



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

SECRETARIA DE EDUCACION PUBLICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE INVESTIGACIONES

DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO PARA
CUANTIFICAR ESTRADIOL Y PROGESTERONA EN
PERFILES DE DISOLUCION DE MICROESFERAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
LETICIA MAYUMI HOSHIKO HAYASHIDA



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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


JURADO ASIGNADO

Presidente: Prof. Isaura Luisa Carrera García
Vocal: Prof. Rosa Lorenia Mora-Tovar y Chávez
Secretario: Prof. Maria Cristina Enríquez Mendoza
1er. Suplente: Prof. Consuelo Arellano Borjas
2do. Suplente: Prof. Georgina Margarita Maya Ruiz

Sitio donde se desarrolló el tema:

Centro A. F. de Estudios Tecnológicos, S. A.

Asesor del Tema:


Prof. Isaura Luisa Carrera García


Supervisor Técnico:


Q.F.B. Salvador Salado Carbajal

Supervisor Técnico:


Q.F.B. Ma. Yeres de Jesús Francisco Doce

Sustentante:


Leticia Mayumi Hoshiko Hayashida

DEDICATORIAS

A mis padres, Yoshio Hoshiko y Emiko Hayashida, que con su amor, apoyo y ejemplo me han alentado a seguir adelante.

A mi hermana Norma Izumi, por su cariño y ayuda incondicional.

A mi amiga Adriana Pérez Romo, por su amistad y comprensión en todo momento.
A ella de manera especial dedico esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

Al Q.F.B. Salvador Salado C. y a la Q.F.B. Ma. Teresa Francisco D., por su valiosa asesoría e infinita paciencia, los cuales fueron de gran ayuda para la realización de este trabajo.

A las maestras Isaura, Lorenia, Ma. Luisa, Cristina, Ma. Teresa, Georgina y Consuelo del Departamento de Control Analítico, por sus consejos que han sido de gran valor en mi formación, a todas ellas con cariño y respeto.

A mis amigos y compañeros Beatriz, Raúl, Martha, Nacho, Sandy, Vere, Isela, Tina, Marbella, Alejandro y Sergio, por los difíciles pero felices años que compartimos en la Facultad.

A la Facultad de Química, por brindarme la oportunidad de estudiar en una gran institución.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1	INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2	GENERALIDADES	3
2.1.	Monografía de los Fármacos	3
2.1.1.	Estradiol	3
2.1.1.1.	Propiedades Físicas y Químicas	3
2.1.1.2.	Farmacología	6
2.1.2.	Progesterona	10
2.1.2.1.	Propiedades Físicas y Químicas	10
2.1.2.2.	Farmacología	13
2.2.	Liberación Modificada	15
2.3.	Disolución	16
2.4.	Cromatografía Líquida de Alta Resolución	18
2.5.	Validación de Métodos Analíticos	21
CAPÍTULO 3	PARTE EXPERIMENTAL	26
3.1.	Equipo, Instrumentos, Material, Reactivos y Sustancias de Referencia	26
3.2.	Antecedentes	27
3.2.1.	Planteamiento	27
3.2.2.	Trabajo Previo	28
3.3.	Desarrollo del Método	29
3.4.	Validación del Método	31

CAPÍTULO 4	RESULTADOS.....	35
4.1.	Exactitud	35
4.2.	Precisión	37
4.3.	Especificidad	39
4.4.	Límite de Cuantificación.....	43
4.5.	Linealidad e Intervalo Dinámico de Trabajo.....	44
4.6.	Tolerancia	54
CAPÍTULO 5	CONCLUSIONES Y PROPUESTAS.....	59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años, una de las tendencias más importantes dentro de la industria farmacéutica, ha sido el desarrollo de formulaciones de liberación modificada, dada las ventajas terapéuticas que presenta sobre las formas farmacéuticas convencionales. Dentro de los medicamentos de liberación modificada, uno de los últimos avances se encuentra en el desarrollo de microesferas de administración parenteral.

Dada las características de liberación del principio activo que presentan estas formulaciones, se ha iniciado la producción de microesferas de Estradiol y Progesterona, las cuales representan una excelente alternativa para ser utilizadas en terapia de reemplazo o como anticonceptivos.

Una de las pruebas físicas más importantes durante el desarrollo farmacéutico de una nueva formulación, es la prueba de disolución, con la cual es posible evaluar y en consecuencia, modificar la cinética de liberación del fármaco para lograr el efecto terapéutico deseado.

Debido a que la prueba de disolución permite conocer la cinética de liberación de un fármaco de la forma farmacéutica, es posible obtener un estimado de la biodisponibilidad de la formulación, así como establecer una correlación *in vitro-in vivo*.

Para la realización de la prueba de disolución, se debe contar con un método analítico adecuado para asegurar la confiabilidad de los resultados obtenidos.

La formulación de microesferas de Estradiol y Progesterona, al igual que el método de disolución, se encuentran en la etapa de desarrollo, por lo que es necesario manejar diferentes variables o condiciones, tales como: dosis, composición del medio de disolución, volumen del medio de disolución y composición de la formulación. Por lo tanto, el método analítico debe considerar todas estas variables para que cumpla con el propósito para el cual fue

desarrollado: una cuantificación confiable de los principios activos durante la prueba de disolución.

El objetivo de este trabajo es desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de Estradiol y Progesterona, específico para ambos activos y que cubra las situaciones extremas de la prueba de disolución.

CAPÍTULO 2 GENERALIDADES

2.1 MONOGRAFÍA DE LOS FÁRMACOS

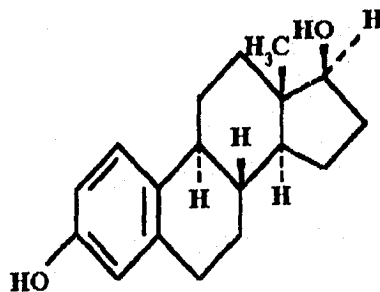
2.1.1 ESTRADIOL

2.1.1.1. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Nombre Genérico: (1)
Estradiol

Nombre Químico: (1)
Estra-1,3,5(10)-trien-3,17-diol, (17 β)-
Estra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol

Fórmula Desarrollada: (1)



Fórmula Condensada: (1)
 $C_{18}H_{24}O_2$

Masa Molecular: (1)
272.39

Descripción: (2, 3)

Polvo cristalino o cristales higroscópicos de color blanco o blanco cremoso, inodoro e insípido.

Solubilidad: (2, 3)

El Estradiol es prácticamente insoluble en agua; soluble 1 en 28 partes de etanol, 1 en 17 de acetona, 1 en 435 de cloroformo y 1 en 150 de éter; también es soluble en dioxano y disoluciones de hidróxidos alcalinos.

La solubilidad del Estradiol en algunos disolventes acuosos y orgánicos se muestra en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Solubilidad del Estradiol en Algunos Disolventes Acuosos y Orgánicos (2).

DISOLVENTE	SOLUBILIDAD (mg/dL)			DISOLVENTE	SOLUBILIDAD (mg/dL)	
AGUA	0.17 (20°C), 0.77 (42.5°C),	0.30 (25°C), 0.97 (50°C)	0.56 (35°C),	ETANOL	2387.2 (15°C) 3727.4 (30°C)	3134.4 (25°C)
NaCl 0.02M	0.38 (37°C)			METANOL	1811.3 (15°)	2548.8 (25°C)
NaCl 0.20M	0.34 (37°C)				3525.6 (30°C)	
NaCl 0.40M	0.28 (37°C)					

Intervalo de Fusión: (1)

De acuerdo a la técnica descrita en la USP 23 NF 18, el Estradiol funde entre los 173°C y los 179°C.

Constante de Disociación: (1)

El valor de pKa aparente, determinado por espectrofotometría, para el grupo OH fenólico es de 10.30 ± 0.10 .

Rotación Específica: (3, 4)

La rotación específica del 17 β -Estradiol se encuentra entre +73° y +83°, determinada en una solución con 10mg/mL, con dioxano.

Polimorfismo: (3)

Con base en patrones de difracción de rayos X y espectroscopía de infrarrojo, se han identificado 4 formas cristalinas (de la A a la D) y una

forma amorfa del 17β-Estradiol, las cuales sufren transformaciones entre si al ser sometidas a calentamiento y/o agitación mecánica.

Una propiedad notable del Estradiol es la tendencia a adquirir la forma hemihidratada (forma A). Esta forma se obtiene a partir de soluciones acuosas, acetato de etilo, cloroformo, etanol absoluto y otros disolventes orgánicos.

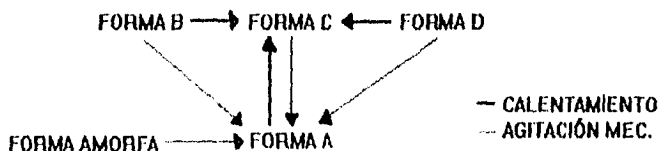


Figura 2.1.
Esquema de Transformaciones de los Polimorfos del Estradiol.

Espectroscopía Infrarroja: (3, 22)

Los principales picos se encuentran a 821, 1054, 1227, 1245, 1276 y 1493 cm^{-1} , siendo el medio de dispersión bromuro de potasio. (Figura 2.2).

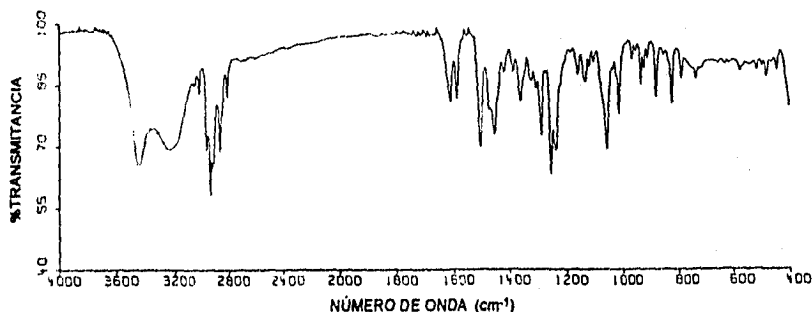


Figura 2.2.
Espectro Infrarrojo del Estradiol en una dispersión de bromuro de potasio.

