

00565
N-1
2E



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

IMPLEMENTACION DE TECNICAS ANALITICAS PARA
ASEGURAR LA COMPOSICION QUIMICA DEL
17 β -ESTRADIOL SOMETIDO AL PROCESO
DE MICROESFERIZACION

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
FARMACIA (CONTROL DE MEDICAMENTOS)

P R E S E N T A :
QFB. FREDY QUINTERO MARTINEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO, D. F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 ASIGNADO

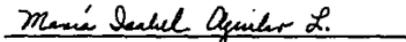
PRESIDENTE: Dr. José Luz González Chávez.
PRIMER VOCAL: M. en C. Helgi Jung Cook.
SECRETARIO: M. en C. Benjamín Sandoval Guzmán.
SUPLENTE: M. en C. Carlos Ramos Mundo.
SUPLENTE: M. en C. Juan Manuel Rodríguez.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: CENTRO DE APLICACIONES FARMACEUTICAS Y ESTUDIOS TECNOLOGICOS (CAFET S.A.), MEXICO, D.F.

SUSTENTANTE:


QFB. FREDY QUINTERO MARTINEZ

ASESOR:


M. en C. Ma. ISABEL AGUILAR L.

A MI FAMILIA

POR SU APOYO Y COMPRENSION

Un agradecimiento sincero a las personas integrantes del jurado, por sus valiosas indicaciones y sugerencias, que enriquecieron el contenido de este trabajo.

Al centro de Aplicaciones Farmacéuticas y Estudios Tecnológicos, S.A. (CAFET), por todas las facilidades prestadas para la realización del presente trabajo , en especial al director del centro, Q.F.B Juan Angeles Uribe.

Por último un agradecimiento muy especial a mi asesor de tesis, M. en C. María Isabel Aguilar Laurents, por su paciencia y ayuda prestadas durante el desarrollo de este trabajo y por su trato cordial, amable, optimista y profundamente humano.

**IMPLEMENTACION DE TECNICAS ANALITICAS PARA ASEGURAR LA
COMPOSICION QUIMICA DEL 17 β -ESTRADIOL SOMETIDO AL PROCESO
DE MICROESFERIZACION**

INDICE

	Página
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
CAPITULO 1. INTRDDUCCION.....	5
CAPITULO 2. OBJETIVOS.....	7
CAPITULO 3. GENERALIDADES.....	8
3.1 Monografía del Fármaco.....	8
3.1.2 Propiedades Físicas y Químicas.....	10
3.1.2.1 Solubilidad.....	10
3.1.2.2 Constante de Ionización.....	12
3.1.2.3 Rotación Específica.....	12
3.1.2.4 Intervalo de Fusión.....	12
3.1.2.5 Síntesis.....	13
3.1.2.6 Estabilidad.....	13
3.1.2.7 Espectroscopia.....	13
3.1.3 Métodos de Análisis.....	18
3.1.3.1 Extracción y Purificación.....	18
3.1.3.2 Colorimetría y Fluorescencia.....	18
3.1.3.3 Análisis Cromatográficos.....	18
3.1.4 Propiedades Farmacológicas.....	19
3.1.4.1 Biosíntesis.....	19
3.1.4.2 Acciones Fisiológicas y Farmacológicas.....	20
3.1.4.3 Absorción y Excreción.....	21
3.1.4.4 Efectos Colaterales.....	21
3.1.4.5 Usos Terapéuticos.....	21
3.1.4.6 Preparados.....	22
3.2 Proceso de Fabricación de Microesferas.....	22
3.3 Análisis Térmico.....	24
3.3.1 Análisis Térmico Diferencial.....	25
3.3.2 Calorimetría Diferencial de Barrido.....	25

3.4	Polimorfismo.....	25
3.5	Cromatografía.....	31
3.5.1	Parámetros Cromatográficos.....	32
3.5.1.1	Tiempo de Retención.....	32
3.5.1.2	Tiempo Muerto.....	32
3.5.1.3	Tiempo de Retención Corregido.....	33
3.5.1.4	Coficiente de Reparto.....	33
3.5.1.5	Razón de Fases.....	33
3.5.1.6	Factor de Capacidad.....	33
3.5.1.7	Número de Platos Teóricos.....	34
3.5.1.8	Altura Equivalente a un Plato Teórico.....	34
3.5.1.9	Factor de Simetría.....	34
3.5.1.10	Selectividad.....	34
3.5.1.11	Resolución.....	35
3.5.2	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	36
3.5.2.1	Detector de Arreglo de Fotodiodos.....	37
3.6	Técnica de Reflectancia Difusa.....	38
3.6.1	Generalidades.....	38
3.6.2	Teoría.....	39
3.7	Validación.....	40
3.7.1	Especificidad.....	40
3.7.2	Linealidad e Intervalo Lineal.....	41
3.7.3	Exactitud.....	41
3.7.4	Precisión.....	41
3.7.5	Estabilidad de la Muestra.....	42
3.7.6	Tolerancia del Sistema.....	42
CAPITULO 4. PARTE EXPERIMENTAL.....		43
4.1	Reactivos, Material y Equipo.....	43
4.1.1	Reactivos.....	43
4.1.2	Material.....	43
4.1.3	Equipo.....	43
4.2	Condiciones Experimentales.....	45
4.3	Evaluación del Método Analítico.....	52
4.3.1	Linealidad del Sistema.....	52
4.3.2	Precisión del Sistema.....	52
4.3.3	Especificidad del Método Analítico.....	52
4.3.4	Linealidad del Método Analítico.....	53

4.3.5	Precisión del Método.....	54
4.3.6	Exactitud del Método.....	54
4.3.7	Estabilidad de la Muestra.....	54
4.3.8	Confiabilidad del Sistema.....	54
CAPITULO 5.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	56
5.1	Métodos Espectroscópicos.....	56
5.2	Calorimetría.....	58
5.3	Evaluación del Método Analítico.....	59
5.3.1	Linealidad del Sistema.....	59
5.3.2	Especificidad.....	62
5.3.3	Linealidad del Método.....	64
5.3.4	Precisión.....	67
5.3.5	Estabilidad de la Muestra.....	68
5.3.6	Tolerancia del Sistema.....	69
CAPITULO 6.	CONCLUSIONES.....	71
CAPITULO 7.	ANEXOS.....	73
	Anexo I. Lista de Gráficas.....	73
	Anexo II. Lista de Fórmulas.....	88
BIBLIOGRAFIA.....		93

RESUMEN

Una formulación de acción controlada, contiene microesferas de 17 β -Estradiol como principio activo. Estas microesferas se obtienen por la técnica de rocío-congelación, y en este proceso, la muestra (17 β -Estradiol) se somete a condiciones drásticas de calentamiento-enfriamiento, lo que puede causar descomposición del fármaco, o alguna modificación cristalina. Es por esto, que dentro del desarrollo de la formulación de acción controlada con microesferas de 17 β -Estradiol es necesario aplicar técnicas analíticas adecuadas que permitan asegurar la integridad química de las microesferas así elaboradas.

Para la cuantificación del 17 β -Estradiol, en este trabajo se desarrolló un método por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), con detector con arreglo de fotodiodos.

El método resultó ser exacto y preciso, asegurando así la especificidad de su respuesta.

SUMMARY

The development of a sustained release formulation containing microspheres of 17 β -Estradiol as drug substance obtained by the Spray-Congeaing method requires suitable analytical methods in order to ensure the chemical integrity of the drug in the microphones. The Spray-Congeaing process involves the exposition of the drug substance under drastically conditions of extreme temperature changes that may induce decomposition or modification of the crystalline form of 17 β -Estradiol.

With infrared spectroscopy it is possible to observe how the 17 β -Estradiol crystallize to the D polymorphic form when submitted to the microspherization process and then adopt the A and C polymorphic forms when submitted to thermal treatment (the A polymorphic form is the most stable one). This kind of transformations also are detected by thermal analysis.

The other spectroscopic techniques like Ultraviolet (UV), Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Mass Spectroscopy (MS) were used in this work in order to ensure the chemical integrity of the molecule.

The High Performance Liquid Chromatography (HPLC), with a Photodiode Array Detector was used to quantify 17 β -Estradiol. This analytical method has shown to be precise, accurate and specific.

LISTA DE ABREVIATURAS

AEPT	Altura Equivalente de un Plato Teórico
b	Ordenada al Origen
b (r)	Ordenada al Origen Relativa
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
C.V.	Coefficiente de Variación
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
DTA	Análisis Térmico Diferencial
K	Coefficiente de Reparto
k'	Factor de Capacidad
L	Longitud de la Columna
LIIC	Límite Inferior del Intervalo de Confianza
LSIC	Límite Superior del Intervalo de Confianza
M ⁺	Ion Molecular
m	Pendiente
m (r)	Pendiente Relativa
m W	Miliwatt
n	Número de Datos
N	Número de Platos Teóricos
ppm	Partes por Millón
R	Resolución
S	Desviación Estándar
S _{r/y}	Desviación Estándar de Regresión
S _{r/y} (r)	Desviación Estándar de Regresión Relativa
T	Factor de Simetría

TMS	Tetrametilsilano
t_0	Tiempo Muerto
t_r	Tiempo de Retención
t'_r	Tiempo de Retención Corregido
w	Ancho del Pico
α	Selectividad
β	Razón de Fases
s	Desplazamiento Químico

CAPITULO I

INTRODUCCION

La gran mayoría de los fármacos utilizados actualmente como anticonceptivos, tienen la desventaja de causar efectos secundarios indeseables. Estos efectos ocurren debido a que las formulaciones actuales emplean dosis demasiado altas para poder producir el mencionado efecto anticonceptivo, originando así dichos efectos, por lo tanto se hace necesario ampliar el desarrollo tecnológico en la dosificación de estos fármacos.

Durante la última década se han tenido resultados positivos en el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos en los cuales se han utilizado esteroides naturales y sintéticos.

Entre las formulaciones desarrolladas se encuentra un anti-conceptivo inyectable mensual, el cual asegura una concentración adecuada de Progestina en el organismo.

En este tipo de formulaciones se intenta que la liberación del fármaco sea controlada y que solamente se utilice la cantidad necesaria para obtener el efecto anticonceptivo deseado, disminuyendo así los efectos secundarios. Dicha formulación propuesta es una suspensión inyectable de acción controlada que contiene como principios activos microesferas de 17 β -Estradiol y Progesterona.

El proceso utilizado para el desarrollo de esta formulación es la microesferización, en el cual se utiliza la técnica de rocío-congelación, la cual consiste en fundir la muestra (17 β -Estradiol), para luego ser rociada con ayuda de aire caliente hacia una cámara de congelamiento y posteriormente recolectar las microesferas así elaboradas.

En dicho proceso, el fármaco es sometido a condiciones drásticas de temperatura, lo que puede originar una descomposición del mismo o la aparición de posibles formas polimórficas, esto conlleva al desarrollo del presente trabajo donde se pretenden implementar las técnicas analíticas adecuadas para asegurar la composición química del esteroide como también las técnicas que permitan evaluar las posibles modificaciones cristalinas (polimorfos).

Asimismo se hace necesario contar con técnicas analíticas adecuadas para asegurar el comportamiento químico de las microesferas así elaboradas.

Las técnicas espectroscópicas son una herramienta adecuada en el presente estudio, ya que cada una de ellas nos proporciona información de los posibles cambios sufridos en la estructura de la molécula del 17 β -Estradiol, sometida a las condiciones antes

mencionadas. Las técnicas espectroscópicas utilizadas en el presente estudio son las siguientes:

La absorción al ultravioleta, la espectroscopía infrarrojo, la resonancia magnética protónica y la espectroscopía de masas.

Otra de las técnicas analíticas utilizadas en el presente estudio, es la calorimetría diferencial de barrido.

También se cuenta con un método analítico capaz de cuantificar al 17 β -Estradiol sin que interfieran los posibles productos de degradación; la técnica a elegir es la cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de fotodiodos para asegurar la especificidad de su respuesta.

CAPITULO 2

OBJETIVOS

- Contar con técnicas para asegurar el comportamiento químico de las microesferas de 17 β -Estradiol que serán utilizadas para una formulación de acción controlada.
- Implementación de métodos espectroscópicos y calorimétricos para la identificación de cada una de las modificaciones cristalinas del 17 β -Estradiol, en el proceso de microesferización.
- Desarrollo de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación de 17 β -Estradiol microesferas.
- Estudiar la estabilidad de las microesferas de 17 β -Estradiol, ya que al presentar diferentes formas cristalinas durante el proceso de fabricación, tienden con el tiempo a adoptar la forma más estable (forma A o hemidratada).

CAPITULO 3

GENERALIDADES

El 17 β -Estradiol es la hormona estrogénica más potente, controlada y secretada por los ovarios. Junto con la Progesterona, tiene como función vital la preparación del aparato reproductor femenino para la recepción del esperma y la implantación de un huevo fecundado. La síntesis y la aplicación de estas hormonas ováricas ha permitido la intervención terapéutica racional en ciertas enfermedades; sin embargo, ha sido mucho mayor el uso clínico de éstas como anticonceptivos.

3.1 Monografía del fármaco (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)

- Nombre Genérico (1)

17 β -Estradiol

- Nombres Químicos (1)

1. - (17 β)-Estra-1,3,5(10)-trieno-3,17-diol

2. - Estra-1,3,5(10)-trieno-3,17 β -diol

- Nombres Comerciales (2)

1. - ANAFERTIN

2. - CILEST

3. - EXLUTON

4. - LUTOGINESTRYL F

5. - MARVELON

6. - NORDET

7. - NORDIOL

8. - OVRAL

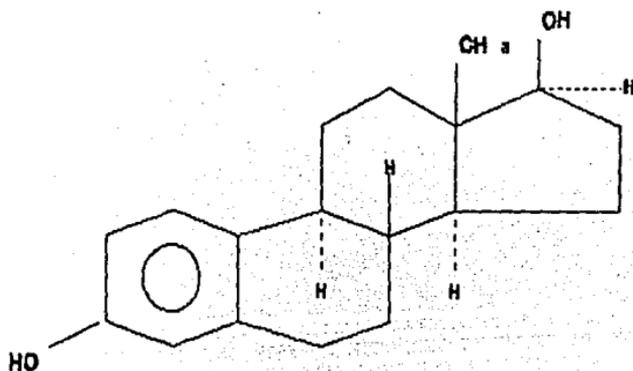
9. - PERLUTAL

- Fórmula Condensada (1)



- Fórmula Desarrollada (2)

Figura 1. 17 β -Estradiol



- Peso Molecular (3)

272.39

- Descripción (1)

Polvo cristalino o cristales higroscópicos, de color blanco o blanco cremoso.

- Análisis Elemental (3)

En la tabla 1 se presenta el análisis elemental del 17 β -Estradiol.

Tabla 1. Análisis Elemental del 17 β -Estradiol.

Elemento	Porcentaje
Carbono	79.37
Hidrógeno	8.88
Oxígeno	11.75

3.1.2 Propiedades Físicas y Químicas (3, 4, 5, 6)

3.1.2.1 Solubilidad (1, 4, 5)

El 17 β -Estradiol se considera prácticamente insoluble en agua, ligeramente soluble en etanol, acetona, cloroformo y éter, muy soluble en dioxano y en soluciones fuertemente alcalinas.

Tabla 2. Solubilidad del 17 β -Estradiol (mg/dL)
en Disolventes Orgánicos (10)

	Temperatura °C			
	0	15	25	30
Acetona	2594.1	4291.2	7068.8	8914.8
Benceno	-	21.7	46.7	80.1
Cloroformo	140.5	251.2	411.4	642.7
Ciclohexano	-	0.5	1.3	2.2
Diclorometano	45.1	108.4	192.6	267.1
Dioxano	-	7075.2	12085.6	19868.4
Etanol	1541.8	2387.2	3134.4	3727.4
95% v/v Etanol	1060.4	1606.9	2908.8	4186.3
Dietil éter	533.2	700.8	749.5	836.7
Hexano	< 0.5	< 0.5	< 0.5	0.9
Metanol	862.1	1811.3	2548.8	3525.6
Tetrahidrofurano	25447.2	28006.4	29222.4	33788.8
Tolueno	4.3	14.8	33.1	51.5

Tabla 3. Solubilidad del 17 β -Estradiol(mg/dL)
en Disolventes Acuosos (10)

	Temperatura °C		
	25	35	37
Agua	0.30	0.56	
0.02 M Cloruro de Sodio			0.38
0.20 M Cloruro de Sodio			0.34
0.40 M Cloruro de Sodio			0.28
Sol. Amortiguadora de PO ₄ ³⁻			
pH 7.2 , 0.50 I			0.38±0.046
pH 7.2 , 0.10 I			0.36±0.016
pH 7.2 , 0.20 I			0.34±0.24
0.005 M L-Tirosina en			
Sol. Amortiguadora de PO ₄ ³⁻			
pH 7.2 , 0.10 I			0.66±0.049
Sol. Amortiguadora de PO ₄ ³⁻			
pH 7.4 , 0.15 I			0.512
0.02 M Sodio			
Dioxicolato en			
Sol. Amortiguadora de PO ₄ ³⁻			
pH 7.4 , 0.15 I			3.92

3.1.2.2 Constante de Ionización (10)

El 17 β -Estradiol es un ácido débil, y su pKa aparente determinado espectrofotométricamente es de 10.12.

3.1.2.3 Rotación Específica (11, 12)

El 17 β -Estradiol presenta una rotación específica entre +76° y +83° determinada en una solución en dioxano a una concentración de 10mg/mL.

3.1.2.4 Intervalo de Fusión (13, 14, 15)

El intervalo de fusión del 17 β -Estradiol viene reportado entre 173°C y 179°C, por la técnica descrita por la USP. Por calorimetría de barrido diferencial el 17 β -Estradiol presenta dos picos endotérmicos a 112°C y 174°C, antes de la endoterma de fusión a 179°C, como se muestra en la Figura 2.

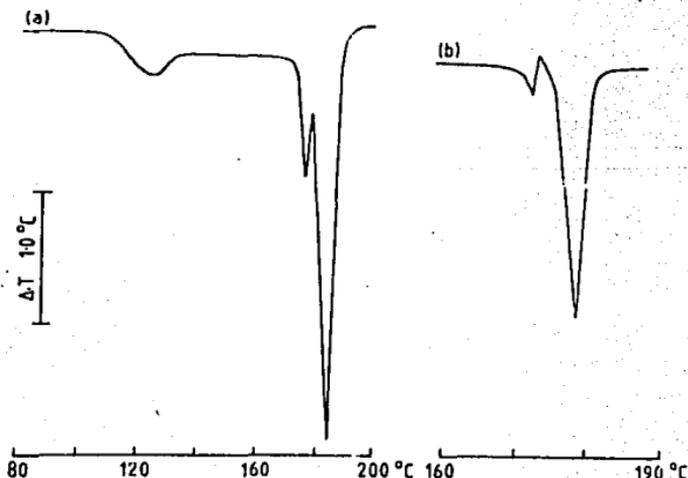


Figura 2. Termogramas del 17 β -Estradiol a velocidades de calentamiento de (a) 10°C/min. y (b) 2°C/min. utilizando 8mg de muestra. Determinados en un equipo Stanton Redcroft 671B analizador.

3.1.2.5 Síntesis (e)

El 17 β -Estradiol es comúnmente sintetizado a partir de la reducción con borohidruro de sodio de la Estrona, la cual es obtenida por la pirólisis o reducción de la Androstenodiona.

3.1.2.6 Estabilidad (e)

El 17 β -Estradiol es estable en soluciones diluidas de ácidos y bases; y en forma sólida permanece químicamente estable por lo menos por cinco años bajo condiciones de temperatura ambiente. Sin embargo; se ha reportado que el 17 β -Estradiol aplicado en una placa de sílica y expuesto a la atmósfera por una hora presenta una descomposición sustancial. (4)

3.1.2.7 Espectroscopia (e)

Ultravioleta: El 17 β -Estradiol exhibe máximos de absorción a las longitudes de onda de 221 nm y a 280 nm aproximadamente, como se muestra en la figura 3.

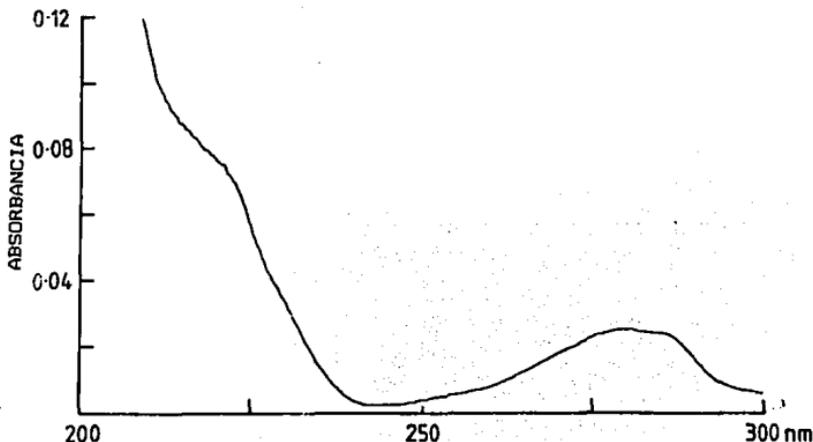


Figura 3. Espectro de absorción ultravioleta del 17 β -Estradiol obtenido en un Espectrómetro Cecil CE505A, utilizando una celda de 1 cm de paso óptico, a una concentración de 0.0033 mg/mL de 17 β -Estradiol en metanol al 2% v/v, haciendo un barrido desde 200 nm a 300 nm.

