Inc. New York, USA. 1972. 79.
24. **THE UNITED STATES PHARMACOPEIA XXII. THE NATIONAL FORMULARY XVII.** Supplement 6. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville, M.D. USA. 1990. 2933-2935.