Espectroscopía Ultravioleta: (2)

El 17β-Estradiol, en una solución metanol-agua 2% (V/V), presenta máximos de absorción a 221nm ($A_{1\%1\text{cm}}=289$) y 281nm ($A_{1\%1\text{cm}}=75$), con

un hombro a 278nm. El espectro de absorción sufre un efecto batocrómico con el aumento de pH (el punto isobéptico ocurre a 285.6nm). Figura 2.3.

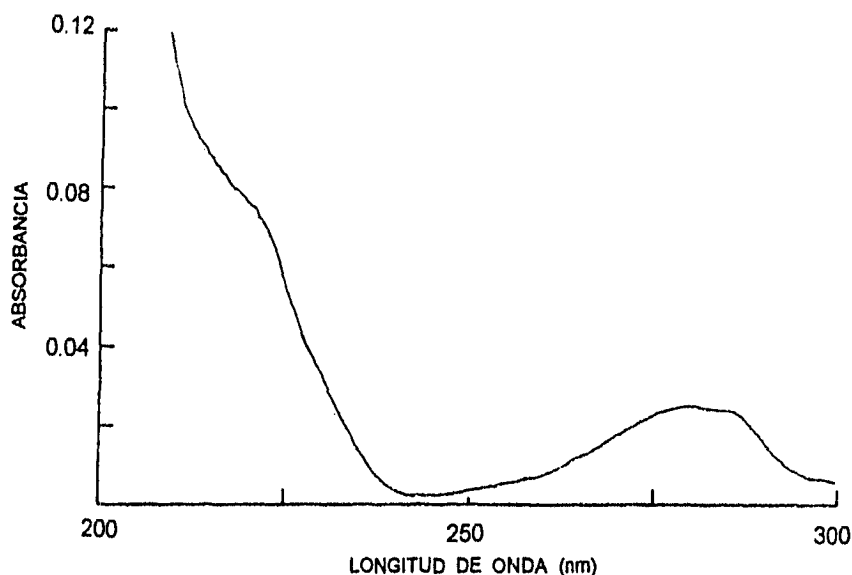


Figura 2.3.
Espectro Ultravioleta del Estradiol en solución metanol-agua 2% (V/V)

2.1.1.2. FARMACOLOGÍA

Biosíntesis: (5, 6, 7)

El 17 β -Estradiol es biosintetizado a partir del acetato vía colesterol, siendo la Androstenediona y la Testosterona, los precursores inmediatos. Algunas de las rutas principales se resumen a en la figura 2.4.

El ovario es la fuente principal de estrógenos naturales en las mujeres con ciclos normales. El 17 β -Estradiol, el más potente de los estrógenos naturales, es el principal producto secretorio del ovario. Durante la fase folicular temprana, la secreción de Estradiol es similar en ambos ovarios. Más tarde, el Estradiol proviene en gran parte del ovario que contiene el folículo dominante. De manera similar, en la fase lútea, la secreción predominante de Estradiol viene del ovario que contiene el cuerpo lúteo.

En los hombres y en las mujeres posmenopáusicas, la principal fuente es el tejido adiposo. Durante el embarazo, el 50% de los precursores son derivados de los precursores suprarrenales fetales, la Dehidroepiandrostenediona y su derivado

16 hidroxilado. Estos compuestos son aromatizados en la placenta y el Estradiol es secretado en forma preferencial hacia la corriente sanguínea materna.

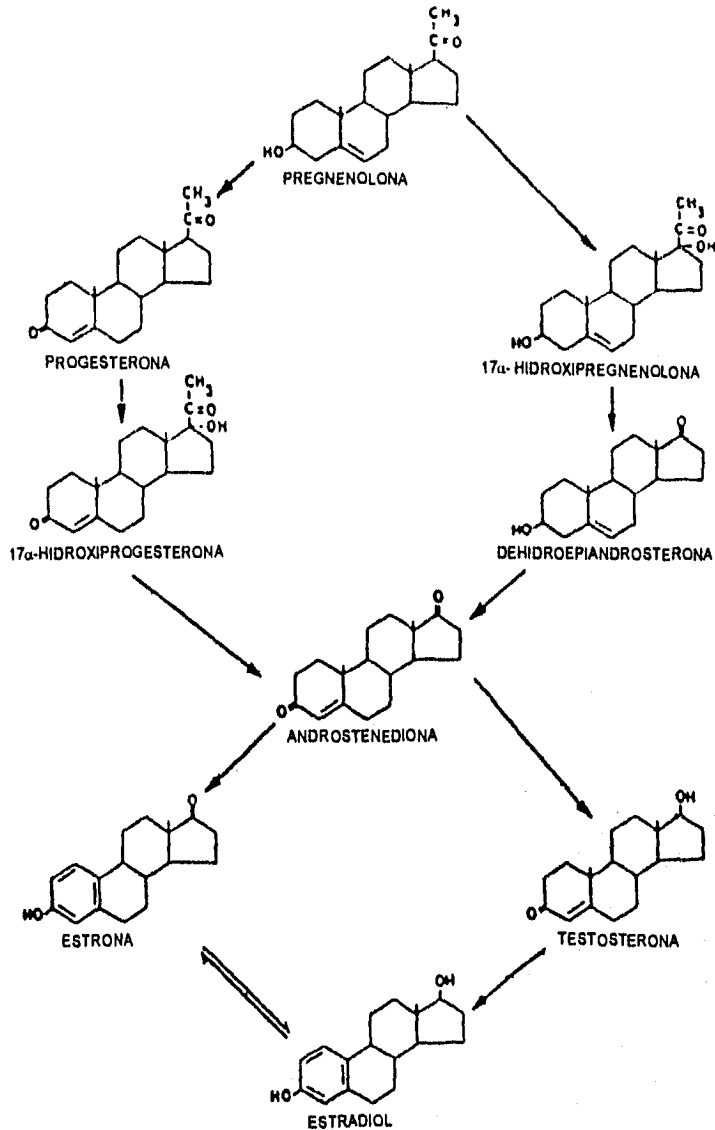


Figura 2.4.
Biosíntesis del Estradiol

Acciones Farmacológicas y Fisiológicas: (5, 6, 7)

La principal función del Estradiol es la de desarrollar y apoyar los procesos reproductivos en las mujeres. El Estradiol, junto con los demás estrógenos son necesarios para el apoyo y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios normales. Mediante una acción directa causan el crecimiento y el desarrollo de la vagina, del útero y de las trompas de Falopio. Bajo la influencia del Estradiol, aumentan el tamaño y la cantidad de células del endometrio y miometrio, lo que implica la proliferación y regeneración de la capa endometrial.

El Estradiol afecta el cuello uterino por incremento de la altura celular de la mucosa cervical y promueve la formación, cantidad y elasticidad del moco cervical. Los labios menores se vuelven más gruesos y grandes. La vagina se elonga e incrementa su elasticidad, arrugas y distensibilidad. También mantiene la elasticidad y el tono de estructuras urogenitales y apoya el crecimiento del vello púbico y axilar.

Los efectos extragenitales del 17 β -Estradiol incluyen la promoción de una distribución femenina de la grasa y del vello corporal, estimulan el crecimiento de los conductos mamarios, con el resultado de un agrandamiento de las mamas, efectos en los cuales también intervienen las hormonas hipofisarias.

Además influyen en forma no bien conocida a la maduración ósea, que resulta en espaldas estrechas, caderas amplias y baja estatura comparada con la masculina.

El Estradiol promueve una retención moderada de sal y agua, que es común en la segunda mitad del ciclo menstrual. La terapia con Estradiol rara vez produce retención de líquido hasta el punto de causar edema.

Así mismo, el Estradiol como todos los estrógenos, suprimen la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) por la glándula hipofisaria, como resultado de la inhibición por retroalimentación. El efecto sobre la hormona luteinizante (LH) es más complejo y puede llevar a un aumento o a una disminución de la concentración de LH.

Por otro lado, puede causar alteraciones en los lípidos presentes en la circulación. Las concentraciones de colesterol asociado con lipoproteínas de baja densidad disminuyen y las unidas a las de alta densidad aumentan. Estas alteraciones pueden disminuir el riesgo de enfermedad coronaria y contribuir a una incidencia menor de infarto de miocardio en las mujeres premenopáusicas.

Mecanismo de Acción: (5, 6, 7)

El 17 β -Estradiol actúa regulando la transcripción de cierto número de genes. Después de difundir de manera pasiva a través de las membranas celulares, el 17 β -Estradiol se une a un receptor nuclear. Esta proteína se encuentra en los tejidos blanco, tales como el aparato reproductor femenino, mama, hipófisis e hipotálamo.

Posteriormente, el complejo hormona-receptor se fija a secuencias específicas de DNA conocidas como "elementos de respuesta a las hormonas", regulando la transcripción de genes adyacentes.

Absorción, Metabolismo y Excreción: (5, 6, 7)

El 17 β -Estradiol exógeno se absorbe fácilmente a través de la piel, mucosas y tracto gastrointestinal. La absorción desde el tracto gastrointestinal es rápida y completa, liberándose al sistema portal como un bolo. Así, la limitada eficacia del Estradiol administrado por vía oral se debe a su metabolismo hepático y no a una mala absorción; al igual que el Estradiol endógeno, cierta proporción se excreta en la bilis y es reabsorbida en el intestino (circulación enterohepática), sufriendo una conversión a compuestos menos activos. Por el contrario, la administración por vía no oral, no se ve afectada por la circulación enterohepática.

El Estradiol se metaboliza en el hígado a formas más hidrosolubles, menos ligadas a proteínas por hidroxilación y por conjugación con ácido sulfúrico y ácido glucurónico, siendo excretados por vía renal. El principal metabolito es el sulfato de estrona, el cual es depurado lentamente, debido a su alta afinidad por la albúmina

Usos Terapéuticos: (5, 6, 7)

Uno de los usos más amplios del 17 β -Estradiol es como anticonceptivo, en combinación con progestágenos.

Los síntomas vasomotores característicos de la menopausia, como son las oleadas de calor (sensación subjetiva de calor con enrojecimiento facial), mareos escalofríos, sudoración exagerada, palpitaciones, cefaleas y calambres musculares son tratados con Estradiol; al igual que la vaginitis atrófica. Así mismo, es utilizado en una gran variedad de trastornos menstruales, como la amenorrea, dismenorrea y oligomenorrea.