Infrarrojo: El espectro infrarrojo del 17 β -Estradiol, se ilustra en la figura 4. La asignación de bandas y desplazamientos se encuentra resumida en la tabla 4.

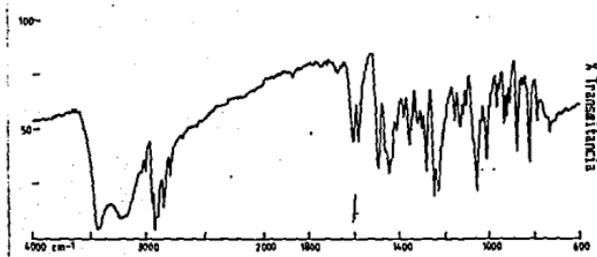


Figura 4. Espectro Infrarrojo del 17 β -Estradiol obtenido en un Espectrómetro Pye-Unicam modelo SP3-200, de una dispersión de 17 β -estradiol en bromuro de potasio, en un intervalo de número de onda de 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} .

Tabla 4. Asignación de Bandas de Absorción al Infrarrojo. del 17 β -Estradiol.

Frecuencia (cm^{-1})	Forma e Intensidad	Asignación
~3435	Hombro	O-H Estiramiento
~3060	Hombro	C-H Estiramiento
~3020	Débil	C-H Estiramiento
~1585	Mediana	V. Simétrica anillo
~1500	Fuerte	Flexión del anillo
~1250	Fuerte	C-O Estiramiento
~1237	Hombro	O-H Fenólico Dobles
~1054	Fuerte	C-O Alargamiento
~740	Ancha, Débil	O-H flexión

Resonancia Magnética Nuclear: El espectro de resonancia magnética nuclear ^1H del 17 β -Estradiol se muestra en la figura 5, y la asignación de bandas se encuentran resumidas en la tabla 5

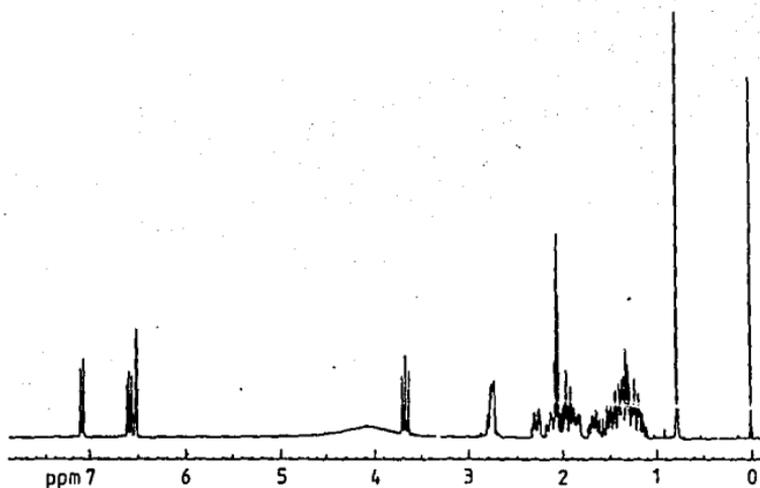
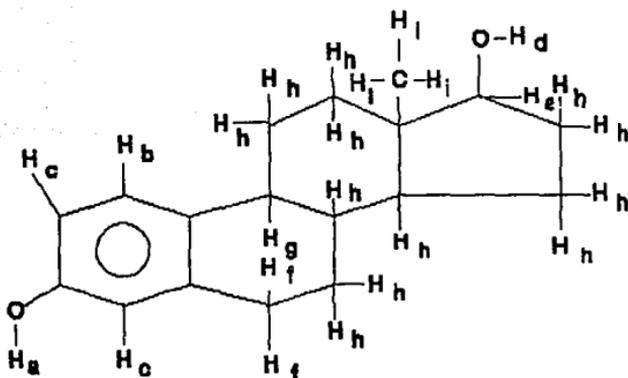


Figura 5. Espectro de resonancia magnética nuclear ^1H del 17 β -Estradiol determinado en un espectrómetro Bruker WM250, utilizando como disolvente acetona y (TMS) como referencia interna.

Tabla 5. Asignación de Bandas de ^1H del 17 β -Estradiol

Protón	Número de Protones	Desplazamiento Químico (δ/ppm)	Tipo de Señal
a	1	9.0	Singulete
b	1	7.09	Doblete
c	2	6.59 - 6.52	3 Dobletes
d	1	4.54	Doblete
e	1	3.67	Doblete
f	2	2.76	Multiplete
g	1	2.28	Multiplete
h	12	2.20 - 1.10	Multiplete
i	3	0.77	Singulete

Espectro de Masas: El espectro de masas del 17 β -Estradiol se muestra en la figura 6. La asignación de señales características se encuentran en la tabla 6.

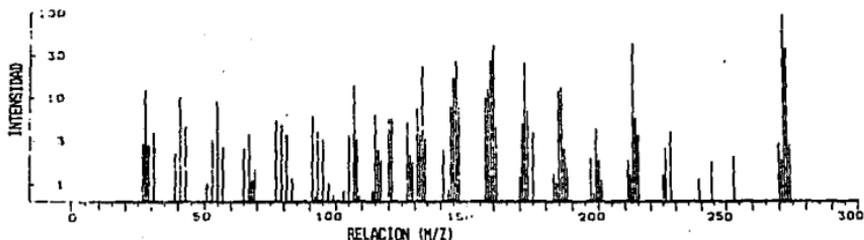


Figura 6. Espectro de masas del 17 β -Estradiol utilizando un espectrómetro de ionización de impacto de electrones AEI (Kratos) MS9.

Tabla 6. Asignación de Señales Características en el Espectro de Masas del 17 β -Estradiol.

Relación Masa/Carga	Composición	Intensidad Relativa
272	$C_{18}H_{24}O_2$ [M^+]	100
213	$C_{15}H_{17}O$	46
186	$C_{13}H_{14}O$	14
185	$C_{13}H_{13}O$	13
172	$C_{12}H_{12}O$	27
160	$C_{11}H_{12}O$	43
159	$C_{11}H_{11}O$	29
158	$C_{11}H_{10}O$	13
146	$C_{10}H_{10}O$	28
145	$C_{10}H_9O$	18
133	C_9H_9O	23

3.1.3 Métodos de Análisis (1, 2, 3)

3.1.3.1 Extracción y Purificación (1)

Se han reportado técnicas de extracción del 17 β -Estradiol de fluidos biológicos. Este fármaco puede ser cuantitativamente extraído con éter dietílico o benceno, la fase orgánica se lava con solución amortiguadora de carbonato de sodio a pH 10.5 para eliminar las impurezas no esteroideas, después se extrae con hidróxido de sodio 0.1M y luego se re-extrae con el disolvente orgánico después de acidificación con ácido sulfúrico. Estos conjugados altamente polares son extraídos con acetato de etilo (después de la separación de la fracción no conjugada) e hidrolizados por reflujo con ácido clorhídrico o por incubación con enzimas; sulfatasas o β -glucuronidasas.

3.1.3.2 Colorimetría y Fluorescencia (1)

Se han desarrollado varios métodos para el análisis colorimétrico del 17 β -Estradiol basados en la reacción de Kober, donde una muestra del fármaco es calentada con un fenol (ejemplo β -naftol) y ácido sulfúrico [$\geq 60\%$ (p/v)], dando origen a una solución amarilla la cual es diluida a una concentración de 30-50%(p/v) y recalentada hasta formar una solución de color rosa la cual absorbe a un máximo de 530 nm. Utilizando el método modificación de Ittrich, el cual es más sensible y exacto, donde se omite el recalentamiento después de la dilución, y el complejo colorido es extraído con una solución al 2%(p/v), de p-nitrofenol en cloroformo, dando origen a una solución fluorescente amarillo verdoso.

3.1.3.3 Análisis Cromatográfico

- Cromatografía en Placa fina (1)

Existen varios sistemas útiles para la separación del 17 β -Estradiol. A continuación se enlistan dos sistemas (disolventes utilizados como fase móvil), utilizados en placa fina.

- Adsorbente** - Sílica gel G, con 250 μ m de espesor activada a 150 °C por 3 horas.
- Solventes** - (a) cloroformo:acetato de etilo, 80:20
(b) acetona:diclorometano, 20:80.
- Revelado** - Rocíar con tricloruro de antimonio 100% P/P en ácido acético glacial. Desarrolla a 95°C por 5 minutos manchas de color rojo claro con
(a) R_f 0.32 y (b) R_f 0.56.

- Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (1. 0. 7)

Muchos son los sistemas utilizados para cuantificar al 17 β -Estradiol, tanto en preparados farmacéuticos como en fluidos biológicos. Un método de análisis utilizado para cuantificar 17 β -Estradiol es el descrito por la USP XXII, el cual utiliza una columna de acero inoxidable de 3.9-mm x 300-mm, empacada con sílica de 10 μ m de tamaño de partícula, de forma irregular, unidas químicamente a una cadena de C₁₈ con recubrimiento final, utilizando como fase móvil acetonitrilo/agua (55:45), a una velocidad de flujo de 1 mL/min, con un volumen de inyección de 25 μ L, utilizando un detector UV. a una longitud de onda de 205 nm y como estándar interno el etilparabeno a una concentración de 15 μ /mL y para el 17 β -Estradiol una concentración de 20 μ g/mL.

Otro método de análisis utiliza una columna de Sistema de Separación de Compresión Radial (SSCR) Radial-PAK (µBondapak), empleando como fase móvil acetonitrilo/agua (50:50), a una velocidad de flujo de 2 mL/min, con un volumen de inyección de 100 μ L, utilizando un detector UV. a una longitud de onda de 280 nm y una concentración de 17 β -Estradiol de 0.05 μ g/mL, con un tiempo de retención de 5.6 min.

3.1.4 Propiedades Farmacológicas (0. 0)

El 17 β -Estradiol es una hormona estrogénica cuya producción controlada y cíclica es exclusivamente del ovario. Junto con la progesterona tienen como función vital la preparación del aparato reproductor femenino para la recepción del espermia y la implantación de un huevo fecundado. La síntesis y acción de estas hormonas ováricas ha permitido la intervención terapéutica racional en ciertas enfermedades. Sin embargo, ha sido mucho mayor el uso clínico de estas hormonas que actúan como anticonceptivos.

3.1.4.1 Biosíntesis (0. 0)

El 17 β -Estradiol es biosintetizado en la mujer principalmente por componentes de los ovarios (folículos, cuerpo luteo y estroma), siguiendo con la clásica ruta de los esteroides, convirtiendo el acetato en colesterol siguiendo hasta pregnolona y androstenodiona.

El 17 β -Estradiol se forma en definitiva con androstenodiona o testosterona como precursores inmediatos (figura 7). De los tres estrógenos humanos principales, el 17 β -Estradiol es el más potente y el principal producto secretorio del ovario; se oxida fácilmente a estrona, que a su vez puede hidratarse a estriol. Estas transformaciones tienen lugar principalmente en el hígado, donde hay interconversión libre entre la estrona y el 17 β -Estradiol.

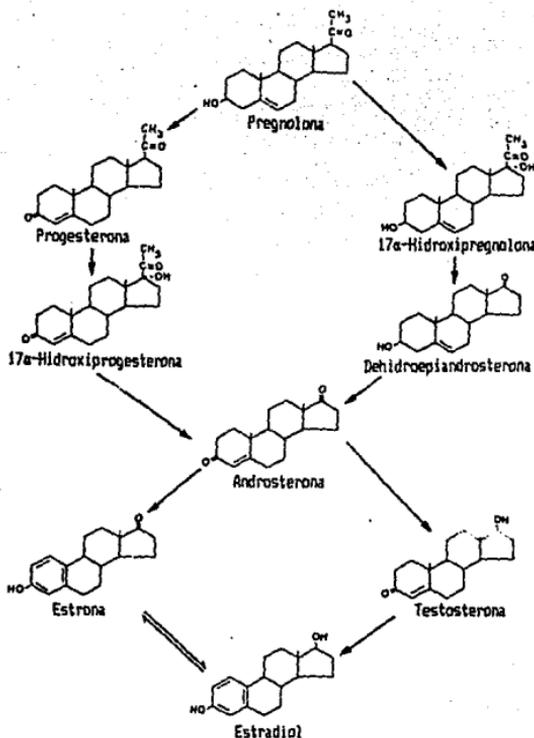


Figura 7. Biosíntesis del 17β-Estradiol.

3.1.4.2 Acciones Fisiológicas y Farmacológicas (10)

El 17β-Estradiol es responsable en buena parte de los cambios que se producen en las niñas al llegar a la pubertad, y explican en gran medida los atributos tangibles e intangibles de la femeneidad.

Por una acción directa causa el crecimiento y desarrollo de la vagina, el útero y las trompas de falopio. Agrandada las mamas promoviendo el crecimiento ductal, el desarrollo del estroma y la acumulación de grasa. La secreción varía con la fase del ciclo menstrual; su niveles plasmáticos fluctúan rápidamente, las velocidades típicas de secreción durante la etapa folicular, mitad del ciclo y fase lutea son de 80, 400 y 200 µg/dL, proporcionando un total de niveles en plasma de 17β-Estradiol aproximadamente de 6, 30 y 15 ng/dL respectivamente.

3.1.4.3 Absorción y Excreción (6)

El 17β-Estradiol se absorbe fácilmente a través de la piel, las mucosas y el tracto gastrointestinal. La absorción en el tracto gastrointestinal es rápida y muy completa, su limitada efectividad oral se debe a su metabolismo. Es prácticamente insoluble en agua. Cuando se inyecta disuelto en aceite se absorbe y metaboliza rápidamente. Los aril- y alquil-ésteres del 17β-Estradiol se hacen cada vez menos polares al aumentar el tamaño de los sustituyentes; por lo mismo, el índice de absorción de los preparados oleosos es cada vez más lento y la duración de la acción más prolongada.

Su inactivación en el organismo se realiza principalmente en el hígado. Cierta proporción que llega a dicho órgano se excreta por la bilis, pero se reabsorbe luego del intestino. Durante esta circulación enterohepática, se produce degradación en productos menos activos como estriol y muchos otros estrógenos, por oxidación a sustancias no estrogénicas, y por conjugación con el ácido sulfúrico y glucurónico. Circula en la sangre junto con globulina y albúmina ligadoras de hormonas sexuales. Una parte importante del 17β-Estradiol está en forma de conjugados, especialmente sulfato. Estos conjugados hidrosolubles son ácidos fuertes y como tales se ionizan totalmente en los líquidos corporales; la penetración en las células es limitada y la excreción por el riñón es la que predomina, porque hay poca posibilidad de reabsorción tubular.

3.1.4.4 Efectos Colaterales (6)

El síntoma desfavorable más frecuente es la presencia de náuseas. A grandes dosis también puede presentarse anorexia y hasta vómitos y ligera diarrea. Cuando se administran dosis muy elevadas, como en el tratamiento de cáncer de mama, las náuseas sólo se presentan durante las primeras semanas.

3.1.4.5 Usos Terapéuticos (6)

El uso más importante en combinación con progestágenos es para formar anticonceptivos orales, y en general, en los trastornos que suelen aparecer en la menopausia.

3.1.4.6 Preparados (*)

Diversos ésteres de 17 β -Estradiol (benzoato, cipionato, enantato, propionato succinato y valerato) se preparan en suspensión acuosa o solución oleosa para liberación lenta después de la inyección intramuscular, en combinación con un progestágeno. Estos preparados contienen 5 a 10mg/mL y se venden con diferentes nombres comerciales (ANAFERTIN, VECTAMES, PERLUTAL, LUTOGINESTRYL F y muchos otros). También en grageas y tabletas como anticonceptivos orales entre las cuales se encuentran los nombres comerciales (CILEST, MINULET y otros).

3.2 Proceso de Fabricación de Microesferas por la Técnica de Rocío-Congelación (7, 10, 11, 12)

Los productos inyectables conteniendo 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 de 125 micras. Las partículas de este tamaño pueden ser fácilmente administradas suspendiéndolas en un vehículo acuoso adecuado e inyectándolas en la forma convencional.

La técnica de rocío-congelación utilizada para la obtención de microesferas de 17 β -Estradiol fué introducida por Robinson, M.J., Bondi, A. y Swintosky, J.V. en 1958 la cual se puede definir de la siguiente manera:

"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 tamaño de partículas definida. Sus características físicas dependen de las condiciones operacionales".

Esto es, con esta 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. El requisito indispensable para emplear esta técnica es que al fundir la muestra no sufra ningún tipo de degradación.

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

Las microesferas de 17 β -Estradiol obtenidas por esta técnica resultan ser inestables en el vehículo en el cual van estar suspendidas (posiblemente porque no han alcanzado la energía suficiente para cristalizar, esto es, están en fase de cristalización, denominada fase glassi o vitrea), por lo tanto se les realiza un tratamiento térmico.

El equipo empleado para la producción de microesferas de 17 β -Estradiol esta constituido 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 17 β -Estradiol se calienta 6 °C grados por arriba de su punto de fusión).

-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 al producto rociado hacia el sistema colector.

-El sistema colector almacena al producto rociado.

En la figura 8 se muestra el esquema del equipo de rocío-congelación.

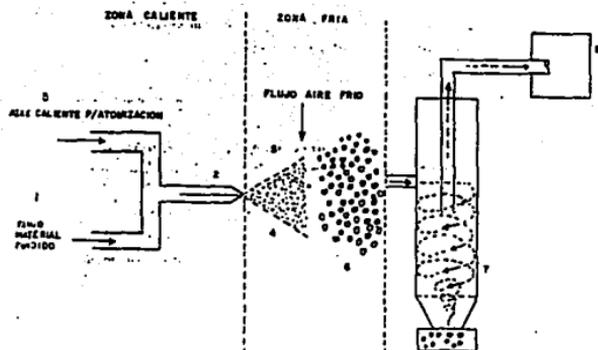


Diagrama del equipo modificado para aplicar la técnica de rocío-congelación. En el diagrama se observa lo siguiente: 1- Flujo de material fundido, 2- Atomizador de material fundido, 3- Flujo de aire caliente para la atomización, 4- Patrón de rocío resultante de la atomización, 5- Interfase entre el rocío de material fundido y el flujo de aire frío, 6- Solidificación de las gotas de rocío, 7- Separador gas-sólido y 8- Filtro de aire.

Figura 8. Esquema del equipo rocío-congelación.

3.3 Análisis Térmico (13, 14)

Durante el proceso de manufactura de las microesferas, por la técnica de rocío-congelación, se lleva a cabo un proceso de fusión y solidificación, por lo que es importante evaluar el comportamiento térmico de las microesferas de 17 β -Estradiol obtenidas, ya que éste es selectivamente interconvertible por acción de la temperatura, y por esta técnica podemos evidenciar las posibles modificaciones cristalinas (polimorfos), por las formas y desplazamientos en los termogramas obtenidos.

El análisis térmico está definido, de acuerdo con la Confederación Internacional (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". 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.

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).

3.3.1 Análisis Térmico Diferencial (DTA) (13, 14)

El análisis térmico diferencial es una técnica en la cual la diferencia de temperatura entre la sustancia y un material de referencia, térmicamente inerte, es medida como una función de la temperatura mientras la sustancia y el material de referencia están sujetos a un programa de temperatura controlada. 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 estas respuestas exotermas y endotermas respectivamente.

3.3.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) (13, 14)

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica en la cual la diferencia en la energía introducida a una sustancia y a un material de referencia es medida como una función de la temperatura mientras la sustancia y el material de referencia, térmicamente inerte, están sujetos a un programa de temperatura controlada.

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

Cuando se analiza una muestra que descompone, no se debe permitir que ésta alcance su temperatura de descomposición ya que ataca a los termopares y platillos. En este caso se utilizan gases inertes como helio y nitrógeno para permitir una homogeneización de la temperatura del horno y ayudar a eliminar las impurezas durante el análisis.

3.4 Polimorfismo (6, 7, 10, 14, 17)

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 este fenómeno y las propiedades del cristal del fármaco.

El polimorfismo es la capacidad de una sustancia para presentarse en forma sólida, amorfa, o en mas de una forma cristalina.

Cuando el medio ambiente de un cristal en crecimiento se altera, la apariencia externa del cristal también se modifica, sin que esto signifique un cambio en la estructura o red cristalina interna; con esto se obtiene un nuevo hábito. Esta alteración o cambio es debida a una interferencia en la disposición normal de las moléculas que cristalizan sobre diferentes superficies del cristal.