Efectos Adversos: (5, 6, 7)

Las náuseas constituyen el efecto secundario más frecuente en la terapia con Estradiol. Con dosis elevadas se observan otros efectos como anorexia, vómitos y diarrea leve. Sin embargo, si se utilizan dosis pequeñas para iniciar la terapia, aumentando paulatinamente la dosis, pueden evitarse la mayoría de los efectos adversos. Otros efectos de importancia, en el tratamiento con Estradiol, son el aumento en la incidencia de tromboflebitis y tromboembolismo.

La congestión mamaria, la hiperplasia endometrial y la hemorragia también son efectos colaterales de la administración de Estradiol.

En estudios independientes, se ha demostrado un riesgo elevado de desarrollo de cáncer endometrial en mujeres posmenopáusicas, bajo una terapia de reemplazo con estrógenos como el Estradiol, por largos períodos. Sin embargo, la adición de Progesterona al tratamiento de reposición con estrógenos parece disminuir el riesgo de cáncer endometrial.

La interrelación entre la terapia de reemplazo estrogénica y el desarrollo del cáncer de mama, no se ha comprobado del todo. Algunos estudios refieren un pequeño riesgo relativo incrementado, que puede no ser significativo.

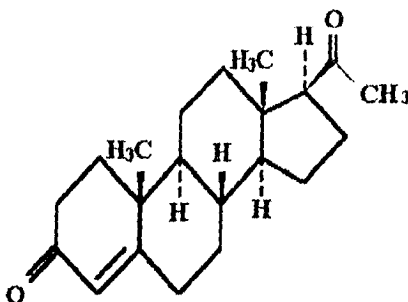
2.1.2 PROGESTERONA

2.1.2.1. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Nombre Genérico:
Progesterona

Nombre Químico: (1)
Pregn-4-en-3, 20-diona

Fórmula Desarrollada: (1)



Fórmula Condensada: (1)
 $C_{21}H_{30}O_2$

Masa Molecular: (1)
314.47

Descripción: (3, 4)
Cristales incoloros o polvo cristalino de color blanco o ligeramente amarillo.

Solubilidad: (1, 20)
La Progesterona es prácticamente insoluble en agua; soluble 1 en 8 partes de etanol, 1 en menos de 1 parte de cloroformo y 1 en 16 de éter. También es soluble en acetona, dioxano y ácido sulfúrico concentrado. La tabla 2.2. presenta algunos valores de solubilidad en disolventes acuosos.

Tabla 2.2. Solubilidad de la Progesterona en Medios Acuosa a Diferentes Temperaturas(20).

DISOLVENTE	SOLUBILIDAD (µg/mL)		
AGUA	6.6-9.0 (25°C),	11.0 (30°C),	16.8 (37°C)
NaCl 0.9%	6.6 (25°C)	10.0 (30°C)	

Intervalo de Fusión: (1, 4)

De acuerdo a la técnica descrita en la USP 23 NF 18, existen dos intervalos de fusión. La forma α funde entre los 126° y 131°C; mientras que la β -Progesterona funde a los 121°C.

Rotación Específica: (1)

La rotación específica de la Progesterona se encuentra entre +175° y +183°, determinada en una solución con 20mg/mL, en dioxano.

Polimorfismo: (21)

La Progesterona presenta al menos 2 formas polimórficas en estado cristalino: la forma α (A) y la forma β (B). Muramatsu y col. reportan que a temperatura ambiente ambos polimorfos parecer no sufrir transformación. Al aumentar la temperatura, ocurre una transformación unilateral β a α de manera espontánea, lo cual supone que la forma β es termodinámicamente inestable.

Brändstatter-Kuhnert y col.(9) han reportado la existencia de las formas III - V, que al parecer son formas metaestables que generalmente pasan a la forma β .

La forma α se obtiene por recristalización en disolventes orgánicos como etanol, benceno, acetona o mezclas binarias de estos disolventes.

Espectroscopía Infrarroja: (3, 22)

Los principales picos se encuentran a 1662, 1614, 1700, 872, 1209, y 1232cm⁻¹, siendo el medio de dispersión bromuro de potasio. (Figura 2.5.).

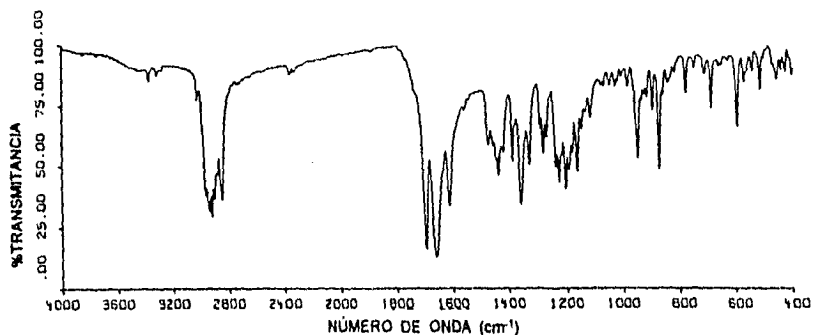


Figura 2.5.
Espectro Infrarrojo de Progesterona en una dispersión de bromuro de potasio.

Espectroscopía Ultravioleta: (22)

La Progesterona disuelta en alcohol deshidratado, presenta un máximo de absorción a 240nm ($A_{1\%1cm}=540$). Figura 2.6.

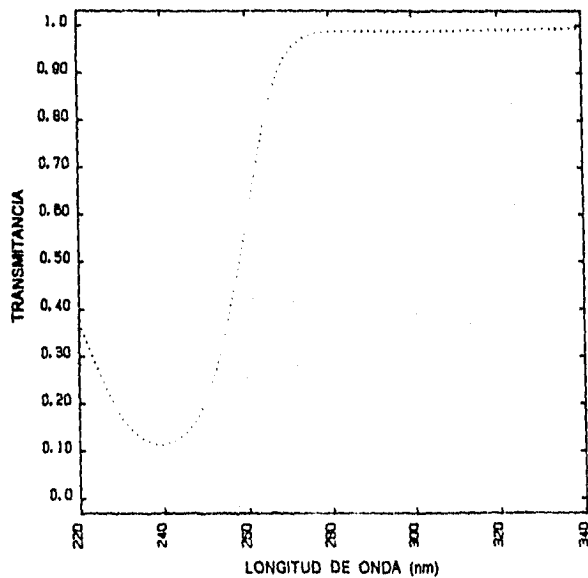


Figura 2.6
Espectro Ultravioleta de Progesterona en alcohol deshidratado.

2.1.2.2. FARMACOLOGÍA

Biosíntesis: (5, 6, 7)

La Progesterona es biosintetizada a partir del acetato; la vía implica la síntesis inicial de colesterol, el cual después de una serie de desdoblamientos de la cadena lateral y oxidaciones es convertido en Pregnenolona. Finalmente, por la acción de una deshidrogenasa, esta última es transformada en Progesterona.

Esta hormona es secretada en el ovario, principalmente por el cuerpo amarillo o lúteo durante la segunda mitad del ciclo menstrual. La secreción comienza en realidad antes de la ovulación, desde el folículo destinado a liberar el óvulo. Cuando no se produce el embarazo, el cuerpo lúteo involuciona, disminuyen los niveles de Progesterona y comienza la menstruación. Si el óvulo es fertilizado, el trofoblasto en desarrollo secreta su hormona luteotrófica (gonadotrofina coriónica) en la circulación materna, prolongando así la vida funcional del cuerpo lúteo. A partir de la segunda o tercera semana del embarazo, la placenta en desarrollo comienza a secretar estrógenos y Progesterona en colaboración con las glándulas suprarrenales fetales y entonces, el cuerpo lúteo ya no es esencial para que prosiga la gestación. La placenta continúa secretando estrógenos y Progesterona en gran cantidad hasta el momento del parto.

Acciones Fisiológicas y Farmacológicas: (5, 6, 7)

Los órganos blanco principales de la Progesterona son el útero y las mamas. La hormona tiene efecto tanto sobre el endometrio como sobre el miometrio. Actúa sobre el endometrio, preparado por los estrógenos, para inducir la fase secretoria, en la que las glándulas endométricas crecen y secretan grandes cantidades de carbohidratos que posiblemente serán utilizados por el óvulo fecundado como fuente de energía.

La función principal de la Progesterona con respecto al miometrio, consiste en detener las contracciones rítmicas espontáneas del útero. Los efectos de la Progesterona sobre el útero, son preparar el endometrio para la recepción, implantación y mantenimiento del óvulo fecundado y suprimir las contracciones miométricas, para que así el embrión no sea desalojado del útero.

La Progesterona junto con los estrógenos, estimulan el desarrollo de los sacos alveolares en las mamas durante el embarazo, pero la secreción de leche, no ocurre hasta que los niveles de éstas hormonas disminuyen después del parto; por otro lado, también aumenta la temperatura basal.

A dosis elevadas, la Progesterona puede producir analgesia ligera y anestesia general.

Mecanismo de Acción: (5, 6, 7)

La Progesterona, como cualquier hormona esteroide, difunde libremente dentro de sus células blanco para fijarse a un receptor intranuclear. Este receptor específico para Progesterona, se encuentra principalmente en el aparato

reproductor femenino. El complejo Progesterona-receptor se fija al DNA, activando la transcripción de un grupo de genes específico.

La acción de la Progesterona está modulada por la concentración de receptores en las células blanco. Los estrógenos secretados en la fase folicular incrementan la cantidad de receptores para la Progesterona; mientras que esta última inhibe la síntesis tanto de su propio receptor como del Estradiol.

Absorción, Metabolismo y Excreción: (5, 6, 7)

La Progesterona administrada por vía oral es ineficaz, debido a que sufre una extensa inactivación por el metabolismo de primer paso en el hígado (hidroxilación y conjugación). La Progesterona micronizada y administrada por vía oral, sin embargo, es bien absorbida y presenta una eficacia significativa. La Progesterona también es bien absorbida cuando es administrada por las vías vaginal, rectal e intramuscular.

La vida media de la Progesterona (endógena y exógena) circulante es de unos pocos minutos, siendo metabolizada principalmente en el hígado, como ya se mencionó. Los metabolitos son derivados e isómeros del Pregnano, los cuales se conjugan con ácido glucurónico y sulfúrico y son excretados en la orina. El principal metabolito es el glucurónido del pregnano-3 α , 20 α -diol (Pregnandiol).

Usos Terapéuticos: (5, 6, 7)

El uso principal de la Progesterona sola o en combinación con estrógenos es como anticonceptivo.

La segunda aplicación es en el tratamiento de la hemorragia uterina disfuncional, trastorno caracterizado por ciclos irregulares y episodios de hemorragia prolongada, frecuentes en los extremos de la vida reproductiva. Esta afección, probablemente es el resultado de la acción continuada de los estrógenos que provocan una hiperplasia del endometrio, junto con una cantidad insuficiente de Progesterona.

La dismenorrea es mejorada por inhibición de la ovulación con estrógenos, el uso adicional de Progesterona produce mejores resultados en este tratamiento. Sin embargo, el uso de agentes antiinflamatorios no esteroideos constituyen la terapia preferida, ya que se cree que la causa de esta afección es la producción uterina de Prostaglandinas.

Efectos Adversos: (5, 6, 7)

El efecto adverso más común en el tratamiento con Progesterona es la hemorragia menstrual anormal (el sangrado intermenstrual, el manchado, cambios en la cantidad de flujo o la amenorrea). También se observan náuseas, vómitos y somnolencia con la administración de Progesterona durante un corto período. Con la terapia prolongada, puede presentarse edema, aumento de peso y malestar en el pecho.

La tolerancia a la glucosa se encuentra deteriorada en algunas mujeres que usan anticonceptivos orales, que generalmente se manifiesta como un incremento en la glucemia en ayunas, debidas al componente progestágeno. Otro efecto es la alteración del metabolismo lipídico por el uso de anticonceptivos orales combinados. Los progestágenos aumentan las Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL) y disminuyen las Lipoproteínas de Alta Densidad (HDL), mientras que los estrógenos tienen el efecto opuesto.

2.2 LIBERACIÓN MODIFICADA (8, 9, 10, 11, 12)

El propósito ideal de un medicamento es proporcionar la dosis terapéutica en el sitio adecuado, para alcanzar y mantener la concentración necesaria del principio activo, con el fin de obtener el efecto farmacológico requerido. En otras palabras debe cumplir con dos requisitos: la disposición espacial y temporal.

Las formas farmacéuticas de liberación modificada representan, hasta este momento, el mayor avance en el desarrollo de este medicamento ideal.

Las formulaciones de liberación modificada pueden dividirse en 4 categorías:

- 1) Liberación Retardada: son aquellas que utilizan una dosificación repetitiva e intermitente de una o más unidades de liberación, incorporadas en una sola forma farmacéutica. Estos sistemas no mantienen de manera constante la concentración del fármaco dentro de los niveles terapéuticos; sin embargo, la duración del efecto terapéutico es mayor que la de las formas convencionales.
- 2) Liberación Sostenida: incluye cualquier sistema que logra una liberación paulatina del fármaco en un período de tiempo largo. Si la formulación tiene éxito en mantener niveles constantes del fármaco en la circulación u órgano blanco, se considera una *forma farmacéutica de liberación controlada*. Mientras que cuando la formulación no logra este objetivo, pero la acción terapéutica es más duradera en comparación con las formas convencionales, se denomina una *forma farmacéutica de liberación prolongada*.
- 3) Liberación en Sitio Específico (Site-specific Release): se refiere a formulaciones que dirigen el fármaco a un órgano o tejido específico.
- 4) Liberación a Receptor (Receptor Release): al igual que el anterior, dirigen el fármaco a un sitio específico; en este caso el blanco es un receptor determinado en un tejido u órgano.

En los últimos años, el uso de sistemas de liberación modificada ha aumentado de manera notable, debido a las ventajas que presenta sobre las formulaciones convencionales. Las características de la cinética de liberación y los mecanismos utilizados para este fin, permiten a estas formulaciones la disminución de la cantidad del principio activo para alcanzar los niveles terapéuticos y el control de la liberación, no solo para lograr niveles constantes en circulación, sino también en un sitio particular. Esto lleva a una disminución o eliminación de efectos secundarios, menor potenciación o disminución de la actividad del fármaco por el uso crónico, acumulación menor del fármaco en el cuerpo en tratamientos crónicos, mejor control del padecimiento y disminución de la frecuencia de dosificación, que resulta en una mayor aceptación por parte del paciente.

La mayoría de las investigaciones en el desarrollo de nuevos medicamentos se ha centrado en la generación de formas farmacéuticas que satisfacen la disposición temporal, es decir, controlan la velocidad de liberación en el órgano blanco; así mismo, también se han elaborado nuevos sistemas que dirigen el fármaco al órgano o tejido blanco. La vía oral ha sido la vía de administración de preferencia, no solo por la mayor aceptación del paciente, sino porque los requerimientos de manufactura de las formas farmacéuticas sólidas son menos estrictos a las administradas por vía parenteral.

A pesar de la preferencia por la vía oral, muchas veces no resulta ser la mejor alternativa. Existen fármacos que presentan una degradación significativa al pasar por el tracto gastrointestinal, sufren un extenso metabolismo de primer paso o son pobremente absorbidos, siendo necesaria su administración por vía parenteral.

La investigación de formulaciones de liberación modificada parenterales también ha aumentado durante los últimos años. Las microesferas son partículas esféricas con un diámetro menor a $250\mu\text{m}$, lo cual les permite ser suspendidas en un vehículo acuoso para su administración y representan el más reciente desarrollo de sistemas de liberación modificada por vía parenteral.

2.3 DISOLUCIÓN (1, 8, 13, 23, 24, 25)

La velocidad de disolución puede definirse como la cantidad de fármaco que entra en solución por unidad de tiempo, bajo condiciones estandarizadas de interfase sólido-líquido, temperatura y composición del disolvente.

La prueba de disolución es una prueba física de control de calidad para cumplir con las Prácticas Adecuadas de Manufactura (PAM), la cual indica de manera simple y barata la consistencia física de un producto.

Por otro lado, proporciona información útil durante el desarrollo farmacéutico de un medicamento, tanto sobre las características del principio activo, que deben

tomarse en cuenta para el diseño del medicamento, como de la forma farmacéutica, permitiendo seleccionar la mejor formulación para lograr el efecto farmacológico deseado, ya que se tiene evidencia de que los resultados de la prueba de disolución pueden ser correlacionados con la biodisponibilidad del medicamento. En otras palabras, es posible establecer una correlación *in vitro-in vivo*.

Una correlación *in vitro-in vivo* se refiere al establecimiento de una relación entre una propiedad biológica o un parámetro derivado de una propiedad biológica producida por una forma farmacéutica y una propiedad o característica fisicoquímica de la misma forma farmacéutica (1). Las propiedades biológicas comúnmente utilizadas son parámetros farmacocinéticos, tales como C_{max} (Concentración máxima del fármaco en plasma) y AUC (Área bajo la curva de concentración del fármaco contra tiempo); mientras que la propiedad fisicoquímica más usada es la prueba de disolución. Debido a que el proceso de disolución es con frecuencia el paso limitante en la absorción de un fármaco, la disolución se considera el parámetro *in vitro* más adecuado para correlacionar con la biodisponibilidad.

Existen 3 niveles de correlación de acuerdo al grado de utilidad, siendo el nivel A el de mayor nivel (relación punto a punto) y el nivel C el de menor nivel (de utilidad cuestionable).

Como se ha mencionado, la prueba de disolución es una herramienta útil, no solo como un parámetro de control de calidad en la evaluación final de un producto farmacéutico, sino como parte integral de un programa de desarrollo que tiene como propósito final proporcionar un medicamento eficaz y seguro.

Durante el desarrollo del método de disolución se deben considerar los factores que afectan la velocidad de disolución, entre ellos los relacionados con las propiedades fisicoquímicas del fármaco (solubilidad, formación de sales, tamaño de partícula, forma cristalina), los relacionados con la forma farmacéutica (los excipientes o vehículos, así como el proceso de fabricación), los relacionados con el aparato de disolución y los relacionados con los parámetros de prueba (agitación, pH, incorporación de tensoactivos, volumen y condiciones "sink", temperatura, deaeración del medio). Estos factores al no ser caracterizados de manera adecuada, pueden dar como resultado una correlación equivocada de los datos *in vitro* con los datos *in vivo*, llevando a la obtención de una forma farmacéutica ineficaz e insegura.

La selección del aparato de disolución debe realizarse tomando en cuenta la formulación y el principio activo. De acuerdo a la USP 23, el Aparato 1 (Canastilla o Cesto) y el Aparato 2 (Paleta) son utilizados para formas farmacéuticas sólidas y de liberación modificada. El Aparato 3 (Cilindro Reciprocante) ha presentado gran utilidad para formas farmacéuticas de liberación modificada (retardada). El Aparato 4 (Celda de Flujo Continuo) representa una alternativa para fármacos con una solubilidad pobre. Este aparato se considera para evaluar la disolución de formas farmacéuticas de liberación modificada. El Aparato 5 (Paleta sobre Disco "Paddle

over Disk") y el Aparato 6 (Cilindro Rotatorio) se emplean para formas farmacéuticas de liberación transdérmica. Finalmente, el Aparato 7 (Disco Reciprocante) puede aplicarse tanto a formas farmacéuticas sólidas como a formulaciones transdérmicas.

Dada la importancia de esta prueba, las condiciones y el equipo en las que se llevará a cabo deben cumplir con los lineamientos de la USP 23 en su capítulo de *Disolución* <711> para formas farmacéuticas de liberación inmediata y en el capítulo *Liberación del Fármaco* <724> para formas farmacéuticas de liberación modificada. Así mismo, el método analítico utilizado para la cuantificación del principio activo debe ser validado de acuerdo al procedimiento señalado en el capítulo de *Validación de Métodos Compendiales* <1225> de la USP 23, ya que cualquier prueba de disolución carece de utilidad sino se cuenta con un método analítico confiable. Este punto, de igual importancia que el establecimiento del método de disolución es el objetivo principal de este trabajo de tesis.