Los factores que pueden cambiar el hábito de los cristales son los mismos que pueden cambiar la estructura cristalina u orden interno, por ejemplo: velocidad de enfriamiento, agitación de la solución, tipo de disolvente empleado para la cristalización y la presencia de material extraño a la cristalización.

Por convención las formas polimórficas cristalinas, son designadas por números romanos. La forma I es generalmente la más estable a la temperatura ambiente. Las otras formas son numeradas en orden de 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, siendo la solubilidad una de las propiedades físicas más importantes, ya que ésta afecta directamente la biodisponibilidad.

Métodos para Identificar los Polimorfos (13, 14, 17)

Análisis Térmico: La calorimetría diferencial de barrido y el análisis térmico diferencial miden la pérdida o ganancia de calor resultante de los cambios físicos y químicos de una muestra como función de la temperatura; ejemplos de procesos endotérmicos (absorción de calor), son la fusión, ebullición, sublimación, vaporización, desolvatación, transiciones sólido-sólido y degradación química. La cristalización y la degradación son comúnmente procesos exotérmicos.

Las mediciones cuantitativas de esos procesos tienen mucha aplicación en los estudios de preformulación, incluyendo pureza, polimorfismo, solvatación, degradación y compatibilidad con otros excipientes.

Para caracterizar las formas del cristal, el calor de fusión (HF), puede obtenerse por el área bajo la curva del DSC para la endoterma de fusión.

Difracción de Rayos "X": La difracción de rayos "X" del cristal proporciona la información más completa acerca del estado sólido. Es una prueba rápida y relativamente simple y es el método más común.

Los modelos de difracción de rayos "X" de polvos son únicos para cada forma polimórfica, los materiales amorfos no muestran

cualquier modelo o muestran uno o dos picos anchos atribuibles a la presencia de rangos cortos. La difracción de rayos "X" no siempre indica si el material cristalino es un verdadero polimorfo o un solvato.

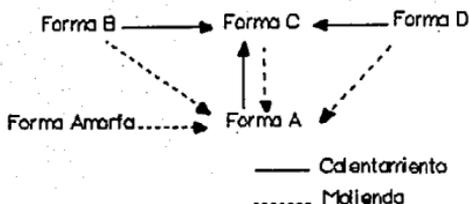
Propiedades del Cristal (p. 18)

Se ha demostrado por espectroscopia de infrarrojo y por patrones de difracción de rayos "X" que el 17 β -Estradiol puede existir en la forma amorfa y en cuatro diferentes formas cristalinas (formas A, B, C y D), estas modificaciones son selectivamente interconvertibles por agitación mecánica y/o por calentamiento.

La propiedad mas común del 17 β -Estradiol es la tendencia a adoptar la forma llamada hemihidratada, en la cual el medio de estos cristales no es principalmente agua, sino que también pudieran ser acetato de etilo, cloroformo, etanol absoluto y otros disolventes libres de agua, atrapados dentro de la red cristalina, durante el proceso de cristalización.

El termograma del análisis térmico diferencial, del hemidrato de 17 β -Estradiol exhibe picos endotérmicos a 112°C y 174°C antes de la endoterma de fusión (179°C); curvas similares han sido obtenidas usando calorimetría diferencial de barrido.

Por espectroscopia al infrarrojo se han identificado cuatro modificaciones cristalinas (Formas de la A a la D) y una amorfa, todas estas transformaciones están sujetas al calentamiento y/o molienda, las cuales se resumen en el siguiente esquema:



Esquema de las Transformaciones del 17β-Estradiol

- Efectos del Polimorfismo y la Influencia en el Espectro Infrarrojo del 17β-Estradiol. «15»

El espectro de absorción infrarrojo de compuestos orgánicos es sensible al estado físico de la substancia analizada y es específico a las modificaciones del cristal. Tales cambios en el espectro son debidos a la influencia de las fuerzas intermoleculares como la fuerza de las vibraciones intramolecular. Esta influencia es particularmente evidenciada en los compuestos con grupos asociados, los cuales proporcionan enlaces hidrógeno. La capacidad de las moléculas de un compuesto para asociarse de manera alterna al enlace hidrógeno de comparable estabilidad, puede ser la mayor causa del polimorfismo, lo que causa diferencias en el espectro del estado sólido de las substancias. La influencia de la constante dieléctrica de los disolventes en la estructura del cristal es bien conocida. La presencia de los dos grupos hidroxilos (uno fenólico y otro alifático) en el 17β-Estradiol, proporciona las condiciones favorables para las diferentes formas del enlace hidrógeno y para las diferentes modificaciones cristalinas.

- Influencia de los Disolventes , Temperatura y Agitación Mecánica en la Preparación de las Cuatro Modificaciones Cristalinas (A, B, C, D) y la Forma Amorfa del 17 β -Estradiol. (15)

-Forma A. Esta forma es obtenida por los siguientes procedimientos:

1. Cristalización del esteroide en acetato de etilo a temperatura ambiente. Las formas B,C,D y la forma amorfa pueden ser convertidas a la forma A por este procedimiento.

2. Molienda de las formas B,C,D y la amorfa.

-Forma B. Esta forma es obtenida por cristalización de las formas A,C o D de una solución de metanol.

-Forma C. Esta forma es obtenida por los siguientes dos procedimientos:

1. Forzando la cristalización en frío del 17 β -Estradiol después de una fusión con una ligera agitación.

2. Exponiendo las formas A,B, o D a una temperatura entre 100°C y el punto de fusión.

-Forma D. Esta forma es obtenida por los siguientes tres métodos:

1. Evaporación con vacío de una solución de 17 β -Estradiol en acetato de etilo a 50 °C.

2. Evaporación de una solución de acetato de etilo del esteroide en una parrilla de calentamiento.

3. Rápido enfriamiento después de una fusión.

-Forma Amorfa. Esta forma es obtenida por los siguientes dos métodos:

1. La fusión de las cuatro modificaciones cristalinas y posterior enfriamiento a temperatura ambiente.

2. Calentando en una pastilla de bromuro de potasio al 17 β -Estradiol a la temperatura de fusión, conteniendo cualquiera de las cuatro formas cristalinas.

El espectro infrarrojo de las diferentes modificaciones cristalinas del 17 β -Estradiol se encuentra representado en la figura 9.

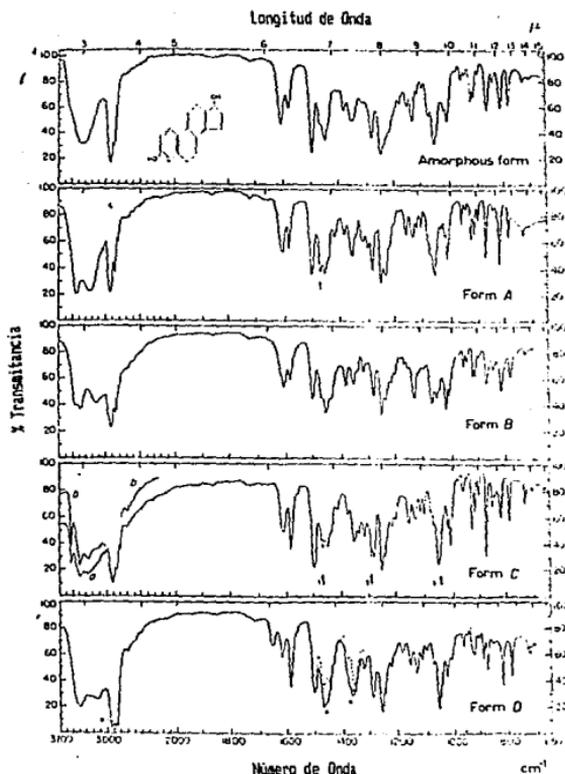


Figura 9. Espectro infrarrojo de las diferentes modificaciones cristalinas del 17 β -Estradiol, utilizando un espectrómetro Perkin-Elmer modelo 21 de doble haz.

Forma Amorfa: Estado vítreo.

Forma A: Cristalización de la forma vítreo en cloruro de sodio. Las flechas indican incremento en la intensidad debida a la orientación.

Forma B: Pastilla de bromuro de potasio.

Forma C: (a) Cristalización de la forma A en cloruro de sodio; las flechas 1 indican la intensidad debida a la orientación; las flechas 2 y 3 indican la disminución de las intensidades debida a la incompleta cristalización. (b) Preparación en nujol.

Forma D: Preparación en nujol; los asteriscos indican las bandas del nujol. Las bandas insertadas en la región del nujol son de la forma D.

Como en el presente trabajo se utilizará una técnica cromatográfica para la cuantificación de las microesferas de 17 β -Estradiol, a continuación se describirán los conceptos básicos referentes a esta técnica.

3.5 Cromatografía (1, 10, 17, 20, 21, 22)

El concepto de cromatografía se utiliza para una gran variedad de técnicas de separación de compuestos, debido a sus diferentes propiedades físicas y químicas. Este proceso dinámico de separación está gobernado por la migración diferencial en un sistema heterogeneo. Generalmente consta de dos fases, una de las cuales es el lecho estacionario (fase estacionaria), de gran área superficial. La otra fase consiste en un gas, líquido ó fluido supercrítico (fase móvil), la cual se mueve continuamente en una dirección y por lo tanto los solutos exhiben diferentes movilidades de acuerdo a su adsorción, partición, solubilidad, presión de vapor, carga iónica y tamaño molecular.

En la cromatografía en columna, la fase móvil puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico y a éste tipo de cromatografía se le denomina cromatografía de líquidos, cromatografía de gases y cromatografía de fluidos supercríticos.

La cromatografía de líquidos según el mecanismo por el cual la muestra se retiene selectivamente, da lugar a cuatro tipos de cromatografía.

- Cromatografía de Líquidos o de Partición

Este tipo de cromatografía involucra una fase estacionaria líquida, la cual puede estar dispersa sobre un soporte inerte o unida químicamente a él, y una fase móvil líquida. El mecanismo de separación se basa en los coeficientes de partición de los solutos en las fases móvil y estacionaria.

Este tipo de cromatografía tiene dos variantes:

1. En fase normal donde la fase estacionaria es polar mientras que la fase móvil es relativamente no polar. Esta se utiliza para la separación de compuestos polares que tienen mayor afinidad por la fase estacionaria polar.

2. Fase inversa en la cual la fase estacionaria es no polar (hidrocarburos) y la fase móvil es polar principalmente mezcla de agua/metanol.

- Cromatografía de Adsorción

El mecanismo de separación se basa en la adsorción, en la cual existe una competencia entre las moléculas de la muestra y las de la fase móvil por ocupar los sitios activos de la superficie de la

fase estacionaria. La fase móvil es líquida y no polar (cloroformo, hexano) principalmente y la fase estacionaria es sólida, la cual puede ser polar (sílica gel o alúmina).

- Cromatografía de Intercambio Iónico

En la cromatografía de intercambio iónico la fase estacionaria consta de una matriz polimérica sobre cuya superficie se han unido químicamente grupos funcionales de tipo iónico, por ejemplo, ácidos carboxílicos o aminas cuaternarias. A medida que la fase móvil pasa sobre la superficie, los solutos iónicos son retenidos por formación de uniones químicas electrostáticas con los grupos funcionales. Las fases móviles que se usan son siempre líquidas. En este tipo de cromatografía existen dos factores importantes que deben tomarse en cuenta para una separación satisfactoria de los componentes, que son la fuerza iónica de la fase móvil y el pH de la misma.

- Cromatografía de Exclusión Molecular.

En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria es una sustancia polimérica que contiene numerosos poros de diferentes tamaños. Los solutos cuyo tamaño molecular es suficientemente pequeño dejan la fase móvil para difundir dentro de los poros, mientras las moléculas más grandes quedan en la fase móvil y no son retenidas. Esta técnica es adecuada para la separación de mezclas en las cuales los solutos varían considerablemente de tamaño molecular.

3.5.1 Parámetros Cromatográficos

3.5.1.1 Tiempo de Retención (t_r)

Es el tiempo que la muestra permanece dentro de la columna y se mide desde el momento en que la muestra se introduce en el sistema hasta el momento en que se obtiene el punto máximo de la señal o pico. El tiempo de retención es característico de la muestra, la columna, la fase móvil y la temperatura.

3.5.1.2 Tiempo Muerto (t_0)

Es el tiempo requerido para eluir una muestra que no es retenida, y se mide desde el momento en que es inyectada hasta el momento en que sale de la columna. Este tiempo muerto nos sirve para calcular el volumen intersticial de la columna.

3.5.1.3 Tiempo de Retención Corregido ($t'r$)

Es la diferencia entre el tiempo de retención y el tiempo muerto, por lo tanto $t'r$ es el tiempo en que la muestra permanece retenida en la fase estacionaria.

$$t'r = t_r - t_o$$

3.5.1.4 Coeficiente de reparto (K)

Es la relación de la cantidad de masa del soluto en la fase móvil y la fase estacionaria. Es una propiedad física fundamental. Es característico del soluto en una fase estacionaria, depende de la temperatura y es una medida de las interacciones soluto-fase estacionaria.

$$K = \frac{\text{Conc. del soluto en f. estacionaria}}{\text{Conc. del soluto en f. móvil}}$$

3.5.1.5 Razón de Fases (β)

Es el cociente de los volúmenes de fase móvil y estacionaria en la columna.

$$\beta = \frac{\text{Vol. de f. móvil}}{\text{Vol. de f. est.}}$$

3.5.1.6 Factor de Capacidad (k')

El factor de capacidad es la relación entre el tiempo que un soluto permanece en la fase estacionaria y la fase móvil. Este factor depende de la naturaleza química y temperatura de las fases líquidas que conforman el sistema. El valor de k' generalmente está entre 0 a 10, valores mayores implican tiempos excesivos de separación.

$$k' = \frac{t'r}{t_o} - 1$$

donde: k' = Factor de capacidad

$t'r$ = Tiempo de retención corregido del soluto

t_o = Tiempo muerto.

3.5.1.7 Numero de Platos Teóricos (N)

Un plato teórico es definido como un equilibrio del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

La eficiencia de la columna se expresa cuantitativamente por el número de platos teóricos.

$$N = 16 \left[\frac{t_r}{w} \right]^2$$

donde :

N = Número de platos teóricos.

t_r = Tiempo de retención del soluto.

w = Ancho del pico por extrapolación a línea base

3.5.1.8 Altura Equivalente a un Plato Teórico (AEPT)

Es la longitud de la columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria.

$$AEPT = \frac{L}{N}$$

3.5.1.9 Factor de Simetría (T)

Se refiere a la simetría del pico. Para un pico simétrico el factor de simetría tiene un valor igual a 1, por lo que a medida que aumenta este valor, la simetría comienza a ser más pronunciada.

$$T = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

donde: $W_{0.05}$ = Ancho del pico al 5% de la altura del pico en centímetros.

f = Se mide trazando una línea perpendicular del vértice a la base del pico, f es la longitud medida desde la línea izquierda del pico hasta la bisectriz del pico al 5% de su altura.

3.5.1.10 Selectividad (α)

La selectividad es una medida de la distribución diferencial de dos compuestos en la fase estacionaria. La selectividad es medida por la separación de los picos de los solutos y depende de los coeficientes de distribución. El óptimo de dicho parámetro debe encontrarse entre un intervalo de 1 a 2.

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

donde:

α = Factor de selectividad
 k'_2 y k'_1 = Factor de capacidad del soluto 1 y 2 respectivamente.

3.5.1.11 Resolución

La resolución es una medida cuantitativa del grado de separación obtenida entre dos compuestos, es decir la separación máxima de los picos eluidos. Se expresa como el cociente entre la distancia de los máximos de los dos picos y el valor medio del ancho del pico en la base.

$$R = \frac{2 (t_{r2} - t_{r1})}{w_2 + w_1}$$

donde: R = Resolución

t_{r1} y t_{r2} = Tiempos de retención de los solutos 1 y 2 respectivamente en minutos.

w_1 y w_2 = Ancho de los picos en minutos.

Se considera que un valor de resolución de 1.5 corresponde a una buena separación, valores mayores indican separaciones excelentes y valores pequeños representan separaciones deficientes.

En la figura 10 se realiza una representación gráfica de los parámetros cromatográficos descritos anteriormente.

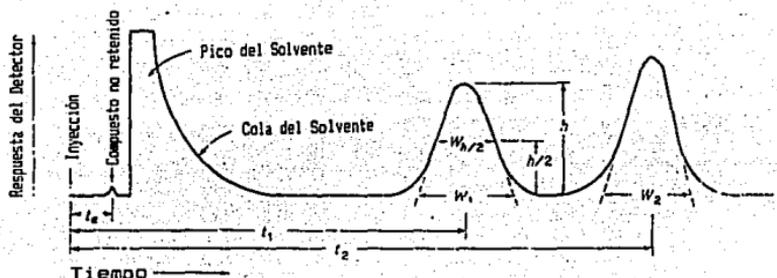


Figura 10. Representación de un cromatograma.

3.5.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

La cromatografía de líquidos de alta resolución es un tipo de cromatografía líquida que se lleva a cabo en columnas de diámetro muy pequeño, rellenas de materiales pulverizados cuyas partículas tienen un tamaño de 3 a 40 micras con una distribución de tamaño no mayor a ± 2 micras. Por lo tanto tienen una alta eficiencia pero una alta resistencia al flujo. Como la cantidad de fase estacionaria es muy pequeña se hace necesario que la cantidad de muestra también lo sea (por lo general menor de 1 mg).

Una característica importante de la CLAR es que las columnas son reutilizables por bastante tiempo y además se cuenta con equipo de detección altamente especializado, que proporciona un registro continuo de la composición del afluente de la columna.

En cuanto a los detectores utilizados en la CLAR, no existe un detector ideal y los que hay disponibles sólo son aplicables para casos particulares. Los más utilizados normalmente son; ultravioleta-visible (de longitud de onda fija o variable o arreglo de fotodiodos), electroquímico, de índice de refracción, fluorescencia y un acoplamiento a un espectrofotómetro de masas.

Como en nuestro estudio el tipo de detector por utilizar es el de arreglo de fotodiodos, a continuación se describirá brevemente.

3.5.2.1 Detector de Arreglo de Fotodiodos. (23, 24)

Es el principio de detección más moderno con que cuenta la cromatografía de líquidos. Tiene un intervalo de longitud de onda desde UV., hasta cerca del IR. Obtiene absorciones UV/VIS simultáneamente por lo que se pueden construir cromatogramas en tres dimensiones (absorbancia vs. tiempo vs. longitud de onda). Ver figura 11.

Utiliza una lámpara de deuterio, la cual emite una luz que pasa a través de un lente y de una abertura (la cual limita la cantidad de luz que penetra al sistema proveniente de la lámpara), y luego entra en la celda. Toda la luz proveniente de la lámpara pasa a través de la celda, y viaja hasta el monocromador de óptica inversa donde es dispersada en todas sus longitudes de onda y es así como llega hasta el arreglo de fotodiodos. Cuando la luz incide sobre los fotodiodos, la energía luminosa para cada longitud de onda no llega a un fotodiodo en particular, sino que éstos están dispuestos en tal forma que sólo reciben la energía luminosa correspondiente a un intervalo pequeño de longitud de onda del total del espectro. Los fotodiodos al recibir la señal luminosa se descargan en una cierta medida, la descarga de los fotodiodos es directamente proporcional a la cantidad de muestra y por lo tanto a la absorbancia.

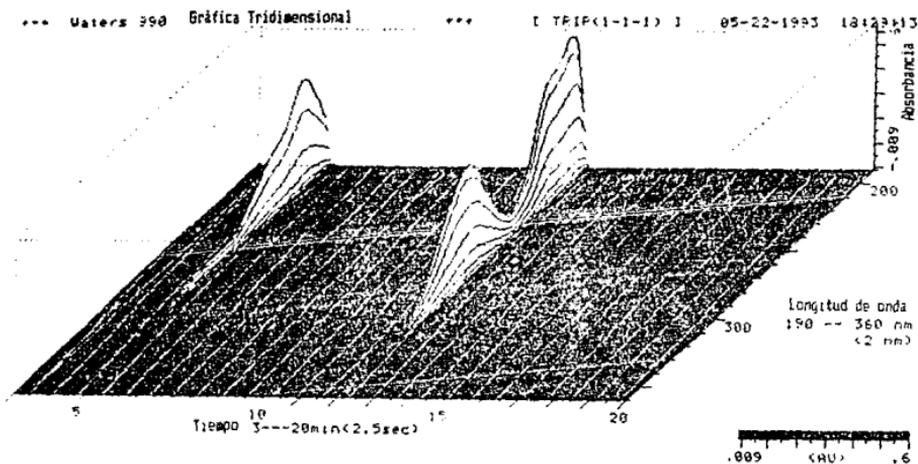


Figura 11. Espectro UV con Detector de Arreglo de Fotodiodos

3.6 Técnica de Reflectancia Difusa (26,27,28,29,30,31)

3.6.1 Generalidades

La reflectancia difusa ha sido desarrollada para el uso en espectroscopia UV/Visible, después se utilizó en la espectroscopia de Infrarrojo. Con la introducción de la espectroscopia de infrarrojo con transformadas de Fourier ésta técnica ha tenido un gran auge.