2.4 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (14, 15, 16, 17, 18, 19)

Los primeros análisis de fármacos por cromatografía se realizaron durante la década de los 50's, aplicándose al seguimiento de la síntesis de fármacos, en el análisis de su pureza o la determinación de su estabilidad en las formas farmacéuticas.

Actualmente la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) es una técnica analítica muy utilizada para el análisis de fármacos, tanto en formas farmacéuticas como en fluidos biológicos, debido a su alta especificidad, sencillez y sensibilidad.

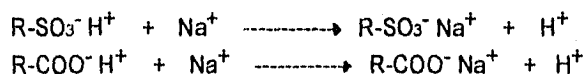
De acuerdo al mecanismo de retención, existen varios tipos de CLAR.

La Cromatografía de Adsorción o Cromatografía Líquido-Sólido utiliza como fase estacionaria sólidos con un área superficial elevada, generalmente compuestos polares como la alúmina o la sílica y fases móviles no polares como el cloroformo o el heptano. En este tipo de cromatografía el compuesto de interés compete con la fase móvil por los sitios activos de la fase estacionaria.

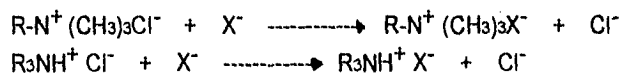
En la Cromatografía de Partición o Cromatografía Líquido-Líquido, el soporte sólido es recubierto con una fase estacionaria líquida. El mecanismo de retención se basa en la distribución (partición) relativa que presenta el compuesto

entre la fase móvil y la fase estacionaria. Cuando la fase estacionaria es polar y la fase móvil es no polar, se denomina cromatografía de fase normal, mientras que el caso contrario, fase estacionaria no polar y fase móvil polar, se conoce como cromatografía de fase reversa. En los primeros trabajos con este tipo de cromatografía, la fase estacionaria consistía en una capa líquida adsorbida a una superficie de sílica o alúmina; la cual presentaba un gran desgaste, debido a que la fase estacionaria se disolvía en la fase móvil. Durante los últimos años, se ha generalizado el uso de fases químicamente unidas al soporte sólido para este tipo de cromatografía.

La Cromatografía de Intercambio Iónico presenta un mecanismo de retención basado en las interacciones electrostáticas entre la muestra y la fase móvil con la fase estacionaria. La fase estacionaria consiste en una matriz polimérica a la cual se han fijado grupos cargados y sus respectivos contraiones (que pueden ser intercambiados). Los materiales de relleno se clasifican como intercambiadores catiónicos o aniónicos, los cuales se subdividen en intercambiadores de iones fuertes o débiles. Dentro de los intercambiadores de cationes fuertes el grupo más empleado es el ácido sulfónico ($R-SO_3^- H^+$), mientras que los ácidos carboxílicos son usados como intercambiadores catiónicos débiles. Las reacciones de intercambio catiónico ocurren de la siguiente manera:



Las resinas de intercambio aniónico frecuentemente contienen grupos de amonio cuaternario en el caso de intercambiadores fuertes, mientras que para los intercambiadores débiles son aminas terciarias. Ejemplos de reacciones de intercambio aniónico son:



La Cromatografía de Permeación en Gel o de Exclusión de Tamaño lleva a cabo la separación de un compuesto de acuerdo al tamaño de la molécula. Los materiales utilizados como fase estacionaria contienen poros de tamaños determinados. Las moléculas de gran tamaño no pueden penetrar los poros por lo que eluyen rápidamente; mientras que las de menor tamaño, al penetrar en los poros quedan retenidas y eluyen con menor rapidez.

El tipo de cromatografía más utilizado en el análisis farmacéutico es la cromatografía de partición en fase reversa, en la cual la fase estacionaria se encuentra químicamente unida al soporte sólido. La mayoría de estas fases están formadas de una parte orgánica (frecuentemente una cadena hidrocarbonada larga) unida al grupo silanol de la sílica, siendo los grupos más comunes el octadecilo (C₁₈) y el octilo (C₈). Otros grupos como el fenilo, éster, diol, amino, nitro, y ciano han sido unidos a la sílica y se encuentran de manera comercial, permitiendo obtener distintos tipos de selectividad. La estabilidad de las fases químicamente unidas depende del pH, con valores de pH menores a 2, ocurre la ruptura del enlace Si-C, en tanto que a un pH mayor a 8, la sílica se disuelve. Así mismo, también ocurre una degradación de la columna en presencia de concentraciones elevadas de sales.

Para minimizar la degradación de este tipo de fases, se ha recurrido a varias alternativas. La primera de ellas, conocida como *end-cap*, consiste en unir a los grupos silanol libres con una cadena hidrocarbonada pequeña (generalmente C₃). Este tipo de fases siguen siendo estables a valores de pH arriba de 10. Otra técnica desarrollada consiste en recubrir la sílica gel con un polímero (polimetil octadecilsilano), reportando ser estable a pH altos y en diferentes disolventes.

Como ya se mencionó, en la cromatografía de fase reversa la fase móvil es polar, siendo el componente principal el agua. Para ajustar la polaridad de la fase móvil, se adicionan disolventes orgánicos miscibles en agua, como metanol, acetonitrilo, etanol, 1-propanol, 2-propanol, dioxano, tetrahidrofurano y dimetilformamida, también se agregan soluciones amortiguadoras, tensoactivos, ácidos y bases.

Dentro de la instrumentación en la CLAR, los detectores representan una parte importante. Algunos de los parámetros que deben considerarse al seleccionar un detector son la sensibilidad, linealidad, selectividad y ruido.

Los detectores de UV-Visible son los más útiles en el análisis de fármacos, ya que la mayoría de estos compuestos presentan las características estructurales adecuadas para absorber luz en estas regiones. El funcionamiento de estos detectores se basa en la ley de Beer, la cantidad de luz transmitida por un compuesto es proporcional a la longitud de la trayectoria del compuesto a través de la cual el haz de luz debe pasar y a la concentración de éste. Existen dos tipos de detectores de UV-Visible: el de longitud de onda fija y el de longitud de onda variable. El primero generalmente opera a una longitud de onda de 254nm, utilizando una lámpara de vapor de mercurio a baja presión como fuente de luz. Otras longitudes de onda que se manejan en este tipo de detector son: 214, 220, 229, 280, 313, 334 y 365nm; sin embargo, muchos de los fármacos absorben a 254nm, haciendo de esta longitud de onda una de las más empleadas. Los detectores de longitud de onda variable presentan la ventaja de poder seleccionar la longitud de onda óptima para una muestra determinada, mejorando la sensibilidad y/o selectividad.

Los detectores de fluorescencia se encuentran entre los más sensibles y con una alta selectividad dentro de la CLAR. La alta selectividad se debe a que pocos fármacos emiten luz cuando son excitados por la luz UV. En cuanto a la mayor sensibilidad, ésta es debida a que la intensidad de fluorescencia depende de la intensidad de luz de excitación. Las fuentes de excitación más comunes son las lámparas de tungsteno o de deuterio; y la selección de la longitud de onda tanto de emisión como de excitación, se realiza por medio de filtros o monocromadores. Dentro de la investigación farmacéutica, estos detectores han sido usados ampliamente en el análisis de fármacos en fluidos biológicos, donde son necesarios niveles de sensibilidad mayores que los requeridos para formas farmacéuticas, alcanzando en muchas ocasiones una sensibilidad 100 veces mayor que en la detección por UV.

Otros detectores utilizados en CLAR son el de índice de refracción y el electroquímico. El detector de índice de refracción mide la diferencia entre los índices de refracción del disolvente puro y del compuesto de interés que sale de la columna y es utilizado para compuestos que no absorben en la región UV. Sin embargo, es sumamente sensible a los cambios de temperatura; por lo tanto, debe existir un estricto control de la temperatura de la fase móvil, la columna y el detector para obtener determinaciones precisas y confiables.

Los detectores electroquímicos son usados en la detección de fármacos que pueden ser oxidados o reducidos al aplicar un potencial al electrodo de trabajo. Los detectores amperométricos, polarográficos y coulombimétricos son ejemplos de este tipo de detector. Debido a su alta especificidad y selectividad, su uso ha ido en aumento en los últimos años.

2.5 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS (1, 26, 27)

La USP 23 en su sección de *Validación de Métodos Compendiales <1255>*, define la Validación de un Método Analítico como el proceso por el cual se establece, por estudios de laboratorio, que las características de un método cumplen con los requisitos para la aplicación analítica deseada.

Debido a la gran variedad de ensayos, el esquema de validación de un método varía de acuerdo a la naturaleza del método analítico. Las categorías de ensayo más comunes son 3 (1):

Categoría I: Métodos analíticos para la cuantificación de los compuestos de interés, en materias primas o en productos terminados.

Categoría II: Métodos analíticos para la determinación de impurezas en materias primas o productos de degradación en productos terminados, tanto ensayos cuantitativos como pruebas límites.

Categoría III: Métodos analíticos para la determinación de las características de comportamiento de un producto, como la disolución o liberación del fármaco.

Los requisitos de validación para cada una de las categorías se presentan en la tabla siguiente:

Tabla 2.3. Parámetros Analíticos de Validación (1).

PARÁMETRO ANALÍTICO	CATEGORÍA I	CATEGORÍA II		CATEGORÍA III
		CUANTITATIVO	PRUEBA LÍMITE	
EXACTITUD	SI	SI	*	*
PRECISIÓN	SI	SI	NO	SI
ESPECIFICIDAD	SI	SI	SI	*
LÍMITE DE DETECCIÓN	NO	NO	SI	*
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	NO	SI	NO	*
LINEALIDAD	SI	SI	NO	*
INTERVALO DINAM. DE TRABAJO	SI	SI	*	*
TOLERANCIA	SI	SI	SI	SI

* Puede requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba.

El método que se propone en esta tesis, se ha identificado dentro de la categoría III. Por lo tanto, los parámetros analíticos que se requieren para la validación de un método de esta categoría son: Precisión y Tolerancia; mientras que la Exactitud, Especificidad, Límite de Detección, Límite de Cuantificación, Linealidad e Intervalo Dinámico de Trabajo son parámetros optativos, que pueden ser evaluados dependiendo de la naturaleza de la prueba.

De acuerdo a la aplicación del método analítico, se establecieron como necesarios los siguientes parámetros de validación:

Exactitud

La exactitud de un método analítico es la cercanía de los resultados de la prueba, obtenidos por el método, respecto al valor verdadero. Esta frecuentemente puede expresarse como el porcentaje de recobro de cantidades conocidas del compuesto de interés.

La exactitud puede determinarse aplicando el método a muestras adicionadas con cantidades conocidas del compuesto de interés, las cuales abarcan niveles mayores y menores de los esperados normalmente.

Precisión

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados individuales de la prueba cuando es aplicado de manera repetida a varias muestras provenientes de una muestra homogénea. La precisión de un método analítico puede expresarse como la desviación estándar o desviación estándar relativa (coeficiente de variación). La precisión puede ser evaluada como la medida del grado de reproducibilidad, de precisión intermedia o de repetibilidad de un método analítico bajo condiciones normales de operación. La reproducibilidad se refiere al uso del método analítico en diferentes laboratorios. La precisión intermedia expresa las variaciones intralaboratorio, como la aplicación del método analítico en diferentes días, o por diferentes analistas o con equipos distintos dentro del mismo laboratorio. La repetibilidad se refiere al uso del procedimiento analítico dentro de un laboratorio, por un período de tiempo corto, realizado por el mismo analista y con el mismo equipo.

Este parámetro puede determinarse mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas tomadas de una muestra homogénea, y calcular los estimados de desviación estándar y desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una manera estadísticamente válida. Los análisis bajo este contexto, son análisis independientes de muestras a las que se les ha aplicado el procedimiento analítico completo, desde la preparación de la muestra hasta la obtención del resultado.

Especificidad

La especificidad consiste en la habilidad del método de medir con exactitud y específicamente la sustancia de interés, en presencia de otros componentes que se espera estén presentes en la matriz de la muestra. La especificidad puede expresarse como el grado de desviación (sesgo) de los resultados obtenidos al analizar muestras a las que se les ha adicionado impurezas, productos de

degradación compuestos relacionados o componentes de la formulación, al compararlos con los resultados del análisis de muestras sin estos compuestos. La especificidad es una medida del grado de interferencia al analizar muestras complejas.

La determinación puede realizarse mediante la comparación de los resultados del análisis de muestras a las que se les ha adicionado productos de degradación, impurezas o componentes de la formulación con los resultados del análisis de muestras que no contienen estos compuestos.

Límite de Cuantificación

El límite de cuantificación representa la concentración más baja del compuesto de interés que puede ser determinado bajo las condiciones experimentales establecidas, con un grado aceptable de exactitud y precisión. Este parámetro puede expresarse como la concentración del compuesto de interés en la muestra.

Linealidad e Intervalo Dinámico de Trabajo

La linealidad de un método analítico es su capacidad de generar resultados, que directamente o por una transformación matemática, son proporcionales a la concentración del principio activo dentro de un intervalo. La linealidad puede expresarse en términos de varianza de la pendiente de la recta de regresión, la cual es calculada a partir de la relación matemática establecida de los resultados del análisis de muestras con concentraciones variables del compuesto de interés.

El intervalo dinámico de trabajo es el intervalo entre los niveles superior e inferior del compuesto de interés (incluyendo éstos) en el cual se ha demostrado que el método cumple con los requisitos de exactitud, precisión y linealidad. El intervalo dinámico de trabajo se puede expresar en las mismas unidades que los resultados obtenidos al aplicar el método analítico.

La linealidad puede determinarse por un tratamiento matemático de los resultados del análisis de muestras con concentraciones de la sustancia de interés, dentro del intervalo dinámico de trabajo establecido para el método. El tratamiento matemático consiste en el cálculo de la recta de regresión por el método de mínimos cuadrados. La pendiente de la recta de regresión y su varianza proporcionan una medida de la linealidad mientras que el intercepto de la recta es una medida de la desviación. Otra alternativa es graficar los resultados obtenidos como una función de la concentración del compuesto de interés.

El intervalo dinámico de trabajo es validado al verificar que el método analítico presenta una precisión, exactitud y linealidad aceptables a lo largo del intervalo establecido.

Tolerancia

La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad (en algunos casos de repetibilidad) de los resultados obtenidos por el análisis de las mismas muestras bajo una variedad de condiciones de prueba como diferentes laboratorios, diferentes analistas, diferentes temperaturas, diferentes lotes de reactivos, diferentes días, diferentes periodos de análisis, etc. La tolerancia puede ser expresada como la carencia de influencia de los resultados de la prueba a las variables operacionales del método analítico.

Este parámetro se puede determinar por el análisis de alicuotas de lotes homogéneos en diferentes laboratorios, por diferentes analistas, bajo condiciones operacionales que pueden diferir, pero que se mantienen dentro de los parámetros específicos del método. El grado de reproducibilidad entonces puede determinarse como una función de las variables de prueba. Esta reproducibilidad puede compararse con la precisión del método bajo condiciones normales para obtener la tolerancia del método analítico.

CAPITULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 EQUIPOS, INSTRUMENTOS, MATERIAL, REACTIVOS Y SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Equipos e Instrumentos

-Sistema Cromatográfico:

- Bomba de flujo isocrático, Waters, Modelo 510
- Inyector automático, Waters, Modelo 712 WISP
- Detector UV de longitud de onda variable, Waters, Modelo 486
- Detector de fluorescencia, Waters, Modelo 474
- Módulo integrador de datos, Waters, Modelo 745
- Módulo integrador de datos, Beckman, Modelo 427
- Columna analítica μ Bondapak C₁₈, 3.9mm de diámetro interno, 15cm de longitud y 10 μ m de tamaño de partícula de forma irregular
- Columna analítica μ Bondapak CN, 3.9mm de diámetro interno, 15cm de longitud y 10 μ m de tamaño de partícula de forma irregular (baja eficiencia)
- Columna analítica μ Bondapak CN, 3.9mm de diámetro interno, 15cm de longitud y 10 μ m de tamaño de partícula de forma irregular (alta eficiencia)

- Balanza analítica, Mettler, Modelo AE260
- Potenciómetro, Beckman pH145
- Baño de ultrasonido, Cole Parmer, Modelo 8851P
- Agitador tipo vórtice, Thermolyne, Modelo M37615
- Refrigerador, Ojeda, Modelo RV2P-3P
- Pipetas de transferencia de volumen variable, Finnipipette, con los siguientes intervalos de trabajo: 5 a 50 μ L, 50 a 200 μ L, 200 a 1000 μ L y 1 a 5mL

Reactivos

- Agua HPLC, obtenida de equipo MilliQ de Waters
- Acetonitrilo HPLC, Fisher
- 2-Propanol HPLC, Mallinckrodt
- Metanol HPLC, Fisher
- Fosfato de Sodio Monobásico R. A., J. T. Baker
- Hidróxido de Sodio R.A., J. T. Baker
- Acido Fosfórico R. A., Merck
- Cloruro de Benzalconio R.A., Sigma
- Dodecilsulfato de Sodio R.A., Sigma
- Cloruro de Sodio R.A., Merck
- Polisorbato 80 (Tween 80) Materia Prima, Spectrum
- Polietilenglicol 8000 Materia Prima, Spectrum

Sustancias de Referencia

- Estradiol, Sustancia de Referencia
- Progesterona, Sustancia de Referencia
- Colesterol, Sustancia de Referencia
- Metilparabeno, Sustancia de Referencia
- Propilparabeno, Sustancia de Referencia

3.2 ANTECEDENTES

3.2.1 PLANTEAMIENTO

Con el fin de obtener una formulación de liberación retardada para aplicarse como anticonceptivo o en terapia de reemplazo, se han desarrollado microesferas de Estradiol y Progesterona. Durante esta etapa de desarrollo, la prueba de disolución constituye un punto clave para conocer la cinética de liberación de los activos y obtener un estimado de la biodisponibilidad de la formulación, que ayudarán a establecer una correlación IN VIVO / IN VITRO. Ante la importancia de esta prueba, fue necesario establecer un método analítico adecuado y confiable para la cuantificación de Estradiol y Progesterona.

El método analítico se desarrolló paralelamente al desarrollo del método de disolución y al de formulación, llevando a considerar diferentes variables:

- Dosis de los Principios Activos
- Composición del Medio de Disolución. desde agua hasta disoluciones amortiguadoras
- Volumen de Disolución. desde 1L hasta 40L
- Uso de Tensoactivos. como el dodecilsulfato de sodio o el cloruro de benzalconio
- Formulación

De esta manera, conociendo la mejor y peor situación, el método analítico se diseñó para que pudiera cubrir las situaciones extremas y fuera específico para los principios activos frente a las diferentes variables.

3.2.2. TRABAJO PREVIO

En un inicio, basándose en la monografía del Estradiol de la USP 23 (1), se propuso un método de cuantificación por CLAR con detección al UV a 205nm para el Estradiol y a 256nm para la Progesterona sin alcanzar los niveles de sensibilidad necesarios para el Estradiol, debido a que la concentración teórica de Estradiol disuelta queda en el orden de ng/mL.