Las determinaciones realizadas con accesorio de reflectancia difusa al infrarrojo con transformadas de Fourier, permiten a muchas muestras ser analizadas, con pequeñas cantidades o sin ninguna preparación de éstas.

Esta técnica es utilizada comúnmente para polvos, pero también puede ser usada para el análisis directo de superficies rugosas, como papel abrasivo, fibras, etc.

La ventaja de esta técnica es que no se necesita o requiere presión; de ahí la importancia para el análisis de formas

cristalinas (Polimorfos) y que una amplia gama de muestras puedan ser analizadas por esta técnica.

La primera dificultad asociada con las determinaciones con reflectancia difusa, es la distorsión del espectro, causada por la mezcla de los componentes difusos y especulares en la medición de la radiación; realizando una dilución con bromuro de potasio, se reducen las distorsiones espectrales. Otra dificultad, es el bajo nivel de energía reflejada, que ocurre con muestras que absorben fuertemente. Esta baja razón de señal ruido, puede ser superada, incrementando los tiempos de obtención de datos (Tiempo de barrido), o por la utilización de detectores sensibles tales como Mercurio-Cadmio-Telurio (MCT).

3.6.2 Teoría

Un rayo incidente del espectrofotómetro es dirigido sobre la superficie de la muestra y la energía reflejada es colectada. La energía reflejada puede ser clasificada como especular o reflectancia difusa. La reflectancia especular aumenta ya que es reflejada por las partículas que no absorben. La energía la cual penetra en una o más partículas y es recolectada es llamada reflectancia difusa.

La matriz que se utiliza es bromuro de potasio, cloruro de potasio, cloruro de sodio o polvo de diamante, ya que estas sustancias son transparentes al infrarrojo y al diluir con estas favorecen la penetración de los rayos y por lo tanto incrementan la reflexión.

El espectro de reflectancia obtenido es análogo al de transmitancia.

El espectro obtenido por la técnica de reflectancia difusa, algunas veces aparece de forma diferente a un espectro normal de transmisión. La intensidad de los picos a altas longitudes de onda tienden a decrecer en intensidades relativas, comparable con el espectro de transmisión y éstos suelen ser muy agudos. Por esta razón, el espectro es usualmente transformado en unidades de Kubelka-Munk, las cuales compensan estas diferencias y de esta manera puede ser analizado de una manera análoga a un espectro de absorbancia, la cual es lineal a la concentración de la muestra (Ley de Lambert y Beer).

Para el desarrollo del método analítico para cuantificar las microesferas de 17 β -Estradiol (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución), se tomarán como base los criterios de validación de compendios oficiales, tales como los descritos por la USP. XXII.

3.7 Validación (2. 32)

En los últimos años la validación de métodos analíticos ha adquirido gran importancia en la industria farmacéutica. En la actualidad se han desarrollado una serie de procedimientos que permiten validar los métodos.

La FDA (Food and Drug Administration, USA; Administración de Fármacos y Alimentos) define la validación de un método, como la recopilación de un conjunto de datos que permitan asegurar con una confianza razonable que el proceso o método estudiado realizará, aquello que tiene como fin, por medio de una evidencia documentada, y comprobar con esto que el proceso se desarrollará tal como se ha previsto.

La forma de validar un método analítico depende de las necesidades de cada laboratorio, de la aplicación que tenga, de los requerimientos gubernamentales y algunas veces, del criterio del analista que realiza la validación.

En la validación, los parámetros a evaluar son los siguientes:

3.7.1 Especificidad

La especificidad de un método analítico es la capacidad de éste para cuantificar exactamente y de manera exclusiva al (los) principio (s) activo (s) en presencia de componentes presentes en la matriz de la muestra (impurezas, productos de degradación, compuestos relacionados químicamente o ingredientes de la formulación), la especificidad es una medida del grado de interferencia o carencia de la misma al analizar una muestra compleja.

La especificidad es determinada por la comparación de los resultados del análisis de muestras que contengan solamente al (los) principio (s) activo (s), contra muestras que contienen impurezas, ingredientes de la formulación, productos de degradación o de formación; estas últimas no deben interferir en la respuesta del compuesto de interés (no debe haber diferencias en los resultados entre estos dos grupos de muestras).

Cuando las impurezas o productos de degradación o de formación no son conocidos, la especificidad se demuestra obteniendo los principales y más importantes productos de degradación a través de reacciones simuladas y controladas de degradación. Esto se lleva a cabo sometiendo a degradación al (los) principio activo, placebo y formulación; por las vías más comunes como son: hidrólisis ácida y alcalina, oxidación, calor y fotólisis.

3.7.2 Linealidad e Intervalo Lineal

La linealidad de un método analítico se define como la capacidad de obtención de resultados directamente a través de una respuesta, o por medio de una transformación matemática bien definida. Esta respuesta es proporcional a la concentración del principio activo dentro de un intervalo. La linealidad es usualmente expresada en términos de la varianza de la pendiente de la regresión lineal, calculada acorde a una relación matemática establecida, de los resultados obtenidos por el análisis de muestras conteniendo concentraciones variadas del principio activo.

El intervalo lineal de un método analítico se define como el intervalo entre los niveles alto y bajo del principio activo (incluyendo estos niveles), que deben de cumplir con lo establecido para precisión y exactitud.

La linealidad de un método analítico es determinada por tratamientos matemáticos de los resultados obtenidos de las muestras, conteniendo concentraciones del principio activo dentro del intervalo lineal del método. El tratamiento matemático normalmente utilizado es el de la regresión lineal, por el método de mínimos cuadrados, en el cual se establece una proporcionalidad entre la respuesta y la concentración de la muestra y se deben correlacionar de forma lineal, de acuerdo a la ecuación de una recta: $y = mx + b$, donde la pendiente (m), no debe ser estadísticamente diferente de 1, el intercepto (b), no de ser estadísticamente diferente de 0 y el coeficiente de determinación (r^2) ≥ 0.98 . (En algunos casos, para obtener la proporcionalidad entre las respuestas y las concentraciones de la muestra, los datos de la prueba tienen que ser sometidos a transformaciones matemáticas antes de realizar el análisis de regresión).

3.7.3 Exactitud

La exactitud de un método analítico se define como la proximidad de los resultados obtenidos por dicho método con respecto a su valor verdadero, generalmente reportada como desviación o porcentaje de desviación, también es expresada como el porcentaje de recobro en la prueba, de cantidades adicionadas y conocidas del principio activo.

La exactitud de un método analítico se determina al aplicar el método a muestras o mezclas de excipientes conteniendo cantidades del principio activo, cuyas concentraciones se encuentren dentro del intervalo lineal establecido. La exactitud se calcula a partir de los resultados del porcentaje de activo recobrado por el método.

3.7.4 Precisión

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados individuales de prueba, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una

muestra homogénea del producto, usualmente se expresa en términos de desviación estandar o coeficiente de variación. Se puede expresar en términos de repetibilidad o reproducibilidad.

Repetibilidad: Es la precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista (precisión intradía), se evalúa por el coeficiente de variación, que para este caso el criterio establecido deberá ser $\leq 2\%$.

Reproducibilidad: Es la precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas en diferentes días (precisión inter-día e inter-analista), se evalúa por el coeficiente de variación y/o por un modelo estadístico apropiado.

3.7.5 Estabilidad de la Muestra

Es la prueba que determina el tiempo en el cual una muestra preparada y lista para ser analizada, demuestra no haber sufrido alteraciones o cambios significativos, bajo condiciones dadas de almacenamiento. Se determina cuantificando muestras preparadas para su análisis después de un tiempo razonable, almacenadas a diferentes condiciones. Se establece en cuanto tiempo y bajo que condiciones los resultados analíticos no difieren de los efectuados inicialmente. El criterio establecido es que no debe haber más del 2 % de diferencia en la cuantificación de cada una de las muestras, a las condiciones probadas, con respecto al análisis inicial.

3.7.6 Tolerancia del Sistema

Son pruebas que se le realizan al sistema de medición para asegurar así sus óptimas condiciones de operación.

CAPITULO 4

PARTE EXPERIMENTAL

El trabajo se desarrolló en tres partes: la primera correspondiente al estudio espectroscópico (por infrarrojo), la segunda por análisis térmico diferencial y la tercera, el desarrollo de un método por CLAR, de las microesferas de 17 β -Estradiol.

4.1 Reactivos, Material y Equipo

4.1.1 Reactivos

- Sustancia Patrón de Referencia USP: 17 β -Estradiol lote I.
- Materias Primas: 17 β -Estradiol y 17 α -Metiltestosterona.
- Como formulación: Microesferas de 17 β -Estradiol.
- Alúmina Estándar para DTA. Shimadzu Corporation.
- Hidróxido de sodio, grado reactivo ACS. Merck.
- Bromuro de potasio, grado espectroscópico ACS. Merck.
- Acido clorhídrico, grado reactivo ACS. Mallinckrodt.
- Peróxido al 30 %, grado reactivo. Merck.
- Metanol, grado reactivo ACS. Mallinckrodt.
- Acetonitrilo, grado HPLC ACS. Fisher.
- 2-Propanol, grado HPLC ACS. Merck.
- Agua, grado HPLC.
- Agua deuterada.
- Dimetilsulfóxido.

4.1.2 Material

- Crisoles y tapas de aluminio para sellar Shimadzu, modelo P/N 201.53090.
- Pinzas para crisoles de aluminio.
- Pipetas Eppendorf de descarga múltiple.
- Equipo de filtración Millipore.
- Membranas de filtración Millipore tipo GVWP de 0.22 micras.

4.1.3 Equipo

- Calorímetro de barrido diferencial Shimadzu modelo DSC-50.
- Espectrómetro de masas Hewlett Packard modelo 5988A.
- Espectrómetro de resonancia magnética nuclear Varian modelo VXR-3005.
- Espectrómetro infrarrojo Beckman Acculab 10.
- Espectrómetro infrarrojo con Transformadas de Fourier Nicolet 205.
- Espectrofotómetro UV/VIS. Hewlett Packard con arreglo de fotodiodos modelo 8452A.
- Horno programable Fisher Scientific modelo 838F.

- Balanza analítica Mettler AE 260.
Sistema cromatográfico compuesto por:

Bomba

- Bomba Waters modelo 510 y 610 acoplada a un controlador Waters modelo 600 E.

Inyector

- Inyector automático Wisp modelo 712.
- Inyector automático Wisp modelo 712D.
- Inyector automático Satélite Wisp modelo 700.
- Inyector manual Waters modelo U6K.

Dectector

- Detector UV. de longitud de onda variable Waters modelo 481.
- Detector UV. de longitud de onda variable Beckman modelo 163.
- Detector de arreglo de fotodiodos Waters modelo 990.

Integrador

- Integrador Hewlett Packard modelo HP3396A.
- Integrador Waters modelo 740.
- Sistema Waters 990 que consiste en:
 - Hardware: Computadora NEC APC-IV Power Mate-2.
 - Impresora/graficador de alta velocidad Waters 5200.
 - Impresora a color NEC Pinwriter CP6.
 - Software: Waters 990 PAD Millipore 89.

Columna

- Columna Ultrasphere ODS Beckman No. de serie 1UE3090 de 4.6 mm de diámetro interno, 25 cm de longitud, rellena con empaque de partículas de 5 micras de sílica de forma esférica unidas químicamente a una cadena C₁₈.
- Columna μ Bondapack C₁₈ Waters de 3.9 mm de diámetro interno, 30 cm de longitud, rellena con empaque de partículas de 10 micras de sílica de forma irregular unidas químicamente a una cadena C₁₈.

4.2 Condiciones Experimentales

En el presente trabajo los análisis se realizan en forma comparativa, entre una sustancia de referencia (17 β -Estradiol materia prima) y las microesferas elaboradas mediante la técnica de rocío-congelación.

Para tener una sustancia de referencia plenamente identificada para el análisis espectroscópico (espectroscopia al infrarrojo del 17 β -Estradiol), se debe de contar con una técnica adecuada para el propósito del presente estudio, el cual consiste en la caracterización de las diferentes formas cristalinas del 17 β -estradiol y un seguimiento de la estabilidad de las microesferas, ya que éstas al presentar diferentes formas cristalinas durante el proceso de fabricación, con el tiempo (en el presente estudio el tiempo estimado será de un mes a temperatura ambiente), tienden a adoptar la forma más estable, la cual es la forma A (forma hemidratada).

La determinación del espectro se realizó por la técnica de reflectancia difusa, la cual permite analizar muestras directamente o dispersas en soportes sin absorción, y además no necesita compresión, ya que ésta puede modificar la estructura cristalina de la muestra, en el presente trabajo se utiliza bromuro de potasio como agente dispersante ya que es transparente al infrarrojo.

Las condiciones utilizadas para la determinación del espectro son las siguientes:

Se utiliza una ganancia automática, con 200 números de barridos y una sensibilidad de 2 cm^{-1} , realizando un barrido de 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} . Una vez determinado el espectro se analiza.

A continuación se ilustra en las figuras 12(a) y 12(b) el espectro del 17 β -Estradiol determinado, en una dispersión en nujol y en una dispersión en bromuro de potasio respectivamente.

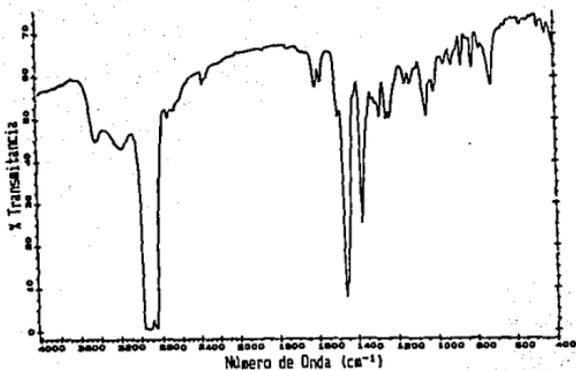


Figura 12(a). Espectro infrarrojo del 17 β -Estradiol en una dispersión en nujol, determinado en un espectrómetro IR. con Transformadas de Fourier, Nicolet 205, utilizando celda para líquidos.

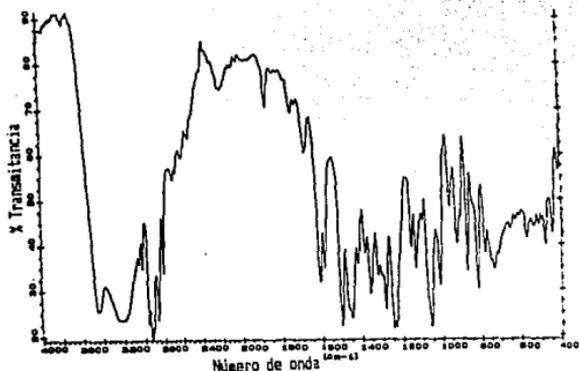


Figura 12(b). Espectro infrarrojo del 17 β -Estradiol en una dispersión en bromuro de potasio, determinado en un espectrómetro IR. con Transformadas de Fourier, Nicolet 205, utilizando accesorio de reflectancia difusa.

Otros métodos empleados en el presente estudio para el control de las microesferas de 17 β -Estradiol, obtenidas bajo el proceso de rocío-congelación son:

Absorción al ultravioleta: La cual nos asegura la integridad estructural de la molécula (conservación de sus grupos cromóforos).

Las condiciones utilizadas para la determinación del espectro de absorción al ultravioleta tanto a la sustancia de referencia de 17 β -Estradiol, como a las microesferas son las siguientes:

Una solución etanólica de concentración de 0.05 mg/mL de la muestra, utilizando una celda de 1 cm de paso óptico, realizando un barrido de 190 nm a 360nm.

Resonancia magnética protónica: En la determinación del espectro de resonancia ^1H , tanto para las microesferas como para la sustancia de referencia de 17 β -Estradiol, se pesan 20 mg de muestra, se disuelven en 3 ml de Dimetilsulfóxido (DMSO) como disolvente y en un experimento posterior se adicionan unas gotas de agua deuterada para evidenciar la presencia de los protones unidos a los heteroátomos, en este caso los grupos O-H, el aromático y el alifático.

La calorimetría de barrido diferencial: Las microesferas y la sustancia de referencia de 17 β -Estradiol se analizan en las mismas condiciones las cuales son las siguientes:

Se pesan de 2 a 3 mg de muestra y alúmina respectivamente por separado, esta última como referencia, utilizándose crisoles cerrados.

Flujo de nitrógeno 30 mL/min, tiempo de muestreo 1 segundo, un intervalo de flujo de calor de 20 mW y utilizando un programa de temperatura de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 200 $^{\circ}\text{C}$. Una vez finalizado, determinar el punto y calor de fusión.

Espectroscopia de masas: Los espectros de masas de las microesferas y de la sustancia de referencia de 17 β -Estradiol, son analizados bajo las mismas condiciones de operación, 1 mg de muestra es sometido a impacto electrónico en un espectrofotómetro de masas.

Cromatografía de líquidos de alta resolución: Para la cuantificación del 17 β -Estradiol, se partió de un método reportado en bibliografía el cual se describe en la USP XXII.

En estudios preliminares no resultó específico ya que no era capaz de separar un producto de degradación (obtenido por el calentamiento del 17 β -Estradiol a 200 $^{\circ}\text{C}$ por 1 hora) de éste. Por lo tanto se modificaron las condiciones cromatográficas de tal manera, para separar el producto de degradación y asegurar la especificidad de la respuesta del 17 β -Estradiol.

Las condiciones cromatográficas establecidas por la USP XXII son las siguientes:

Fase móvil: Acetonitrilo : Agua (55 : 45).

Flujo: 1 mL/min .

Longitud de onda: 205 nm.

Columna: μ Bondapack C_{18} de 30 cm de longitud y 3.9 mm de diámetro interno, con partículas irregulares de 10 micras unidas químicamente a una cadena C_{18} .

Volumen de inyección: 25 μ L.

Modo de integración: Areas.

En la figura 13 se representa el cromatograma del 17 β -Estradiol con las condiciones establecidas por la USP XXII, en presencia de su producto de degradación.

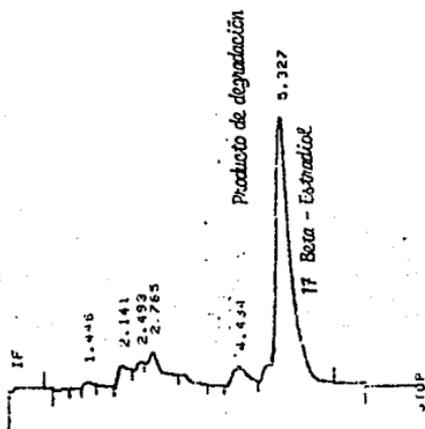


Figura 13. Cromatograma del 17 β -Estradiol (Método USP XXII)

Tomando como base las condiciones cromatográficas descritas por la USP XXII, se modificó la proporción de los componentes de la fase móvil, al no conseguirse una separación adecuada del producto de degradación, se cambió la mezcla del eluyente, en este caso se cambió la selectividad de la fase móvil como también la velocidad de flujo, quedando las condiciones como sigue:

Fase móvil: Acetonitrilo : Agua : 2-Propanol (20 : 60 : 20).
 Flujo: 2 mL/min .
 Longitud de onda: 205 nm.
 Columna: μ Bondapak C_{18} de 30 cm de longitud y 3.9 mm de diámetro interno, con partículas irregulares de 10 micras unidas químicamente a una cadena C_{18} .
 Volumen de inyección: 25 μ L.
 Modo de integración: Areas.

Dando como resultado una buena resolución (separación del producto de degradación del 17 β -Estradiol). En la figura 14 se representa el cromatograma con las condiciones anteriormente mencionadas.

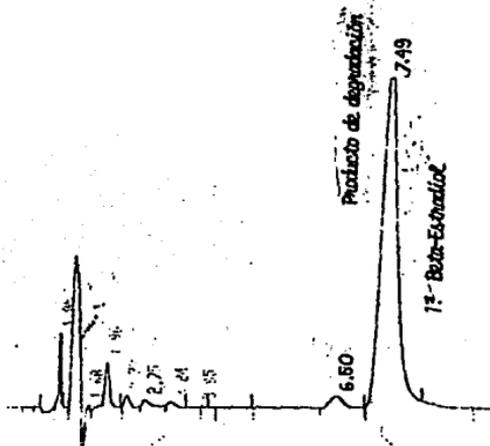


Figura 14. Cromatograma del 17 β -Estradiol (Método propuesto)

Ya que en la formulación de acción controlada, están presentes dos principios activos, 17 β -Estradiol y Progesterona, se modificaron las condiciones cromatográficas de tal manera que se pudieran cuantificar simultáneamente los dos esteroides con una

buena resolución (para utilizar este método en estudios posteriores), tales modificaciones son las siguientes:

Las concentraciones determinadas para este método son de 20 µg/mL para el 17β-Estradiol y 600 µg/mL para la Progesterona.

Se cambió de columna, de una µBondapak C₁₈ con partículas irregulares de 10 micras, a una Ultrasphere ODS con partículas esféricas de 5 micras, consiguiendo así mayor resolución.

Para la selección del estándar interno, se escogió un compuesto que cromatográficamente eluya con un tiempo de retención adecuado, de tal manera que no interfiera con los principios activos, productos de degradación y que se resuelva satisfactoriamente.

Se escogió un compuesto análogo a los principios activos y que cumple con los requisitos antes mencionados, tal compuesto es el 17α-Metiltestosterona, a una concentración de 250 µg/mL.

El modo de integración se cambió de áreas a alturas ya que los esteroides; particularmente el 17β-Estradiol presentan problemas en la integración por áreas, ya que éstos tienden a colarse al final de su elución.

Las condiciones cromatográficas son las siguientes:

Fase móvil: Acetonitrilo : Agua : 2-Propanol (20 : 60: 20).

Flujo: 2 mL/min .

Longitud de onda: 205 nm.

Columna: Ultrasphere ODS de 25 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, con partículas de sílica de forma esférica de 5 micras de tamaño unidas químicamente a una cadena C₁₈.

Volumen de inyección: 20 µL.

Modo de integración: Alturas.

El cromatograma se presenta en la figura 15.

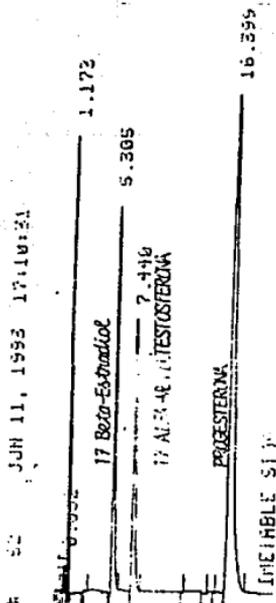


Figura 15. Representación del Cromatograma del Método para la Cuantificación Simultánea del 17 β -Estradiol y Progesterona.

Establecimiento del Método Analítico (CLAR)

El método analítico propuesto para la cuantificación de 17 β -Estradiol (microesferas) es el siguiente:

Solución de Referencia Interna

Preparar una solución metanólica de concentración de 2.5 mg/mL de 17 α -Metiltestosterona.

Preparación de la muestra

Preparar una solución metanólica de la muestra (microesferas), conteniendo 32 μ g/mL de 17 β -Estradiol y 400 μ g/mL de 17 α -Metiltestosterona y comparar con una solución estándar conteniendo las mismas concentraciones, analizadas bajo el siguiente sistema cromatográfico.

Fase móvil: Acetonitrilo : Agua : 2-Propanol (20 : 60 : 20).

Flujo: 2 mL/min.

Longitud de onda: 205 nm.

Columna: Ultrasphere ODS de 25 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, con partículas de sílica de forma esférica de 5 micras de tamaño unidas químicamente a una cadena C₁₈.

Volumen de inyección: 20 μ L.

Modo de integración: Alturas.

4.3 Evaluación del Método Analítico

Para la evaluación del método analítico se tomarán los criterios de validación establecidos por normas oficiales. (2)

4.3.1 Linealidad del Sistema

Se evaluó la linealidad de la relación respuesta (altura del pico cromatográfico), contra la concentración de 17 β -Estradiol, a través del análisis de una solución de 17 β -Estradiol y realizando diluciones para obtener concentraciones de 8.0, 16.0, 24.0, 32.0, 40.0 y 42.0 μ g/mL, equivalentes al 25%, 50%, 75%, 100%, 125% y 150%, de la concentración elegida como 100% (32 μ g/mL). Se realizó por triplicado cada nivel de concentración, exceptuando el 100%, el cual se realizó por sextuplicado.

4.3.2 Precisión del Sistema

Se determinó la precisión del sistema de cuantificación (a través de la altura de los picos cromatográficos), al hacer 6 replicas de una solución de 17 β -Estradiol a la concentración 100 % (32 μ g/mL), preparadas a partir de una solución concentrada; analizándolas bajo las condiciones cromatográficas indicadas en el método.

4.3.3 Especificidad del Método Analítico

Como en el proceso de microesferización se somete a la muestra (17 β -Estradiol) a condiciones altas de temperatura, lo cual puede dar origen a productos de degradación, se debe de contar con un método que asegure la especificidad de la respuesta, por lo tanto se somete a la materia prima (17 β -Estradiol) a condiciones simuladas de degradación por calor.

Además se realizan otras condiciones simuladas de degradación para que en estudios posteriores este método pueda ser utilizado como método indicador de estabilidad.

Debido a que se tiene un sistema cromatográfico adecuado para la cuantificación del 17 β -Estradiol, se procedió a la degradación de éste y la formulación (microesferas). Las condiciones de degradación a las cuales se sometieron las muestras son las siguientes: calor, ácida, básica, oxidación y luz ultravioleta.

En la tabla 7 se ilustran las condiciones y el tiempo de exposición del agente degradante.

Tabla 7. Condiciones Simuladas de Degradación.

MUESTRA	TIPO DE DEGRADACION	TIEMPO DE EXPOSICION
17 β -Estradiol	Acida (60 °C)	42 horas
	Básica (60 °C)	72 horas
	Oxidación (45 °C)	10 horas
	Luz UV.	72 horas
	Calor (200 °C)	1 hora
Microesferas (Formulación)	Acida (60 °C)	42 horas
	Básica (60 °C)	72 horas
	Oxidación (45 °C)	10 horas
	Luz UV.	72 horas
	Calor (200 °C)	1 hora

Una vez establecidas las condiciones de degradación, se procedió a repetirlas para asegurar que el porcentaje degradado se debe exclusivamente a la acción del agente degradante y no por casualidad.

Las muestras degradadas de 17 β -Estradiol y microesferas (Formulación), se inyectaron en el sistema cromatográfico establecido, junto con patrones de referencia de 17 β -Estradiol y microesferas para determinar si algunos de los productos de degradación no interfieren en la respuesta del principio activo.

El análisis de las muestras se realizó utilizando un detector de arreglo de fotodiodos, el cual consistió en el registro de las señales detectadas en la región UV. (195 a 360 nm.) y la longitud de onda de trabajo (205 nm.). Luego se tomaron espectros UV. de diferentes tiempos de elución distribuidos a lo largo del pico de interés y se realizó una sobreposición de cada uno de ellos para establecer la completa identidad del compuesto, esto quiere decir que si el compuesto es puro la sobreposición debe ser completa, si esta no es completa quiere decir que existe un compuesto (posible producto de degradación) que eluye junto con el compuesto de interés, esto no sería posible si la detección se realizara a una sola longitud de onda. Posteriormente se comparan los espectros así obtenidos contra un espectro patrón de referencia, obtenido en las mismas condiciones para definir la pureza e identidad del pico.

4.3.4 Linealidad del Método Analítico

La linealidad del Método analítico se determinó analizando microesferas a los niveles de 60%, 80%, 90%, 100%, 110% y 120% de la cantidad seleccionada como 100% (20 mg para obtener una concentración de 32 $\mu\text{g/mL}$). Posteriormente se evaluó la pendiente, la ordenada al origen, el coeficiente de determinación de la recta

de regresión y la desviación estándar relativa de la relación miligramos adicionados contra miligramos cuantificados.

4.3.5 Precisión

Se realizó un estudio de reproducibilidad, el cual consistió en el análisis por triplicado de una manera independiente de una misma muestra, por dos analistas en el mismo día, realizando un análisis de varianza, utilizando un modelo estadístico jerárquico con dos efectos aleatorios, para evaluar el efecto de una posible interacción (analista - día) sobre la medición de la respuesta y determinar si la respuesta se ve influenciada por alguna interacción analista-día, analista-equipos, columna, reactivo etc.

4.3.6 Exactitud del Método

Para tener confiabilidad en los resultados se determinó la exactitud, utilizando los porcentajes recuperados en todo el intervalo de estudio (exactitud en todo el intervalo) y los del 100% (exactitud al 100%).

4.3.7 Estabilidad de la muestra

Se determinó realizando análisis independientes a 3 muestras, almacenadas durante 24, 48 y 72 horas bajo las siguientes condiciones: Temperatura ambiente en ciclos normales de luz y oscuridad y Refrigeración a 5 °C.

4.3.8 Tolerancia del Sistema

Se investigó la influencia de posibles alteraciones a la fase móvil sobre los parámetros cromatográficos y sobre la cuantificación del 17 β -Estradiol.

Se realizó comparando los resultados de una solución de referencia en cada una de las modificaciones como la cuantificación de tres muestras independientes en cada una de ellas.

Tabla 8. Fases Móviles Utilizadas en el Estudio de Tolerancia.

Proporción de Acetonitrilo: Agua: 2-Propanol	Identificación
20 : 60 : 20	Fase móvil 1
21 : 60 : 19	Fase móvil 2
22 : 60 : 18	Fase móvil 3
18 : 61 : 21	Fase móvil 4
19 : 59 : 22	Fase móvil 5

CAPITULO 5

RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Métodos Espectroscópicos.

Absorción al Ultravioleta.

El espectro de absorción al ultravioleta de una disolución de 17 β -Estradiol sustancia de referencia, presenta los mismos máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda que el obtenido en una disolución similar de microesferas, bajo las mismas condiciones de análisis.

Por lo que se puede concluir que las microesferas obtenidas mediante el proceso de esferización no sufren un cambio significativo que se pueda observar bajo esta técnica de análisis.

Figuras 1. y 2 del anexo I.

Absorción al Infrarrojo.

En bibliografía, tales como compendios oficiales (USP XXII), la determinación del espectro se realiza en una dispersión en nujol, para el propósito del estudio esta técnica no es adecuada, ya que lo que se pretende es caracterizar por esta metodología las posibles modificaciones cristalinas del 17 β -Estradiol obtenidas bajo el proceso de rocío-congelación, y en una dispersión en nujol éste presenta bandas muy intensas y no permite adecuadamente la identificación de cada una de ellas.

El espectro de absorción al infrarrojo de la sustancia de referencia de 17 β -Estradiol presenta la forma polimórfica A. ⁽¹⁵⁾, siendo ésta la forma más estable. Figura 3 del anexo I.

Las microesferas recién elaboradas presentan la forma polimórfica D ⁽¹⁵⁾, cuyas bandas características son: banda de baja intensidad aproximadamente a 1652 cm^{-1} , debida a un hidrógeno enlazado a un grupo carbonilo cuando éste, está sufriendo una vibración de estiramiento, también aparece una banda aproximadamente a 886 cm^{-1} en una región asociada con las olefinas C - H (una vibración de deformación), y las formas de las bandas entre 1200 cm^{-1} y 1000 cm^{-1} . Figura 4 del anexo I.

Como las microesferas así obtenidas (Forma D), resultan ser inestables en el vehículo en el cual van a estar suspendidas, se les realizó un tratamiento térmico, consiguiendo así mayor estabilidad de éstas en el vehículo. Las microesferas así

estabilizadas presentan la forma polimórfica A; pero con bandas características de la forma polimórfica C ⁽¹⁰⁾, las cuales son debidas a las vibraciones de estiramiento y de doblez del enlace O-H libre, las bandas se encuentran aproximadamente a 3525 cm^{-1} y 1046 cm^{-1} respectivamente. Figura 5 del anexo I.

Con el tiempo (aproximadamente un mes) estas microesferas tienden a adoptar la forma más estable, es decir la forma A. Ver figura 6 del anexo I.

Como se puede notar en los resultados el proceso de microsferización favorece la formación de la forma polimórfica D, las cuales al ser inestables en el vehículo donde van a estar suspendidas, son sometidas a un tratamiento térmico, con lo que se pretende proporcionar energía a las partículas y adoptar una forma cristalina más estable, de tal forma que las microesferas así estabilizadas dan origen a una mezcla de las formas A y C, las cuales son estables en el vehículo. Como se mencionó anteriormente, esta mezcla con el tiempo trata de adoptar la forma más estable, lo que se comprueba fácilmente a través de la comparación de los espectros determinados de las microesferas recién estabilizadas y estas mismas después de un mes de almacenamiento a temperatura ambiente.

Por lo tanto la espectroscopia de infrarrojo es una herramienta rápida y sencilla, que nos proporciona mucha información acerca del comportamiento químico de la muestra (17 β -Estradiol), y puede ser utilizada como técnica de rutina por el laboratorio para tener un control de las microesferas elaboradas.

Resonancia Magnética ¹H

El espectro de resonancia de las microesferas no presenta señales inherentes al del 17 β -Estradiol sustancia de referencia, obtenidos bajo las mismas condiciones de operación (20 mg disueltos en DMSO), por lo tanto mediante esta técnica no se observan cambios significativos del 17 β -Estradiol sometido al proceso de microsferización, tanto los desplazamientos químicos como las constantes de acoplamiento (como se ilustran en las figuras 7, 8, 9 y 10 del anexo I), son los mismos. Por esta técnica no podemos observar las diferentes modificaciones cristalinas del 17 β -Estradiol, pero si nos aseguramos de la integridad e identidad de éste.

Espectroscopia de Masas

El espectro de masas del 17 β -Estradiol sustancia de referencia y de las microesferas siguen el mismo patrón de fragmentación, por lo que no le es atribuible una descomposición al 17 β -Estradiol en el proceso de microsferización, esta técnica nos sirve como complementación de los resultados obtenidos por resonancia magnética protónica. Figuras 11. y 12. del anexo I.

5.2 Calorimetría

En el análisis calorimétrico, la sustancia de referencia de 17 β -Estradiol, presenta una endoterma aproximadamente a 104°C, debida a la cantidad de agua de absorción y una posterior endoterma a 179°C, debida al punto de fusión de la muestra. Figura 13 del anexo I.

Las microesferas sin tratar (recién elaboradas), presentan una endoterma aproximadamente a 99°C, debida a la cantidad de agua absorbida durante el proceso de microesferización, además presentan una exoterma aproximadamente a 118°C (exoterma de cristalización) por lo que probablemente parte de la microesfera pasa de un polimorfo a otro o estando en forma vítrea libera energía para adoptar una forma más estable. Posterior a esta exoterma presenta un pequeño hombro antes del punto de fusión aproximadamente a 173°C y la endoterma debida a la fusión aproximadamente a 179.3°C. Figura 14 del anexo I.

Las microesferas tratadas (estabilizadas térmicamente) no presentan la exoterma de cristalización, solamente aparece la endoterma debida a la cantidad de agua absorbida durante el proceso de fabricación y recolección aproximadamente a 104.3°C y una posterior endoterma aproximadamente a 179°C, debida a la fusión.

Como se puede observar el tratamiento térmico, realizado a las microesferas recién elaboradas elimina por completo la exoterma de cristalización dando origen a la forma más estable del 17 β -Estradiol la cual es la forma hemihidratada, (forma polimórfica A). Figura 15 del anexo I.

Mediante esta técnica y por espectroscopia de infrarrojo se observa, que por medio del tratamiento térmico las microesferas tienden a adoptar la forma más estable lo cual es lo que se pretende para la elaboración de la suspensión.

5.3 Evaluación del Método Analítico

5.3.1 Linealidad del Sistema

En la tabla 9. se encuentran los resultados de las respuestas para los diferentes niveles y concentraciones del intervalo lineal de trabajo.

Tabla 9. Respuesta para los Diferentes Niveles y Concentraciones

CONCENTRACION ($\mu\text{g}/\text{mL}$) (X)	NIVEL (%)	RESPUESTA ALTURAS (Y)
8.0	25	172324
8.0	25	171737
8.0	25	171135
16.0	50	342335
16.0	50	344620
16.0	50	337617
24.0	75	517886
24.0	75	516946
24.0	75	510897
32.0	100	687617
32.0	100	687182
32.0	100	676664
32.0	100	684762
32.0	100	683787
32.0	100	677552
40.0	125	856656
40.0	125	847321
40.0	125	852858
48.0	150	1013473
48.0	150	1011440
48.0	150	1011435

LINEALIDAD DEL SISTEMA 17 β -ESTRADIOL

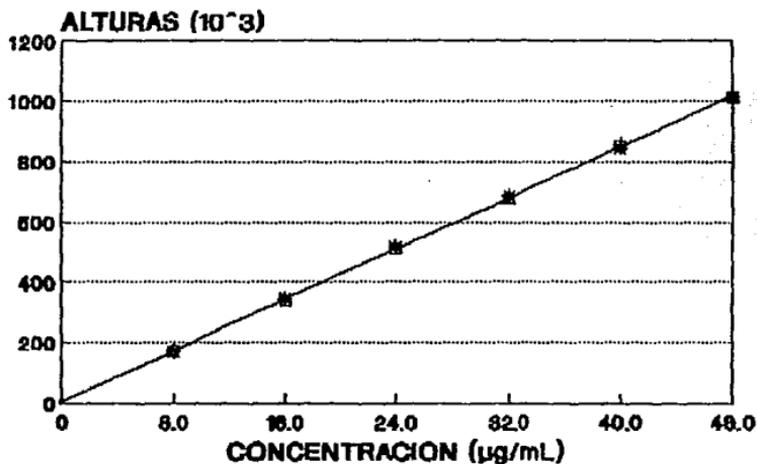


Figura 16. Representación Gráfica de la Regresión Lineal.

Cálculos de la Linealidad del Sistema

$$n = 21$$

$$m = 21086.0289$$

$$\bar{x} = 28.6$$

$$b = 5933.6505$$

$$\bar{y} = 608391.619$$

$$r^2 = 0.9997$$

$$S_{xy} = 4821.76$$

$$S_{x/(r)} = 0.0079$$

$$m_{(r)} = 0.9902$$

$$b_{(r)} = 0.0097$$

Encontrándose la $-0.02 < b_{(r)} < 0.02$, se afirma que la ordenada al origen no es significativamente diferente de cero.

Debido a que la $0.98 < m_{(r)} < 1.02$, se dice que existe una relación proporcional con pendiente aproximada a 1.

Siendo que el $r^2 > 0.98$, se dice que el modelo lineal representa correctamente la relación que existe entre la concentración y la altura en el intervalo de estudio.

Siendo el $S_{(y(r))} < 0.03$ se tiene suficiente evidencia para aceptar la variabilidad encontrada en el intervalo estudiado.

Cálculos de la Precisión del Sistema

$$n = 6$$

$$\bar{x} = 682927.333$$

$$C.V. = 0.69\%$$

Debido a que el coeficiente de variación es menor al 1.5% se establece que el sistema de medición es preciso en las condiciones experimentales.

Con los parámetros anteriormente mencionados es suficiente para asegurar la linealidad y precisión del sistema de medición para la cuantificación del 17 β -Estradiol en concentraciones que van desde 8 $\mu\text{g/mL}$ hasta 48 $\mu\text{g/mL}$ equivalentes al 25% y 150% tomando como 100% la concentración de 32 $\mu\text{g/mL}$.

5.3.2 Especificidad

En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos en los estudios de degradación descritos en la tabla 7.

Tabla 10. Porcentajes de Degradación.

MUESTRA	CONDICION	PORCENTAJE DEGRADADO		MAXIMA DIFERENCIA (%)
		1a.	2a.	
17 β -ESTRADIOL MATERIA PRIMA	Acida	-----	-----	-----
	Básica	-----	-----	-----
	Oxidación	31.50	30.50	1.00
	Luz UV.	-----	-----	-----
	Calor	26.42	26.37	0.05
MICROESFERAS	Acida	-----	-----	-----
	Básica	-----	-----	-----
	Oxidación	23.33	22.88	0.45
	Luz UV.	-----	-----	-----
	Calor	29.52	29.78	-0.26

Se realizó el análisis espectral correspondiente al pico cromatográfico de 17 β -Estradiol, de cada una de las muestras en las cuales se obtuvo degradación. Se realizaron barridos desde 195 nm a 360 nm, el cual abarca toda la zona de absorción del 17 β -Estradiol.

Encontrándose que en condiciones ácidas, básicas y con luz UV., tanto la materia prima como las microesferas no presentan degradación, aún en condiciones drásticas, por lo que no presenta ningún producto de degradación que interfiera en su cuantificación.

En condiciones de oxidación, tanto la materia prima como las microesferas presentan degradación apreciable, pero no encontrán-

dose así ningún producto de degradación que pudiese interferir en su cuantificación. Realizando el análisis espectral para la materia prima (Figuras 16. y 17. del anexo I.) y para las microesferas (Figuras 18. y 19. del anexo I.) se demuestra la especificidad del sistema y esto se ve reforzado con la alta identidad de cada uno de los espectros del 17 β -Estradiol en las muestras anteriores con el de un estándar USP obtenido en las mismas condiciones de análisis, Figura 20. del anexo I., para la materia prima y Figura 21. del anexo I, para las microesferas.

Por acción del calor, tanto la materia prima como las microesferas presentan degradación apreciable, encontrándose dos productos de degradación con tiempos de retención aproximados de 3.5 y 4.8 min., (Figuras 22. y 23. del anexo I.), los cuales no interfieren en la cuantificación. Realizando el análisis espectral para la materia prima (Figuras 24. y 25. del anexo I.) y para las microesferas (Figuras 26. y 27. del anexo I.), además la comparación de cada uno de los espectros del 17 β -Estradiol en las muestras degradadas con el de un estándar USP, se demuestra la especificidad del sistema. Figura 28 del anexo I., para la materia prima y Figura 29 del anexo I., para las microesferas.