Para aumentar la sensibilidad en la determinación del Estradiol y con base en lo reportado por Hühn (28), se utilizó la detección por fluorescencia, montando un detector de fluorescencia en línea al detector de UV, quedando el siguiente sistema cromatográfico:

Fase Móvil:	Acetonitrilo:Agua (60:40)	
Columna:	µBondapak C ₁₈ 15cm X 3.9mm partículas irregulares 10µm	
Flujo:	0.8mL/min	
Detección:	Estradiol	Fluorescencia 281-305nm (ex/em)
	Progesterona	UV 256nm
Respuesta:	Estradiol	Alturas
	Progesterona	Alturas

Al inyectar muestras provenientes de perfiles de disolución que utilizaban Dodecilsulfato de sodio como medio de disolución, se observaron interferencias de este medio con el Estradiol (Figura 3.1). Se intentó eliminar dichas interferencias,

modificando la polaridad de la fase móvil así como el flujo sin embargo, no se logró una resolución adecuada

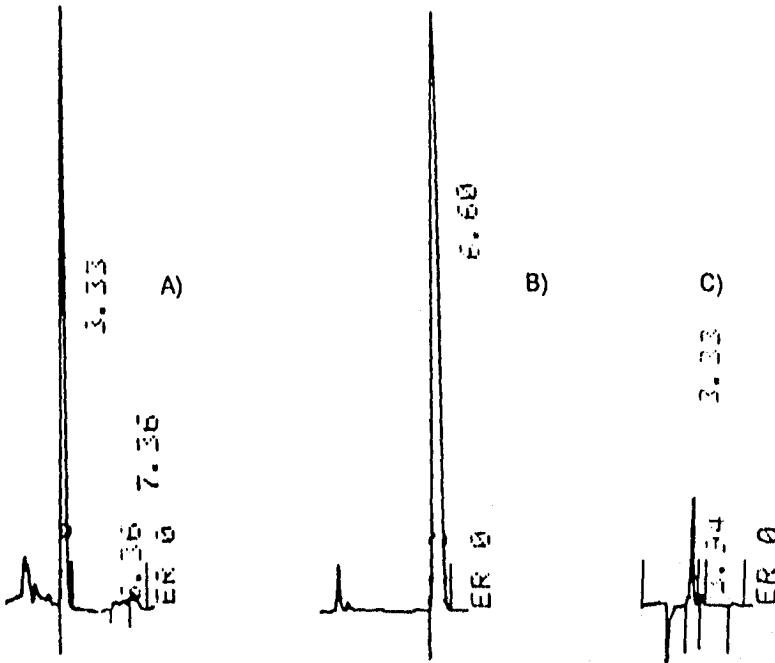


Figura 3.1.

Cromatogramas de los activos utilizando como fase móvil Acetonitrilo:Agua (60:40) a un flujo de 0.8mL/min. A) Estradiol. B) Progesterona C) Muestra con Dodecilsulfato de sodio.

3.3 DESARROLLO DEL MÉTODO

Con los resultados obtenidos en el trabajo previo, se decidió reproducir un método indicador de estabilidad, desarrollado para microesferas de Estradiol (29), utilizando una columna C₁₈ de 15cm X 3.9mm, con una fase móvil Acetonitrilo:Agua:2-Propanol (20:60:20) y a un flujo de 2mL/min, pero conservando

la detección por UV para la Progesterona y la detección por fluorescencia para el Estradiol. Al realizar inyecciones de los posibles medios de disolución específicamente disoluciones amortiguadoras de fosfatos a pH 4.0 y 7.4 se observó una desestabilización de la línea base por efecto del cambio de pH, por lo que se modificó la fase móvil, sustituyendo el agua por una solución amortiguadora de fosfatos. (Figura 3.2.)

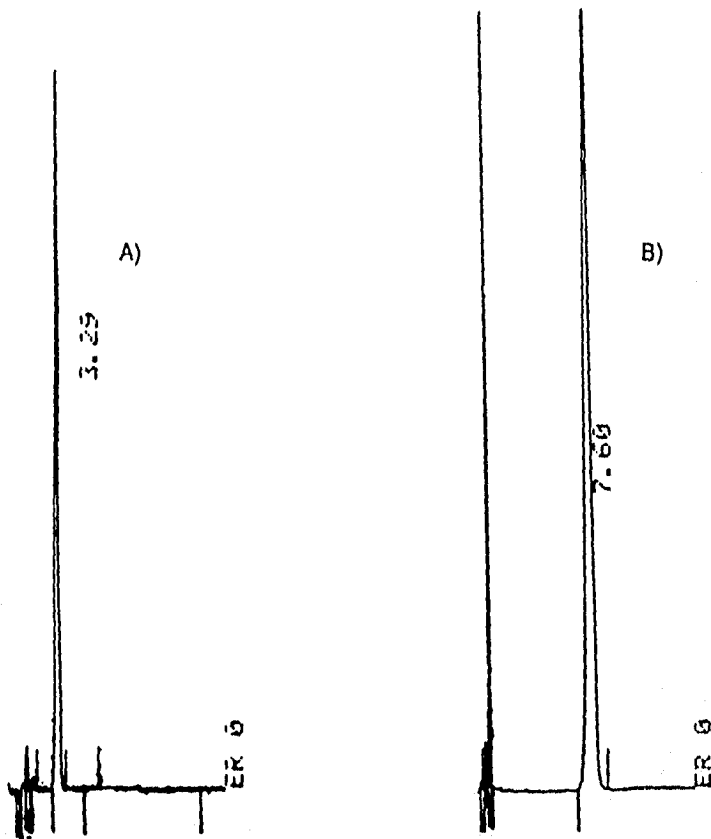


Figura 3.2.

Cromatogramas de los activos utilizando una fase móvil Acetonitrilo:Agua:2-Propanol (20:60:20) a un flujo de 2mL/min. A) Estradiol. B) Progesterona.

Al realizar inyecciones de los otros posibles medios de disolución, se observó que el Dodecilsulfato de sodio volvió a interferir con el Estradiol, por lo que se modificó la selectividad de la fase estacionaria, reemplazando la columna C₁₈ por una columna Ciano, además se modificaron las proporciones de la fase móvil.

Posteriormente, se vió que los medios de disolución afectaban el equilibrio fase móvil/fase estacionaria del Estradiol y la Progesterona, presentando diferencias en la respuesta, cuando la integración se realizaba por alturas. El modo de integración se modificó por áreas, obteniendo diferencias en la respuesta no mayores al 10% para cada medio de disolución. Con las modificaciones realizadas al sistema cromatográfico, se siguieron efectuando pruebas de sondeo de perfiles de disolución para verificar la eficacia del método, así como para establecer los criterios de aceptación para su validación, ya que no se cuenta con ninguna información bibliográfica sobre este punto.

Finalmente las condiciones del método desarrollado, fueron las siguientes:

Fase Móvil	Acetonitrilo:Fosfato de sodio monobásico 0.05M:2-Propanol (10:80:10) pH=5.0 ± 0.05
Columna	µBondapak CN 3.9mmX15cm, partículas irregulares 10µm
Flujo	2mL/min
Vol. de Inyección	100µL
Detección	Estradiol Fluorescencia 281-305nm (ex/em) Progesterona UV 256nm
Respuesta	Estradiol Areas Progesterona Areas

3.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Considerando las aplicaciones del método analítico desarrollado, la validación se realizó bajo los siguientes parámetros:

Exactitud

La exactitud se evaluó preparando muestras adicionadas en agua como medio de disolución, a las concentraciones de 5.000, 15.00, 80.00 y 180.0ng/mL para Estradiol y de 0.5000, 0.7000, 2.500 y 7.000µg/mL para Progesterona. Las muestras fueron preparadas por quintuplicado durante tres días y se interpolaron en su respectiva curva patrón, obteniendo la concentración interpolada, a partir de la cual, se calculó el porcentaje de recobro.

Se consideró la prueba con una exactitud adecuada si el promedio del porcentaje de recobro no presentaba una desviación absoluta (expresada como porcentaje de desviación absoluta) mayor al 10%, respecto al valor nominal, excepto en las concentraciones de 5.000ng/mL para Estradiol y de 0.5000µg/mL

para Progesterona en donde el criterio fue no mayor al 15% respecto al valor nominal.

Precisión

La precisión se evaluó como repetibilidad y precisión intermedia. Ambos parámetros se evaluaron con los resultados de la prueba de exactitud.

Para la repetibilidad, se calculó el promedio del porcentaje de recobro, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada nivel de concentración y el promedio del coeficiente de variación para todos los niveles para cada día.

La precisión intermedia se determinó con el cálculo del promedio del coeficiente de variación de los 3 días de exactitud.

La prueba se consideró con una precisión adecuada, si los coeficientes de variación fueron menores al 10%, excepto en el caso de las concentraciones de 5.000ng/mL para Estradiol y de 0.5000µg/mL para Progesterona, en donde el criterio fue que el valor resultara menor al 15%.

Especificidad

Conociendo las condiciones extremas del método de disolución para las microesferas, la especificidad del método se evaluó de la siguiente manera:

a) Especificidad. La respuesta de los medios de disolución propuestos y la de un placebo preparado con los posibles componentes de la formulación, se comparó con la respuesta generada por el Estradiol y la Progesterona.

El método analítico se consideró específico si los medios de disolución y el placebo no presentaban interferencias en el área donde se registra la señal de los compuestos de interés.

Se emplearon 5 diferentes medios de disolución:

Medio	Composición
A	Agua
B	Amortiguador de Fosfatos 0.2M pH=4.0
C	Amortiguador de Fosfatos 0.2M pH=7.4
D	Dodecilsulfato de Sodio al 0.3% (P/V)
E	Cloruro de Benzalconio al 0.1% (P/V)

Los posibles componentes de la formulación analizados fueron:

Polietilenglicol 8000
Polisorbato 80 (Tween 80)

Cloruro de Sodio
Metilparabeno
Propilparabeno
Colesterol

b) Efecto de los Medios de Disolución. Se prepararon muestras adicionadas en los 5 medios de disolución por triplicado, a las concentraciones de 15.00, 80.00 y 150.0ng/mL para Estradiol y de 0.7000, 2.500 y 7.000µg/mL para Progesterona. Las muestras fueron interpoladas en una curva patrón, obteniendo la concentración interpolada, a partir de la cual, se calculó el porcentaje de recobro.

Los promedios de porcentaje de recobro para cada medio de disolución no debieron diferir en más del 10% respecto a los promedios obtenidos en agua.

Límite de Cuantificación

A partir del punto más bajo de cada curva patrón, se estableció la concentración de 5.000ng/mL para Estradiol y de 0.5000µg/mL para Progesterona como límite de cuantificación.

A partir de los puntos globales se obtuvo el promedio, la desviación estándar, el coeficiente de variación y la desviación absoluta (como porcentaje de desviación absoluta). Ambas concentraciones debieron cumplir con los criterios de aceptación de exactitud y precisión.

Linealidad e Intervalo Dinámico de Trabajo

Una vez que se determinó el máximo volumen de disolución, el intervalo dinámico de trabajo se fijó entre un 4% y un 150% de la concentración final esperada considerando que el Estradiol y la Progesterona se disuelven en un 100% en el medio de disolución.