Al no encontrarse interferencia en la cuantificación del 17 β -Estradiol, se puede concluir que este método es específico para la cuantificación del 17 β -Estradiol como microesferas, el que junto con los métodos espectroscópicos nos sirve para asegurar así el comportamiento químico del esteroide sometido al proceso de microesferización utilizando la técnica de rocío-congelación.

5.3.3 Linealidad del Método

En la tabla 11. se muestran los porcentos de recobros de las cantidades adicionadas, en cada uno de los niveles en el intervalo lineal.

Tabla 11. Cantidad Recuperada Expresada en Porcentaje.

NIVEL (%)	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% DE RECOBRO
60	12.0	12.1	100.83
60	12.0	11.7	97.50
60	12.0	11.8	98.33
60	12.0	12.1	100.83
60	12.0	11.7	97.50
60	12.0	11.8	98.33
80	16.0	16.0	100.00
80	16.0	16.1	100.63
80	16.0	15.9	99.38
80	16.0	16.1	100.63
80	16.0	16.1	100.63
80	16.0	16.0	100.00
90	18.0	17.6	97.78
90	18.0	17.6	97.78
90	18.0	18.0	100.00
90	18.0	17.6	97.78
90	18.0	17.6	97.78
90	18.0	18.0	100.00
100	20.0	20.0	100.00
100	20.0	19.9	99.50
100	20.0	20.1	100.50
100	20.0	20.0	100.00
100	20.0	20.0	100.00
100	20.0	20.1	100.50
110	22.0	21.7	98.64
110	22.0	21.5	97.73
110	22.0	21.7	98.64
110	22.0	21.8	99.09
110	22.0	21.5	97.73
110	22.0	21.8	99.09
120	24.0	24.0	100.00
120	24.0	23.9	99.58
120	24.0	23.9	99.58
120	24.0	24.0	100.00
120	24.0	23.3	97.08
120	24.0	23.9	99.58

LINEALIDAD DEL METODO 17 β -ESTRADIOL

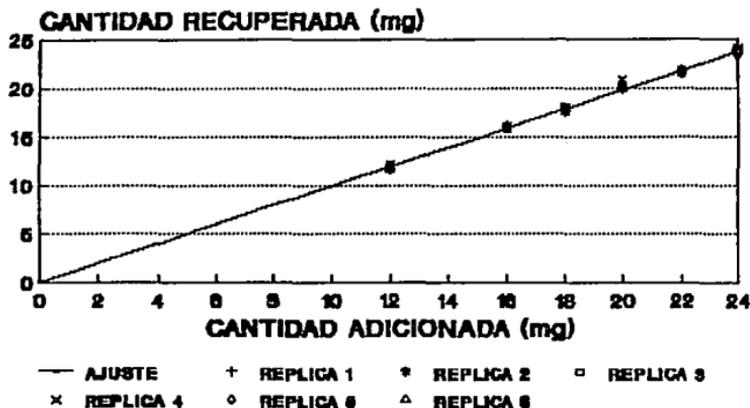


Figura 17. Representación Gráfica de la Regresión lineal.

Cálculos de la linealidad del Método

$n = 36$	$r^2 = 0.9973$
$m = 0.9893$	$b = 0.0583$
$LSIC_a = 1.0073$	$LSIC_b = 0.4022$
$LIIC_a = 0.9713$	$LIIC_b = -0.02856$
$t_{cal.} = -1.214$	$t_{cal.} = 0.346$
$t_{\text{tab.}, 34 \text{ gl.}} = 2.042$	$t_{\text{tab.}, 34 \text{ gl.}} = 2.042$
$S_{x/y} = 0.2089$	$S_{x/y(r)} = 0.0113$

Siendo el r^2 mayor a 0.98 se establece que más del 98% de la variabilidad es explicada por la recta ajustada, por lo tanto la relación entre la cantidad adicionada y la cantidad cuantificada es representada por la función de la línea recta propuesta.

Debido a que $t_{\text{cal.}} < t_{\text{tab.}, 34 \text{ gl.}}$ para la pendiente y que en el intervalo de confianza está incluido el 1, es evidencia suficiente para establecer que la pendiente no es significativamente diferente de 1.

Debido a que $t_{\text{cal.}} < t_{\text{tab.}, 34 \text{ gl.}}$ para la ordenada al origen y que en el intervalo de confianza está incluido el cero, es evidencia suficiente para establecer que la ordenada al origen no es significativamente diferente de cero.

Siendo que $S_{x/y(r)}$ es menor a 0.03 se acepta la variabilidad en todo el intervalo estudiado.

Por los criterios anteriores se considera el método lineal a cantidades comprendidas en el intervalo estudiado.

Cálculos de la Exactitud del Método

$n = 36$ $\bar{x} = 99.25$ CV. = 1.15%

Exactitud al 100%

$n = 6$ $\bar{x} = 100.08$ CV. = 0.37%

LSIC = 100.48 LIIC = 99.68 $t_{\text{cal.}} = 0.090$

$t_{\text{tab.}, 5 \text{ gl.}} = 2.571$

Al ser $t_{\text{cal.}} < t_{\text{tab.}, 5 \text{ gl.}}$ en el nivel del 100% y la media de los recobros, tanto al 100% como en todo el intervalo de estudio se encuentra dentro del rango de 98% a 102% y además de ser el coeficiente de variación menor al 2%, en ambos casos se considera al método exacto y repetible, para la cuantificación de las microesferas de 17 β -Estradiol.

5.3.4 Precisión

En la tabla 12 se representan los resultados de los porcentajes recuperados, de los dos analistas en los dos días.

Tabla 12. porcentajes de recuperación.

		ANALISTA	
		1	2
D	1	99.00	99.50
		98.99	101.48
I	2	98.99	99.00
		98.49	100.49
A		98.99	99.50

$n = 12$

$\bar{x} = 99.41$

$S = 0.8357$

$CV = 0.84\%$

En la tabla 13 se presentan los resultados del análisis de varianza, de acuerdo al punto 4.3.5.

Tabla 13. Tabla de Análisis de la Varianza.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F cal.	F teo.
Analista	1	3.5425	3.5425	19.41	161.4
Días	2	0.5208	0.2604	1.43	199.5
Anal./Día	1	0.1825	0.1825	0.42	5.32
Error	8	3.4371	0.4296	0.43	

Se utilizó el modelo estadístico jerárquico con dos efectos aleatorios.

Siendo el coeficiente de variación menor al 2%, para los recobros obtenidos por los dos analistas en los diferentes días, y además de obtenerse en el análisis de la varianza que F_{cal} menor que la $F_{teo. 95\%}$ para evaluar el efecto "analista", el efecto "días" y el

efecto "analista/día" , se considera al método preciso y reproducible por cualquier analista en cualquier día, lo cual quiere decir que el resultado no está condicionado por el analista ni por el día, en el cual se efectúe el análisis.

5.3.5 Estabilidad de la Muestra

A continuación se presentan los resultados del estudio de estabilidad, descrito en el punto 4.3.7.

Tabla 14. *Tiempo inicial*

MUESTRA	% CUANTIFICADO
1	99.02
2	99.02
3	98.53

Tabla 15. *24 horas*

MUESTRA	CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO		
	AMBIENTE	OBSCURIDAD	REFRIGERACION
1	100.00 %	99.51 %	99.51 %
2	99.02 %	99.02 %	99.02 %
3	98.53 %	99.02 %	98.04 %

Tabla 16. *48 horas*

MUESTRA	CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO		
	AMBIENTE	OBSCURIDAD	REFRIGERACION
1	99.51 %	99.51 %	99.51 %
2	99.02 %	99.02 %	99.02 %
3	98.53 %	98.53 %	98.53 %

Tabla 17. 72 horas

MUESTRA	CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO		
	AMBIENTE	OBSCURIDAD	REFRIGERACION
1	99.51 %	99.51 %	99.02 %
2	99.02 %	99.51 %	99.53 %
3	98.53 %	99.53 %	98.53 %

En ninguna de las condiciones probadas el porcentaje cuantificado no difiere más del 2% con respecto al porcentaje cuantificado al tiempo inicial, por lo que se considera que las muestras de 17 β -Estradiol son estables bajo estas condiciones de estudio, o sea que hasta 72 horas las muestras pueden ser analizadas y sus resultados ser confiables.

5.3.6 Tolerancia del Sistema

A continuación se presentan los resultados del estudio de tolerancia del sistema descritos en el punto 4.3.8.

Tabla 18. Parámetros Cromatográficos y Porcentaje Cuantificado del 17 β -Estradiol en cada una de las Fases Móviles Empleadas.

FASE MOVIL	MUESTRA	N	α	T	k'	R	% CUANT.
1	17 β -EST.	2080.07	0.68	1.75	4.78	3.91	99.83
	17 α -MET.	2349.32	1.00	1.84	7.08		
2	17 β -EST.	2017.82	0.67	1.73	4.46	3.78	98.99
	17 α -MET.	2223.66	1.00	1.70	6.63		
3	17 β -EST.	2314.71	0.68	1.64	4.75	4.27	98.50
	17 α -MET.	2713.37	1.00	1.97	7.10		
4	17 β -EST.	2364.73	0.68	1.76	5.20	4.15	98.33
	17 α -MET.	2623.14	1.00	1.78	7.67		
5	17 β -EST.	1717.90	0.68	1.67	3.90	3.42	99.16
	17 α -MET.	2073.05	1.00	1.92	5.71		

Debido a que los parámetros cromatográficos no se comprometen con los resultados, se considera que el sistema es adecuado y tolerable en las condiciones probadas, por lo tanto, al tener un pequeño error al momento de preparar la fase móvil, los resultados obtenidos son confiables.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

- Las formas polimórficas A, C y D obtenidas en el desarrollo de la formulación, pueden ser plenamente identificadas y evidenciadas por espectroscopía infrarrojo, utilizando accesorio de reflectancia difusa.
- Por esta misma técnica se puede seguir la estabilidad cristalina del 17 β -Estradiol durante el tratamiento térmico, ya que presenta bandas muy características dependiendo de la forma cristalina.
- Dicha técnica es fácil y reproducible por lo que se puede utilizar como análisis de rutina en el laboratorio como control en el proceso de microesferización.
- La calorimetría diferencial de barrido es otra técnica que permite caracterizar cada una de las modificaciones cristalinas del 17 β -Estradiol originadas por el proceso de microesferización y posterior estabilización. Con esta técnica se observa, al igual que la espectroscopía de infrarrojo, como las microesferas al ser sometidas a un tratamiento térmico tienden a estabilizarse (esto es, tratan de adoptar la forma más estable), que es lo que se pretende para la elaboración de la formulación.
- Las otras técnicas empleadas en el presente estudio sirvieron para asegurar la integridad de la molécula, después de ser sometida al proceso de microesferización.
- La técnica de absorción al ultravioleta se puede utilizar como método de rutina de laboratorio, caso contrario de la resonancia magnética protónica y de la espectroscopía de masas, que resultan ser técnicas más especializadas y además caras.
- Una de las técnicas más confiables para la determinación del polimorfismo es la difracción de rayos "X", pero ésta resulta ser bastante costosa como para implementarse como método de rutina y además es una técnica muy especializada.
- El método cromatográfico desarrollado para la cuantificación de 17 β -Estradiol resultó ser exacto, preciso y específico, que son los tres parámetros más importantes para el presente estudio.
- Este método cromatográfico desarrollado puede tomarse como base para la cuantificación simultánea de Progesterona y 17 β -Estradiol, que son los principios activos presentes en la suspensión de acción controlada.

- La determinación de la especificidad del método permitirá que éste pueda ser tomado como base para el desarrollo de un método indicador de estabilidad para la suspensión de acción controlada.

- Este método desarrollado para cuantificar 17 β -Estradiol, puede ser utilizado como método de rutina de laboratorio, por ser fácil y económico.

ANEXO I. LISTA DE GRAFICAS

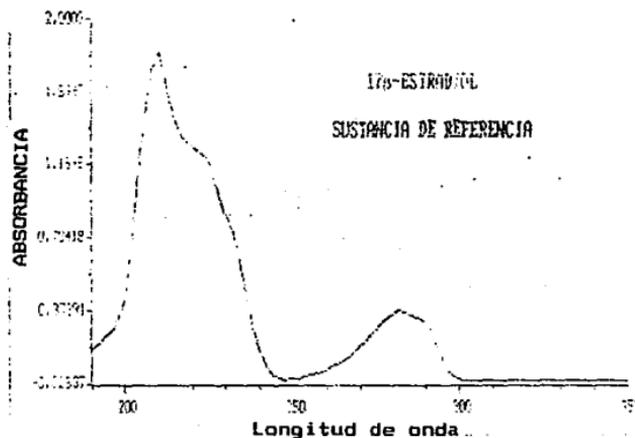


Figura 1. Espectro de absorción ultravioleta del 17β-Estradiol obtenido en un Espectrofotómetro UV/VIS Hewlett Packard con arreglo de fotodiodos modelo B452A, utilizando una celda de 1 cm de paso óptico, a una concentración de 0.05 mg/ml de 17β-Estradiol en etanol, haciendo un barrido desde 190 nm a 350 nm.

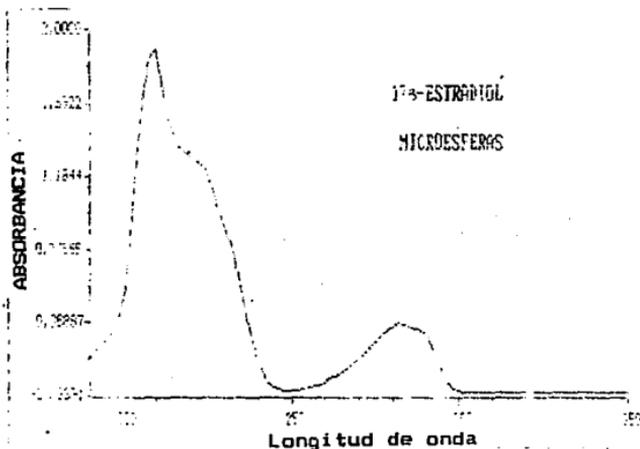


Figura 2. Espectro de absorción ultravioleta de las microesferas de 17β-Estradiol obtenido en un Espectrofotómetro UV/VIS Hewlett Packard con arreglo de fotodiodos modelo B452A, utilizando una celda de 1 cm de paso óptico, a una concentración de 0.05 mg/ml en etanol, haciendo un barrido desde 190 nm a 350 nm.

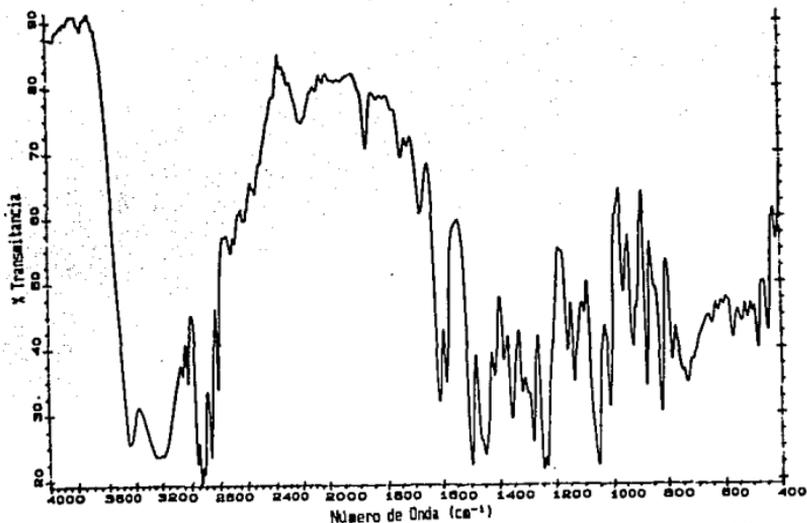


Figura 3. Espectro de infrarrojo del 17 β -Estradiol materia prima (forma polimórfica A), obtenido en un Espectrómetro IR. con Transformadas de Fourier Nicolet 205, de una dispersión de 17 β -Estradiol en bromuro de potasio, utilizando una celda de reflectancia difusa y realizando un barrido desde 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} .

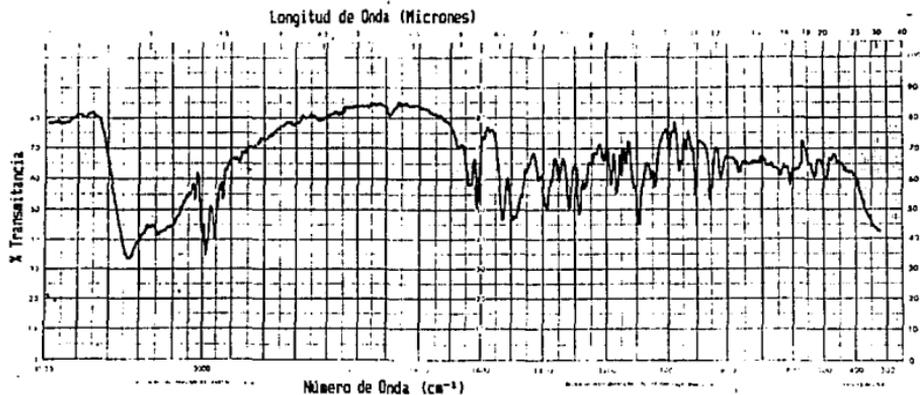


Figura 4. Espectro de infrarrojo de las microsferas recién elaboradas de 17 β -Estradiol (forma polimórfica D), obtenido en un Espectrómetro infrarrojo Beckman Acculab 10, de una dispersión de las microsferas en bromuro de potasio, y realizando un barrido desde 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} .

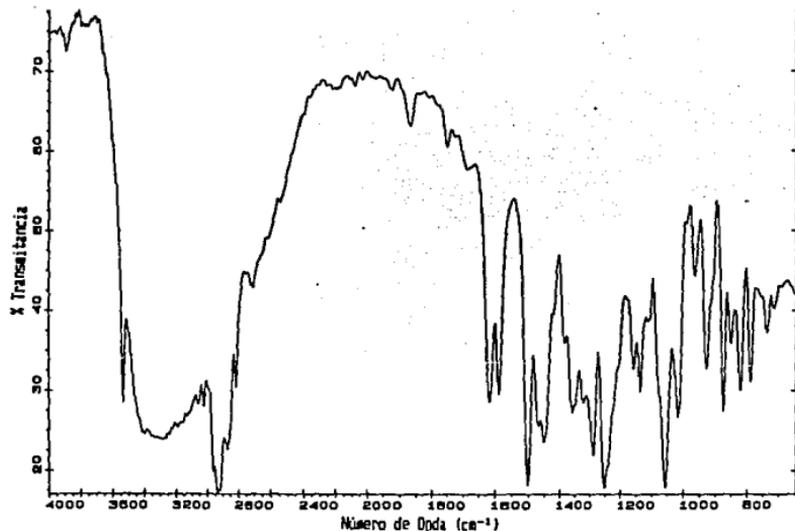


Figura 5. Espectro de infrarrojo de las microesferas tratadas termicamente de 17 β -Estradiol (mezcla de las formas polimórficas A Y C), obtenido en un Espectrómetro IR, con Transformadas de Fourier Nicolet 205, de una dispersión de las microesferas en bromuro de potasio, utilizando una celda de reflectancia difusa y realizando un barrido desde 4000 cm⁻¹ a 650 cm⁻¹.

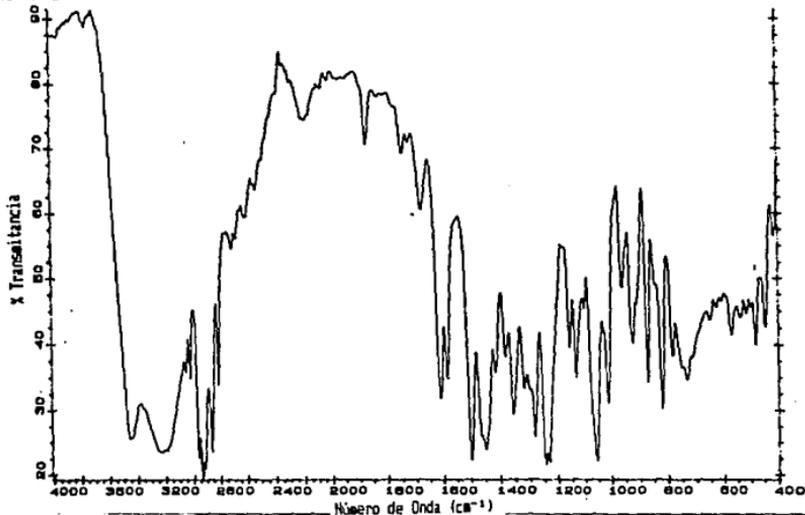


Figura 6. Espectro de infrarrojo de las microesferas de 17 β -Estradiol, tratadas termicamente y almacenadas durante un mes a temperatura ambiente. Obtenido en un Espectrómetro IR, con Transformadas de Fourier Nicolet 205, de una dispersión de las microesferas en bromuro de potasio, utilizando una celda de reflectancia difusa y realizando un barrido desde 4000 cm⁻¹ a 650 cm⁻¹.

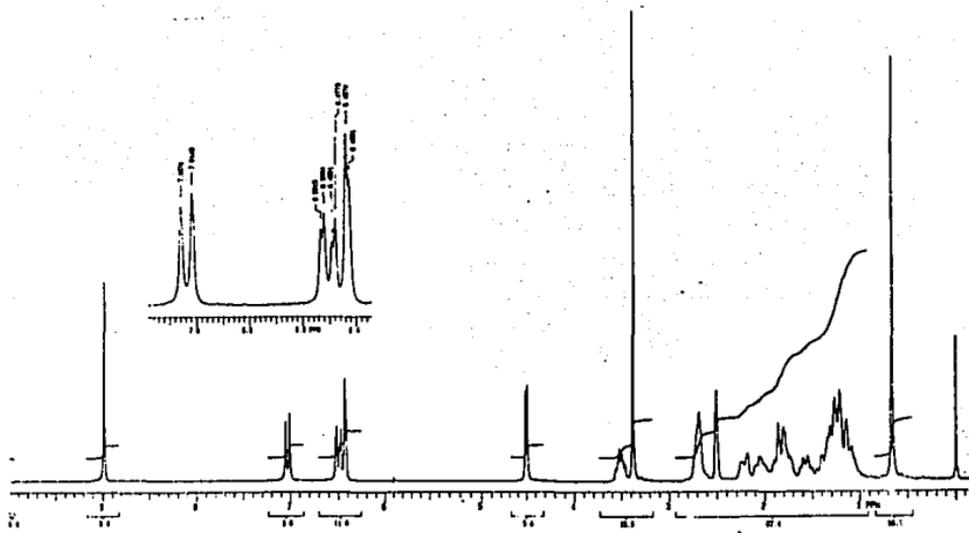


Figura 9. Espectro de ^1H de las microsferas de 17 β -Estradiol, obtenido en un Espectrómetro de resonancia magnética Varian modelo VXR-3005. Utilizando DMSO como disolvente y TMS como referencia interna.

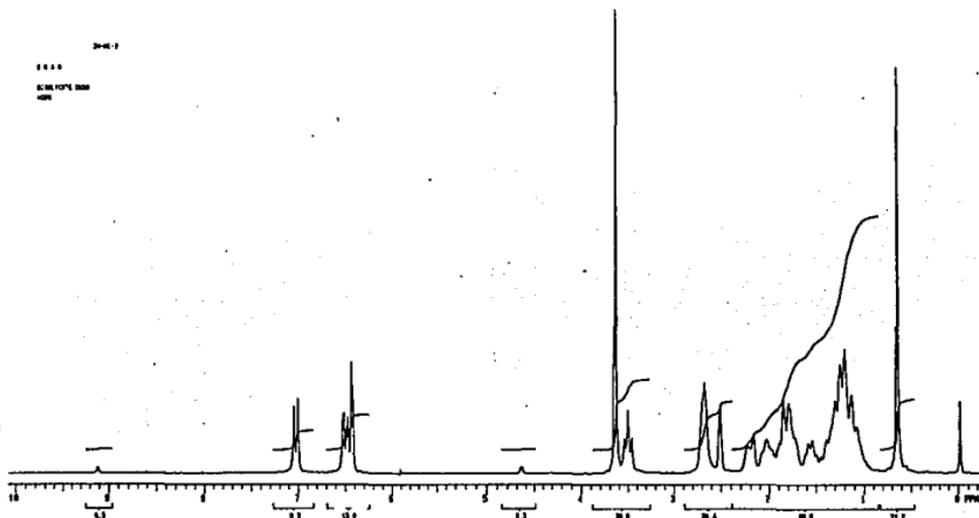


Figura 10. Espectro de ^1H de las microsferas de 17 β -Estradiol, obtenido en un Espectrómetro de resonancia magnética Varian modelo VXR-3005. Utilizando DMSO como disolvente mas agua dueuterada y TMS como referencia interna.

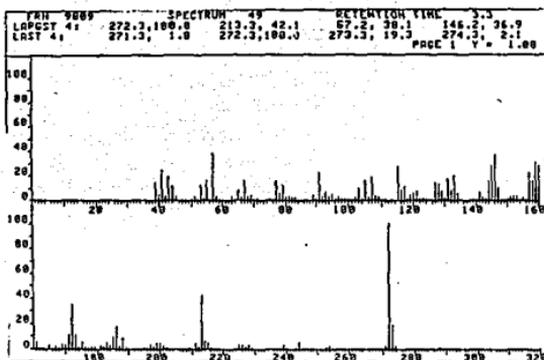


Figura 11. Espectro de masas del 17 β -Estradiol materia prima, obtenido en un espectrómetro de masas Hewlett Packard modelo 5988A.

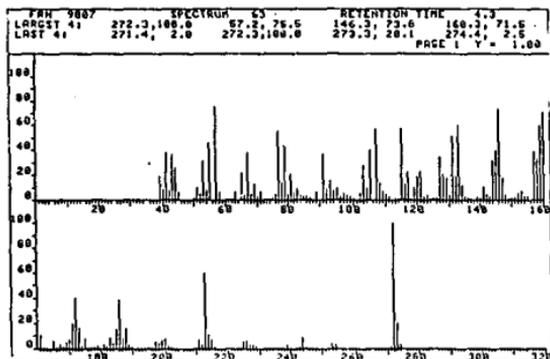


Figura 11. Espectro de masas de las microesferas de 17 β -Estradiol, obtenido en un espectrómetro de masas Hewlett Packard modelo 5988A.

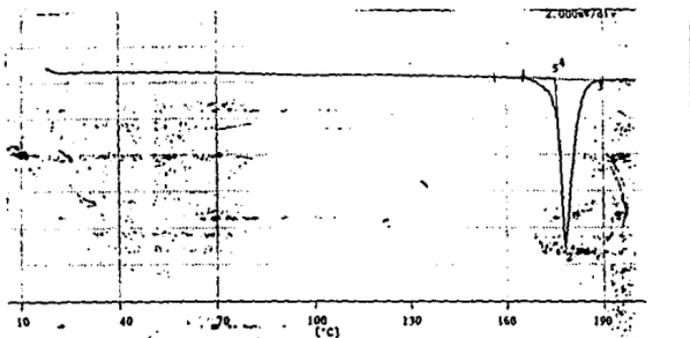


Figura 13. Termograma del 17β-Estradiol materia prima, obtenido en un calorímetro Shimadzu modelo DSC-

30.

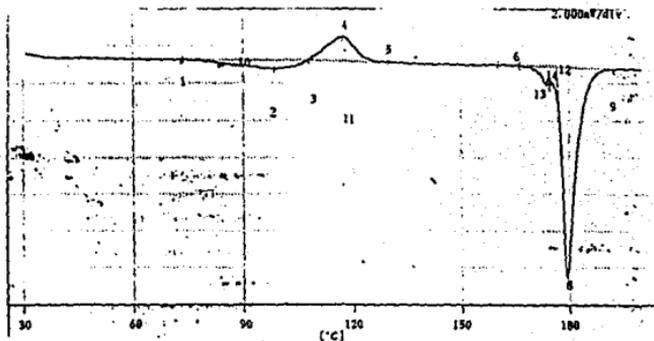


Figura 14. Termograma de las microesferas recién elaboradas de 17β-Estradiol materia prima, obtenido en un calorímetro Shimadzu modelo DSC-50.

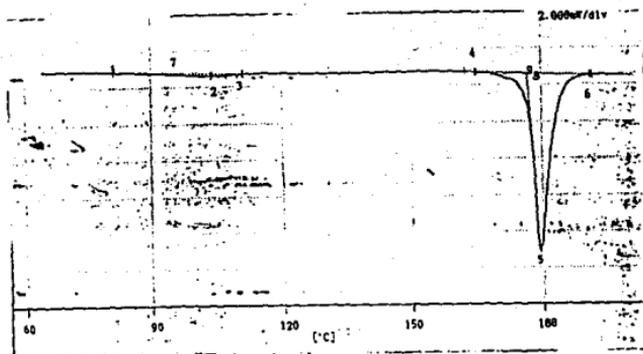


Figura 15, Termografía de las microsferas de 17 β -Estradiol tratadas térmicamente, obtenido en un calorímetro Shimadzu modelo DSC-50.

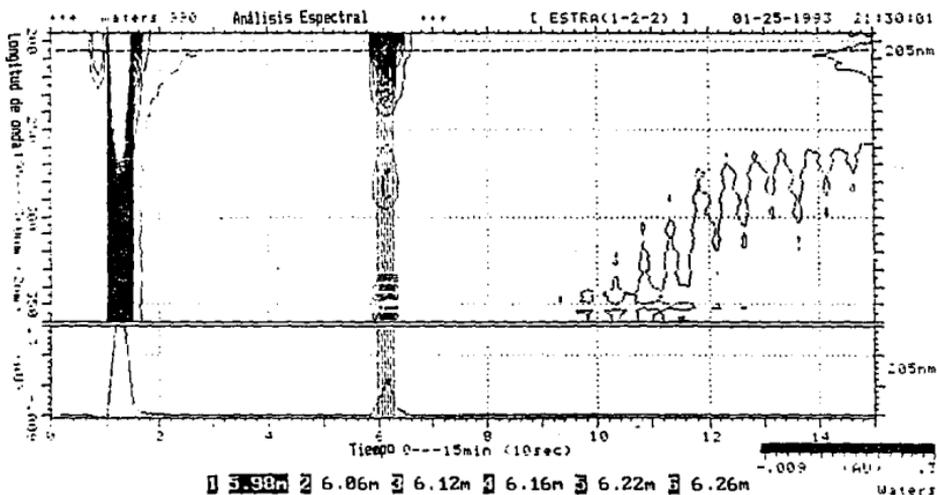


Figura 16, Análisis de contorno del 17 β -Estradiol materia prima, sometida a condiciones de degradación oxidativa.

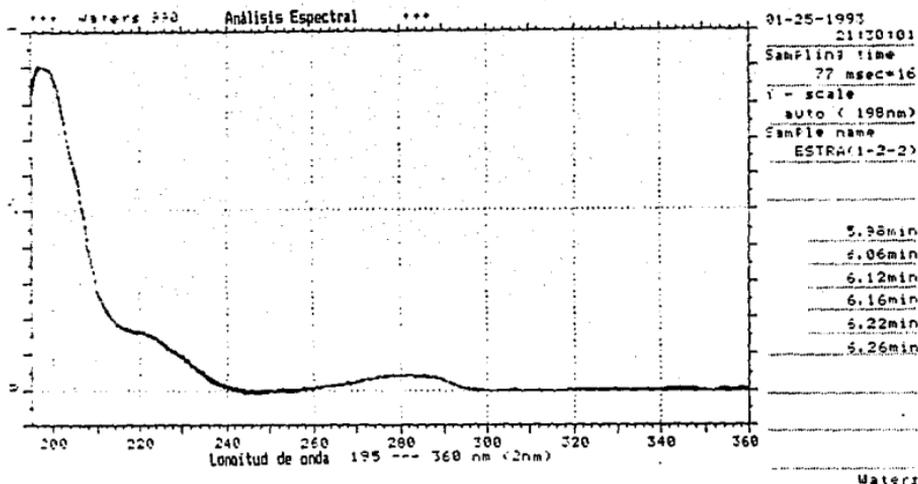


Figura 17. Sobreposición de los espectros del 17 β -Estradiol materia prima, correspondientes a cada uno de los tiempos de elución seleccionados en el cromatograma anterior (Figura 16).

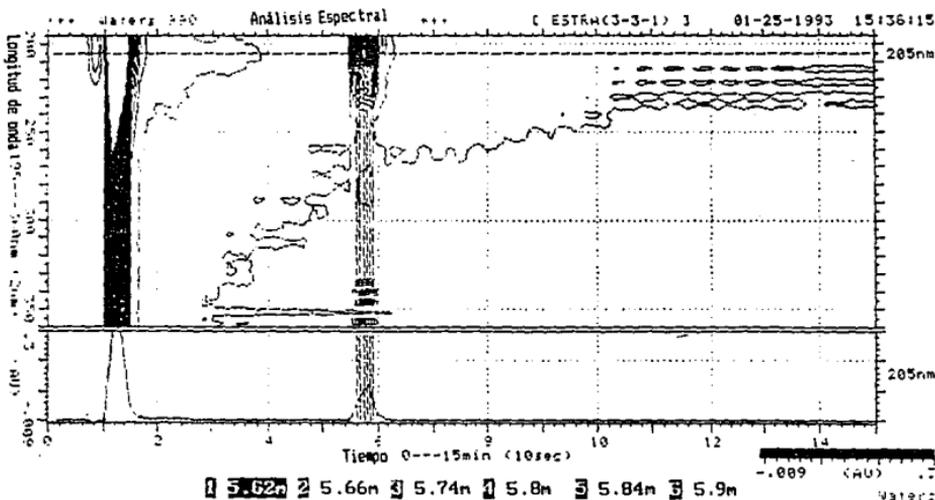


Figura 18. Análisis de contorno de las microesferas de 17 β -Estradiol, sometidas a condiciones de degradación oxidativa.

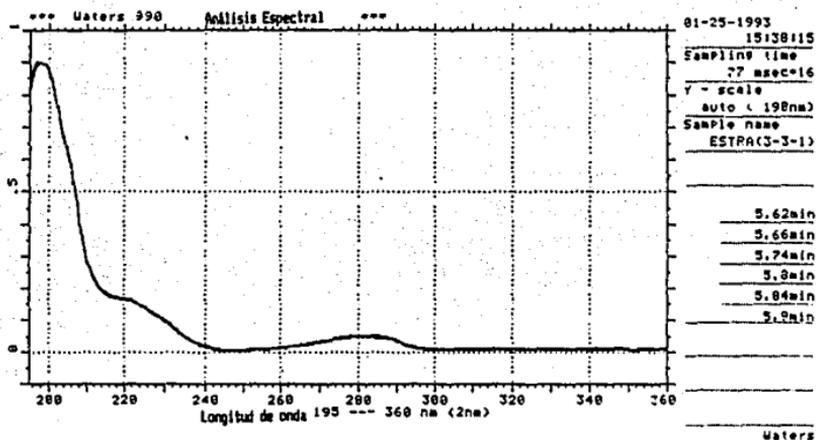


Figura 19. Sobreposición de los espectros de las microesferas de 17 β -Estradiol, correspondientes a cada uno de los tiempos de elución seleccionados en el cromatograma anterior (Figura 18).

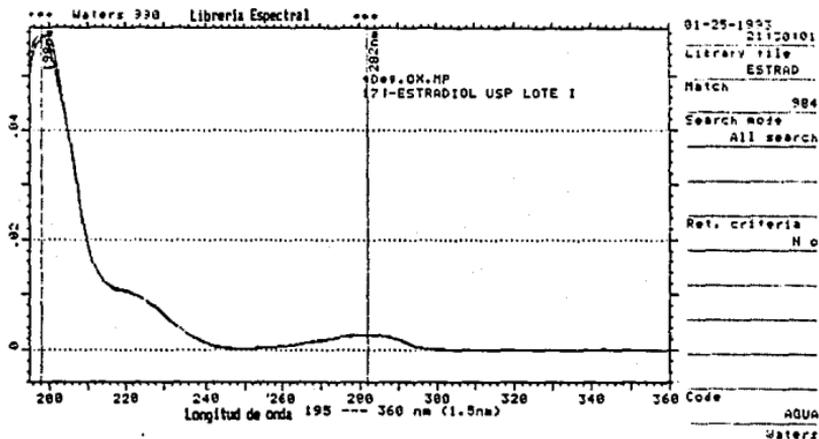


Figura 20. Comparación de espectros del 17 β -Estradiol estándar USP y 17 β -Estradiol materia prima sometida a condiciones de degradación oxidativa.

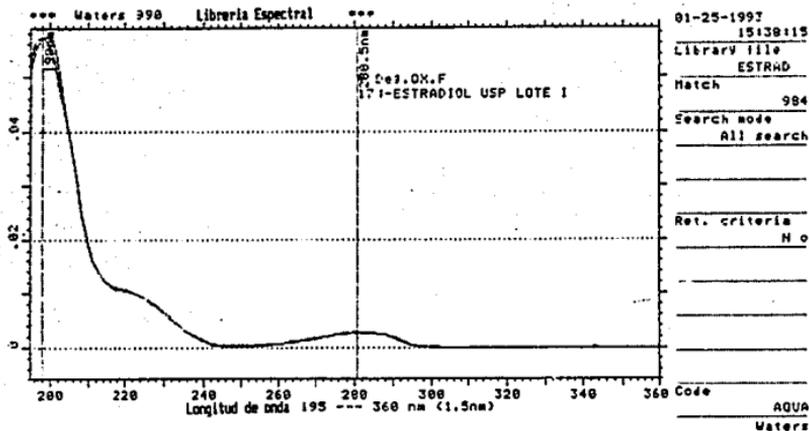


Figura 21. Comparación de espectros del 17 β -Estradiol estéril USP y de las microheterogéneas de 17 β -Estradiol sometidas a condiciones de degradación oxidativa.

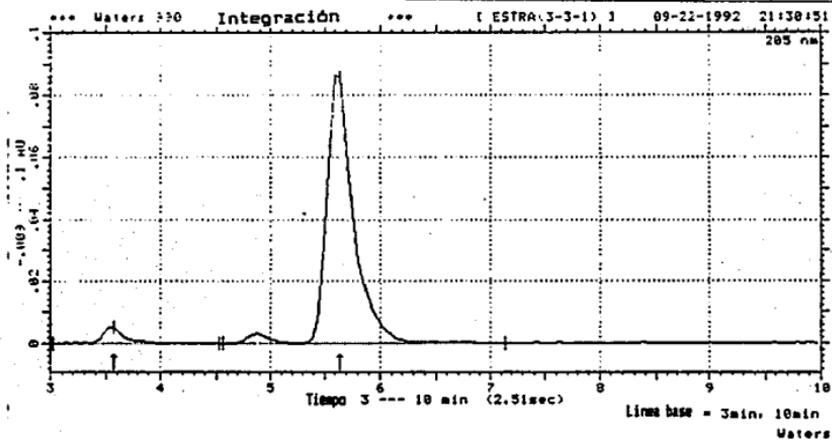


Figura 22. Cromatograma del 17 β -Estradiol materia prima, sometida a condiciones de degradación por calor.

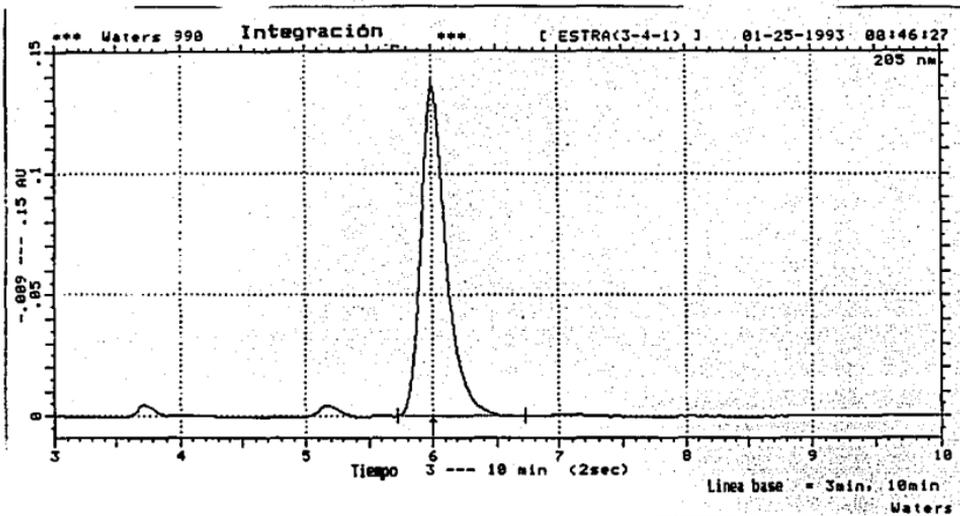


Figura 23. Cromatograma de las microesferas de 17 β -Estradiol, sometidas a condiciones de degradación por calor.

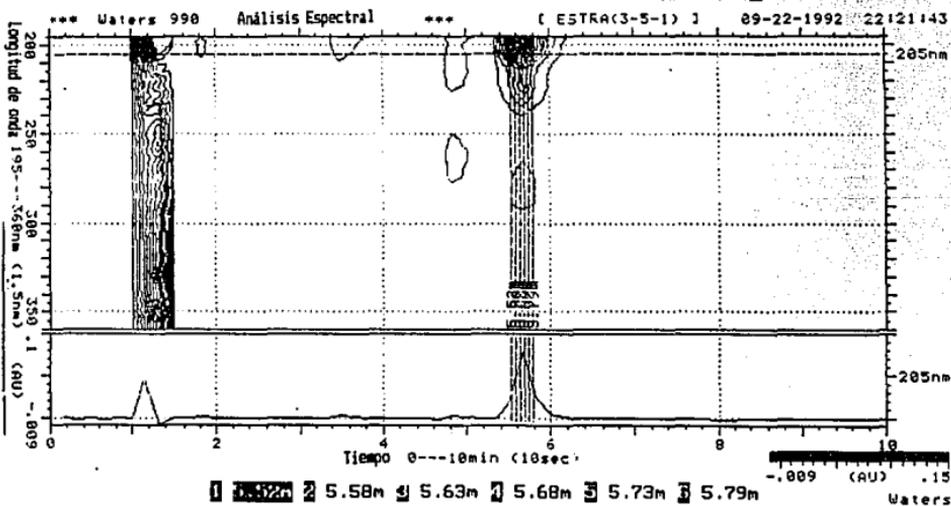


Figura 24. Análisis de contorno del 17 β -Estradiol materia prima, sometida a condiciones de degradación por calor.

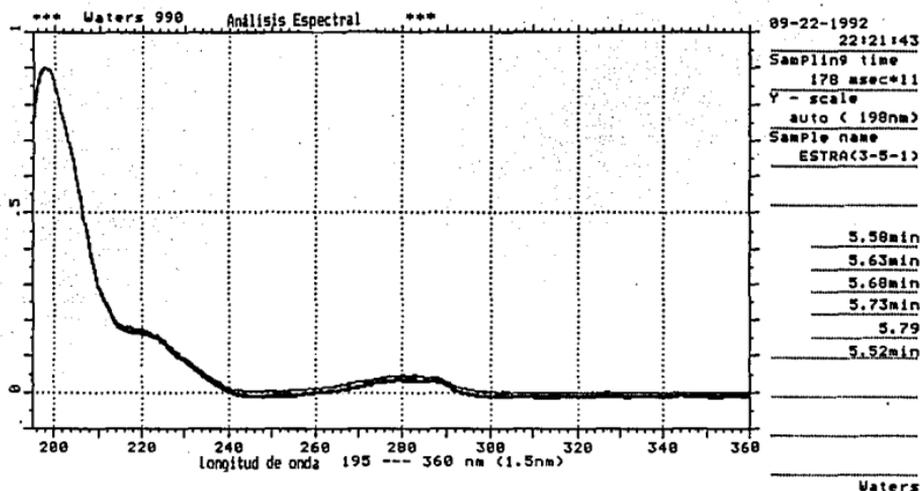


Figura 25. Sobreposición de los espectros del 17 β -Estradiol materia prima, correspondientes a cada uno de los tiempos de elución seleccionados en el cromatograma anterior (Figura 24).

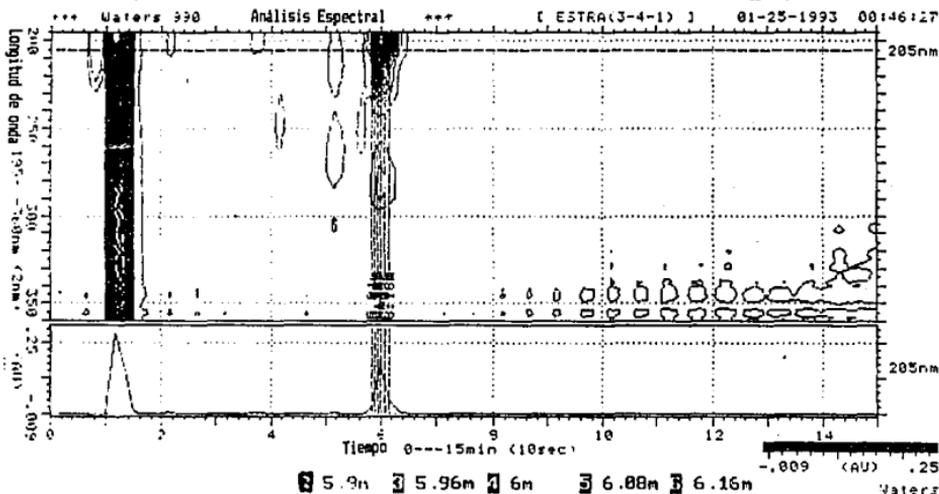


Figura 26. Análisis de contorno de las microesferas de 17 β -Estradiol, sometidas a condiciones de degradación por calor.

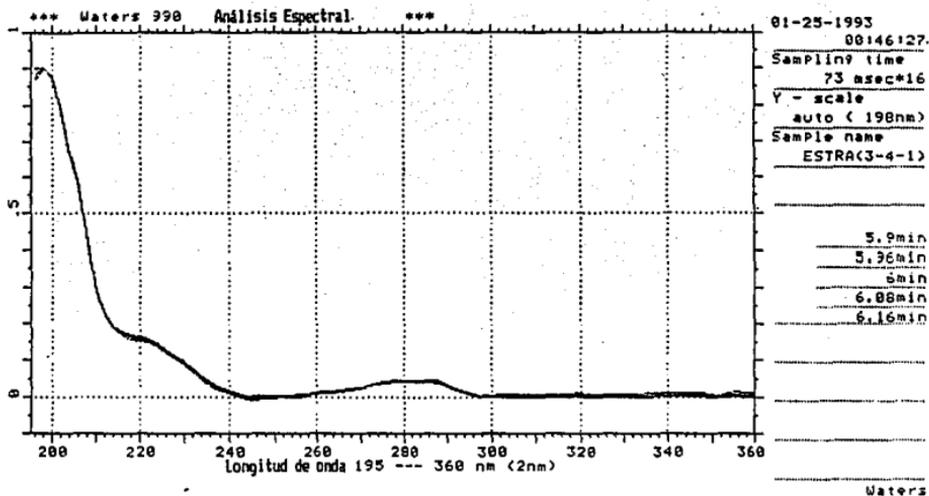


Figura 27. Sobreposición de los espectros de las microesferas de 17 β -Estradiol, correspondientes a cada uno de los tiempos de elución seleccionados en el cromatograma anterior (Figura 26).

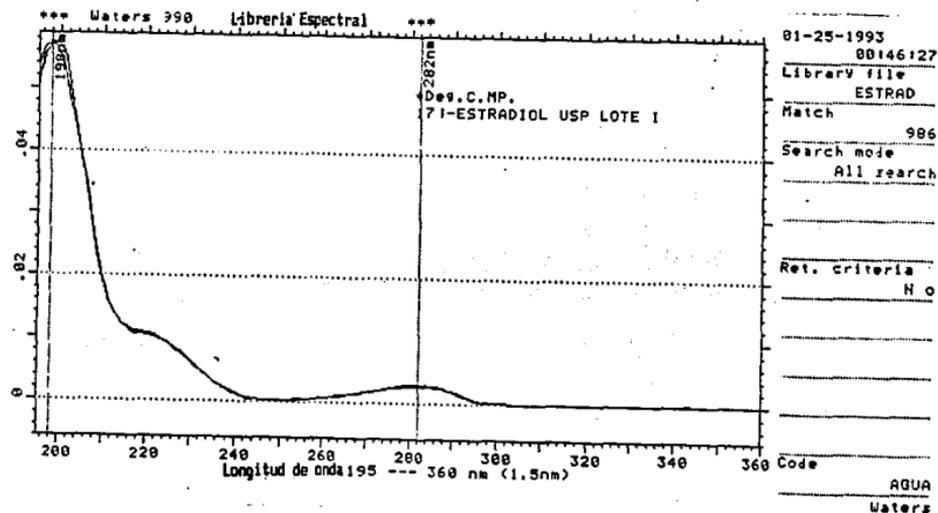


Figura 28. Comparación de espectros del 17 β -Estradiol estándar USP y 17 β -Estradiol materia prima sometida a condiciones de degradación por calor.

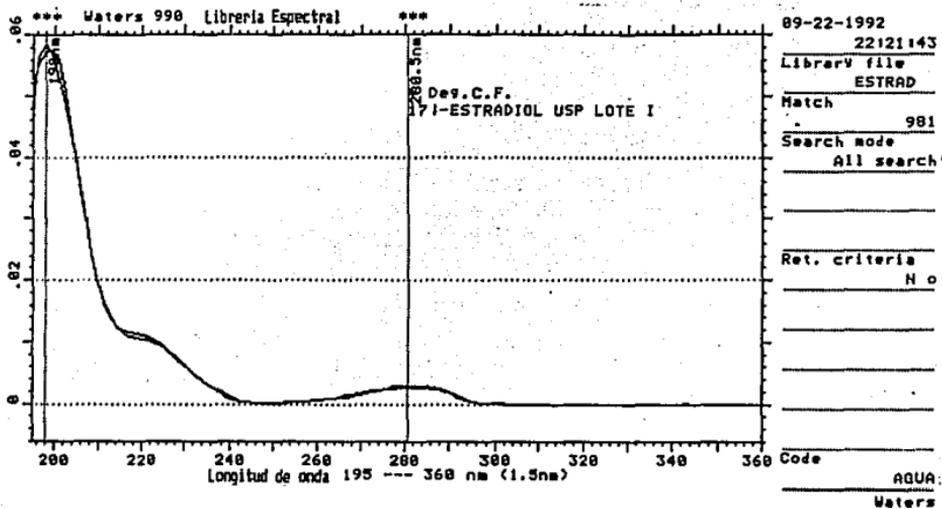


Figura 29. Comparación de espectros del 17β-Estradiol estándar USP y de las microesferas de 17β-Estradiol sometidas a condiciones de degradación por calor.

ANEXO II. LISTA DE FORMULAS EMPLEADAS EN LA EVALUACION DEL METODO

1. Coeficiente de Determinación.

$$r^2 = \frac{(n \sum xy - \sum x \sum y)^2}{[n \sum x^2 - (\sum x)^2] [n \sum y^2 - (\sum y)^2]}$$

2. Coeficiente de Variación.

$$CV = \left(\frac{S}{\bar{x}} \right) * 100$$

3. Desviación Estándar del Porcentaje Recuperado.

$$S = \left(\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1} \right)^{\frac{1}{2}}$$

4. Desviación Estándar de la Recta de Regresión.

$$S_{y/x} = \left(\frac{\sum y^2 - b (\sum y) - m (\sum xy)}{n - 2} \right)^{\frac{1}{2}}$$

5. Desviación Estándar de Regresión Relativa.

$$S_{y/x} (r) = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}}$$

6. Intervalo de Confianza para la Media.

$$IC = \bar{x} \pm t_{\alpha/2, n-2} \cdot \frac{S}{\sqrt{n}}$$

7. Límites de Confianza al 95% para la Ordenada al Origen.

$$LC (b) = b \pm t_{95\% n-2} \text{ q.t. } S_{y/x} \left(\frac{\sum x^2}{n \sum (x - \bar{x})^2} \right)^{1/2}$$

8. Límites de Confianza al 95% para la Pendiente.

$$LC (m) = m \pm t_{95\% n-2} \text{ q.t. } \left(\frac{S_{y/x}}{(\sum x)^2 / n} \right)^{1/2}$$

9. Media del Porcentaje Recuperado.

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

10. Ordenada al Origen.

$$b = \bar{y} - m \bar{x}$$

11. Pendiente.

$$m = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

12. Pendiente Relativa.

$$m (r) = m \frac{\bar{x}}{\bar{y}}$$

13. Porcentaje Recuperado para cada Recobro.

$$x = \left(\frac{y}{\bar{x}} \right) * 100$$

14. t cal. para la Ordenada al Origen.

$$b_0 = 0$$

$$t \text{ cal.} = \frac{b - b_0}{S_{y/x} \left(\frac{\sum x^2}{(n - 1) \bar{x}^2} \right)^{1/2}}$$

15. t cal. para la Pendiente.

$$m_0 = 1$$

$$t \text{ cal.} = \frac{(m - m_0) (S_x) (n)^{1/2}}{S_{y/x}}$$

Donde:

n = Número de replicaciones, (número de recobros).

x = Cantidad adicionada, (concentración o mg agregados).

\bar{x} = Promedio de la cantidad adicionada en x.

y = Propiedad medida, (respuesta o mg recuperados).

\bar{y} = Promedio de la propiedad medida.

Sx = Desviación estándar de las "x" n-1 grados de libertad.

Ex = Sumatoria de la cantidad adicionada.

Ex² = Sumatoria de los cuadrados de la cantidad adicionada.

Ey = Sumatoria de la propiedad medida.

Ey² = Sumatoria de los cuadrados de la propiedad medida.

Eyx = Sumatoria del producto de la cantidad adicionada y la propiedad medida.

t_{0.05, n-2, 0.1} = t de Student con un α 0.05 y n-2 grados de libertad.

16. Modelo Estadístico Jerárquico.

$$y_{ijk} = \mu + A_i + D_j + AD_{ij} + E_{ij}(k).$$

Donde:

- y_{ijk} = Porcentaje cuantificado con el i ésimo analista dado el j ésimo día o sistema de la k ésima replicación.
- μ = Porcentaje de sustancia de interés en la muestra.
- A_i = Efecto del i ésimo analista sobre el porcentaje cuantificado.
- D_j = Efecto del j ésimo día o sistema sobre el porcentaje cuantificado.
- AD_{ij} = Efecto cruzado del i ésimo analista y la j ésima condición sobre el porcentaje cuantificado.
- $E_{ij}(k)$ = Error experimental.

Tabulación de los resultados.

ANALISTA		
	1	2
D	y 111	y 211
	y 112	y 212
	y 113	y 213
I	y 121	y 221
	y 122	y 222
	y 123	y 223

TABLA DE ANALISIS DE LA VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F cal	F teo
ANALISTA	$g_{la} = a-1$	$SCa = \frac{\sum Y_{i..}^2}{dr} - \frac{Y_{...}^2}{adr}$	$MCA = \frac{SCa}{g_{la}}$	$Fa = \frac{MCA}{MCad}$	
DIAS O SISTEMAS	$g_{ld} = a(d-1)$	$SCd = \frac{\sum Y_{.j.}^2}{ar} - \frac{Y_{...}^2}{adr}$	$MCd = \frac{SCd}{g_{ld}}$	$Fd = \frac{MCd}{MCad}$	
ANALISTA DIA	$g_{lad} = (a-1) * (d-1)$	$SCad = \frac{\sum \sum Y_{ij.}^2}{r} - \frac{\sum Y_{i..}^2}{dr} - \frac{\sum Y_{.j.}^2}{ar} + \frac{Y_{...}^2}{adr}$	$MCad = \frac{SCad}{g_{lad}}$	$Fad = \frac{MCad}{MCE}$	
ERROR	$g_{le} = ad(r-1)$	$SCe = \sum \sum \sum Y_{ijk}^2 - \frac{\sum Y_{ij.}^2}{r}$	$MCE = \frac{SCe}{g_{le}}$		

Donde :

y_{ijk} = Porcentaje cuantificado por el i ésimo analista en el j ésimo día en la k ésima replicación.

a = Número de analistas.

d = Número de factores.

r = Número de repeticiones.

$$\sum Y_{i..}^2 = (y_{i11} + y_{i12} + \dots + y_{id1} + y_{id2} + \dots + y_{idn})^2 + \dots + (y_{a11} + y_{a12} + y_{ain} + \dots + y_{ad1} + y_{ad2} + \dots + y_{adn})^2.$$

$$\sum Y_{.j.}^2 = (y_{111} + y_{112} + \dots + y_{1in} + \dots + y_{a11} + y_{a12} + \dots + y_{ain})^2 + \dots + (y_{1d1} + y_{1d2} + \dots + y_{1dn} + \dots + y_{ad1} + y_{ad2} + \dots + y_{adn})^2.$$

$$\sum Y_{...}^2 = (y_{111} + y_{112} + \dots + y_{ad1} + y_{ad2} + \dots + y_{adn})^2.$$

$$\sum \sum Y_{ijk}^2 = (y_{111}^2 + y_{112}^2 + \dots + y_{ad1}^2 + y_{ad2}^2 + \dots + y_{adn}^2).$$

$$\sum \sum Y_{ij.}^2 = (y_{111} + y_{112} + \dots + y_{1in})^2 + \dots + (y_{ad1} + y_{ad2} + \dots + y_{adn})^2.$$

BIBLIOGRAFIA

- 1.- U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. (1990); The United States Pharmacopei XXII ed., National Formulary XVII ed., Rockville MD. pp. 530 , 1567 , 1710-1712 y 1820.
- 2.- Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, (PLM), Ediciones P.L.M., S.A. de C.V., 39a Edición (1993), pp. 40, 76, 93-94, 293, 937, 1140 y 1565.
- 3.- Terry Mills III and J. Conrad Roberson, "Instrumental Data for Drug Analysis", Segunda Edición; Elsevier Science Publishing Co., Inc., (1987) Vol. 2, pp. 834.
- 4.- Rahway, N. J., The Merck Index, "An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals", Eleventh Edition; Published by Merck & Co., Inc., (1989), pp. 3656.
- 5.- Florey Klaus, "Analytical Profiles of Drug Sustances", The American Pharmaceutical Association, (1986) Vol. 15 , pp. 283-310.
- 6.- J. Coyotupa, K. Kinoshita, R.Y. Ho et al. , Anal. Biochem., Vol. 34 pp71-73, (1970).
- 7.- Figen Önlü Erkoç, Özsar, Bülent Büven, Gülsevil Kalkandelen, and Ergül Ugrar, "High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Steroid Hormones", Journal of Chromatographic Science, Vol. 27 pp. 86-90, (1989).
- 8.- Goodman Gilman Alfred, Goodman Louis S. y Bilman Alfred, "Las bases Farmacológicas de la Terapéutica", Sexta Edición; Editorial Médica Panamericana, (1984), pp. 1386-1394.
- 9.- Kydonieus, A., "Treatise on Controlled Drug Delivery", Marcelo Dekker, Inc., (1992), pp. 5-14, 37-39, 199, y 315-325.
- 10.- Guillen Pichardo, J. V., "Microesferas como Modelo de Liberación Controlada: Técnica de Rocio-Congelación", Tesis de Posgrado del Instituto Politécnico Nacional, (1990).
- 11.- Krowczynski, L., "Extended-Release Dosage Forms", Crc. Press, Inc., (1987), pp. 136-137.
- 12.- Alfonso, R. G. "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mark Easton Pennsylvania USA., (1990), pp. 1676-1679.
- 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.- Erica Smakula, Augustus Bori, and Herbert H. Motiz, "Effects of Polymorphism and Influence of Sample Preparation on the Infra-Red Spectrum of Estradiol-17 β ", Spectrochimica Acta, Vol. 9 pp. 346-356 (1957).
- 16.- Parrott, E. L. "Pharmaceutical Technology Fundamental", Alpha Editions. Minneapolis, Minnesota USA (1970), pp. 116-122 y 124-129.
- 17.- Mesley, R. J., Johnson, C. A., Research Papers, "Infrared Identification of Pharmaceutically Important Steroids with Particular Reference to the Occurrence of Polymorphism", J. Pharm. Pharmacol., Vol. 17 pp. 329-340 (1965).
- 18.- L. R. Snyder & J. J. Kirkland, "Introduction to Modern Liquid Chromatography", John Wiley & Sons Inc. (1979).
- 19.- B. L. Karger, L. R. Snyder & C. Horvath, "An Introduction to Separation Science", John Wiley & Sons Inc. (1973).
- 20.- Parris N. A. "Instrumental Liquid Chromatography", Journal of Chromatography Library, Vol. 27 pp. 6-21 y 244-249 (1984).
- 21.- John H. Knox, "Practical Aspects of LC Theory", Journal of Chromatographic Science, Vol. 15 pp. 352-364 (1977).
- 22.- H. Engelhard, "Practice of High-Performance Liquid Chromatography", Ed. Springer-Verlag, (1986).
- 23.- Waters 990, Photodiode Array Detector Operator's Manual.
- 24.- Alfredson Tom and Sheehan Terry, "Recent Developments in Multichannel Photodiode-Array Optical LC. Detection", Walnut Creek Instrument Division 2700 Mitchell Drive.
- 25.- M. P. Fuller and P. R. Griffiths, Analytical Chemistry, Vol. 50 pp. 1906 (1978).
- 26.- M. P. Fuller and P. R. Griffiths, Applied Spectroscopy, Vol. 34 pp. 533 (1980).
- 27.- P. R. Griffiths and M. P. Fuller, "Advances in Infrared and Raman Spectroscopy" (eds. R.J.H. Clark and R.E.Hester) Vol. 9, (1982), pp. 63-129.
- 28.- M. W. Mackenzie, "Advances in Applied Fourier Transform Infrared Spectroscopy", John Wiley & Sons, (1988), pp. 106-183.
- 29.- R. T. Graf, J. L. Koenig, and H. Ishida, "Applied Spectroscopy", Vol. 39, pp. 405, (1985).

- 30.- P. Kubelka and F. Munk, Tech. Phys., Vol. 12, pp. 593, (1931).
- 31.- P. Kubelka, Journal Opt. Soc. Am., Vol. 38, pp. 448, (1948).
- 32.- Fontani, F., "Criterios de Validación de Métodos Analíticos", Boll. Chim. Pharm., Vol. 126, pp. 66-74, (1987).