De acuerdo a lo anterior, se estableció una curva patrón en fase móvil con 6 puntos a las concentraciones de 5.000, 10.00, 20.00, 50.00, 100.0 y 200.0ng/mL para Estradiol y de 0.5000, 1.000, 2.000, 4.000, 6.000 y 8.000µg/mL para Progesterona. Esta curva patrón se generó durante 4 días consecutivos. Para cada una de las curvas generadas se obtuvo la ecuación de la recta mediante un análisis de regresión por el método de mínimos cuadrados, tomando como variable independiente (x) a la concentración y como variable dependiente (y) al área de los compuestos. Para cada punto de las curvas patrón se estimó la calidad de ajuste (la calidad de ajuste se obtiene al interpolar los puntos de la curva patrón en la recta de regresión generada por estos mismos puntos) y se obtuvo el promedio, la desviación estándar, el coeficiente de variación y la desviación absoluta por nivel de concentración.

Las curvas patrón debieron presentar un coeficiente de determinación mayor a 0.98 y el promedio de concentración interpolada para cada punto no debió estar fuera del 10% de la cantidad adicionada (a excepción de las concentraciones de 5.000ng/mL para Estradiol y 0.5000µg/mL para Progesterona, que no debieron alejarse más del 15%) para considerar que existe una relación lineal dentro del intervalo establecido.

Tolerancia

La tolerancia del método analítico se determinó de 2 formas:

- a) Estabilidad de la Muestra en el Medio de Disolución a Temperatura Ambiente y Refrigeración. Se prepararon muestras adicionadas en los 5 medios de disolución en concentraciones de 15.00 y 150.0ng/mL para Estradiol y de 0.7000 y 7.000µg/mL para Progesterona. Las muestras se cuantificaron a las 0, 24, 48 y 72horas después de ser almacenadas a temperatura ambiente y refrigeración (2-8°C), contra una curva patrón recién preparada.

La muestra se consideró estable durante el período en el cual la concentración interpolada no presentara una diferencia mayor al 10% de la cantidad adicionada y cumpliera con los criterios de aceptación, de exactitud y de precisión.

- b) Tolerancia al Cambio de Columna. El parámetro se evaluó analizando una curva patrón, los medios de disolución y el placebo en dos columnas distintas en cuanto a eficiencia, pero con las mismas características: la columna utilizada durante la validación (columna de baja eficiencia), y una columna nueva (columna de alta eficiencia).

El método se consideró con una tolerancia adecuada, si la curva patrón cumplía con los criterios de aceptación de linealidad e intervalo dinámico de trabajo y los medios de disolución y el placebo no presentaban interferencias en la región cromatográfica de los compuestos de interés.

CAPÍTULO 4 RESULTADOS

4.1 Exactitud

La tabla 4.1 muestra los resultados de Exactitud para Estradiol durante los 3 días de análisis y la tabla 4.2 presenta los resultados de Exactitud obtenidos para Progesterona.

Tabla 4.1. Exactitud de Muestras Adicionadas de Estradiol en Agua.

DÍA	REPLICA	CONCENTRACION ADICIONADA (ng/mL)			
		5,000	15,00	80,00	180,0
		PORCENTAJE DE RECOBRO			
1	1	108,3	101,8	98,3	98,2
	2	101,0	94,5	99,9	98,6
	3	103,8	99,9	100,3	99,3
	4	89,0	99,8	100,9	98,5
	5	100,7	99,1	101,1	99,2
2	1		99,7	95,1	94,2
	2	107,9	105,5	94,6	95,0
	3	107,4	98,0	96,3	95,5
	4	109,3	96,6	95,1	94,7
	5	95,1	100,3	96,8	96,5
3	1	103,4	98,9	101,4	99,3
	2	96,3	95,9		98,3
	3	101,2	100,4	101,3	99,7
	4	108,2	100,9	102,0	99,1
	5	114,4	97,6	101,2	99,0
	n	14	15	14	15
	PROMEDIO	103,3	99,3	98,9	97,7
	D. E.	6,71	2,63	2,75	1,93
	CV.	6,49	2,65	2,78	1,98
	% DA	3,29	0,74	1,13	2,34

Tabla 4.2. Exactitud de Muestras Adicionadas de Progesterona en Agua.

DIA	REPLICA	CONCENTRACION ADICIONADA ($\mu\text{g/mL}$)			
		0,5000	0,7000	2,500	7,000
		PORCENTAJE DE RECOBRO			
1	1	91,8	95,9	99,1	99,5
	2	90,6	95,2	98,4	98,1
	3	91,9	93,5	97,6	100,7
	4	91,2	92,9	97,0	99,8
	5	91,3	94,2	98,3	99,7
2	1	88,4	94,7	96,6	97,7
	2	91,7	95,5	96,2	91,5
	3	91,3	93,0	96,6	98,3
	4	91,9	92,9	95,7	95,9
	5	88,8	95,1	96,2	97,6
3	1	101,6	101,0	96,5	99,8
	2	100,1	98,4	96,5	99,1
	3	100,2	101,4	96,4	97,2
	4	102,0	99,2	96,3	99,5
	5	96,3	96,2	95,5	97,3
	n	15	15	15	15
	PROMEDIO	93,9	95,9	96,9	98,1
	D.E.	4,73	2,83	1,03	2,25
	C.V.	5,04	2,95	1,07	2,29
	% D.A.	6,06	4,06	3,14	1,89

Como se observa en la tabla 4.1, la desviación máxima para el Estradiol es del 3.29% respecto al valor nominal, que corresponde a la concentración de 5.000ng/mL y en la tabla 4.2, para el caso de la Progesterona, la desviación máxima respecto al valor nominal es del 6.06% que corresponde a la concentración de 0.5000 $\mu\text{g/mL}$. Debido a que estos valores son menores al 10%, (incluyendo las concentraciones de 5.000ng/mL para Estradiol y 0.5000 $\mu\text{g/mL}$ para Progesterona donde el criterio de aceptación es del 15%), se considera que el método cumple con los requisitos de exactitud para ambos principios activos.

4.2 Precisión

A) Repetibilidad. En las tablas 4.3 y 4.4 se encuentran los resultados para Estradiol y Progesterona respectivamente.

Tabla 4.3. Repetibilidad de las Muestras Adicionadas de Estradiol en Agua.

DIA		CONCENTRACION ADICIONADA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)				C.V.
		5,000	15,00	80,00	180,0	
		PORCENTAJE CUANTIFICADO				
1	n	5	5	5	5	2,88
	PROMEDIO	100,6	99,0	100,1	98,8	
	D.E	7,16	2,72	1,10	0,49	
	C.V.	7,12	2,74	1,10	0,49	
2	n	4	5	5	5	2,88
	PROMEDIO	105,0	100,0	95,0	95,2	
	D.E	6,59	3,38	0,91	0,87	
	C.V.	6,28	3,38	0,95	0,91	
3	n	5	5	4	5	2,39
	PROMEDIO	104,7	98,7	101,5	99,1	
	D.E	6,91	2,05	0,38	0,49	
	C.V.	6,60	2,07	0,37	0,49	

Tabla 4.4. Repetibilidad de Muestras Adicionadas de Progesterona en Agua.

DIA		CONCENTRACION ADICIONADA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)				C.V.
		0,5000	0,7000	2,500	7,000	
		PORCENTAJE DE RECUBRO				
1	n	5	5	5	5	0,92
	PROMEDIO	91,4	94,3	98,1	99,6	
	D.E	0,54	1,25	0,80	0,94	
	C.V.	0,59	1,32	0,82	0,95	
2	n	5	5	5	5	1,59
	PROMEDIO	90,4	94,2	96,3	96,2	
	D.E	1,66	1,23	0,34	2,77	
	C.V.	1,83	1,31	0,36	2,88	
3	n	5	5	5	5	1,52
	PROMEDIO	100,0	99,3	96,2	98,6	
	D.E	2,26	2,09	0,44	1,24	
	C.V.	2,26	2,11	0,46	1,26	

B) Precisión Intermedia. La tabla 4.5 muestra los resultados para Estradiol y la tabla 4.6 muestra los resultados para Progesterona.

Tabla 4.5. Precisión Intermedia de las Muestras Adicionadas de Estradiol en Agua.

		CONCENTRACION ADICIONADA (ng/mL)				
		5,000	15,00	80,00	180,0	
		PORCENTAJE DE RECOBRO				C.V.
n	=	14	15	14	15	
PROMEDIO	=	103,3	99,3	98,9	97,7	
D. E.	=	6,71	2,63	2,75	1,93	
C.V.	=	6,49	2,65	2,78	1,98	3,47

Tabla 4.6. Precisión Intermedia de las Muestras Adicionadas de Progesterona en Agua.

		CONCENTRACION ADICIONADA (µg/mL)				
		0,5000	0,7000	2,500	7,000	
		PORCENTAJE DE RECOBRO				C.V.
n	=	15	15	15	15	
PROMEDIO	=	93,9	95,9	96,9	98,1	
D. E.	=	4,73	2,83	1,03	2,25	
C.V.	=	5,04	2,95	1,07	2,29	2,84

De acuerdo a los resultados de repetibilidad, para el Estradiol el coeficiente de variación máximo por nivel de concentración fue de 7.12%, que corresponde a la concentración de 5.000ng/mL y el promedio de coeficiente de variación máximo por día fue de 2.88%. La Progesterona presentó un coeficiente de variación máximo por nivel de concentración de 2.88% para la concentración de 7.000µg/mL y un promedio de coeficiente de variación máximo por día de 1.59%.

La precisión intermedia presentó un promedio de coeficiente de variación de los 3 días que duró el experimento de 3.47% para el Estradiol y de 2.84% para la Progesterona.

En todos los casos, el coeficiente de variación fue menor al 10%, por lo tanto, se considera que el método presenta una adecuada precisión, evaluada como repetibilidad y como precisión intermedia, para ambos compuestos.

4.3 Especificidad

a) Especificidad. La figura 4.1 muestra los cromatogramas típicos de Estradiol y Progesterona en fase móvil.

En las figuras 4.2 y 4.3 aparecen los cromatogramas de los medios de disolución y el placebo por UV y fluorescencia, respectivamente.

De acuerdo a los cromatogramas de estas figuras, los diferentes medios de disolución y el placebo no presentaron interferencias en la región cromatográfica donde se registran la señal del Estradiol y de la Progesterona. Sin embargo, debido a la respuesta que se observa para el Dodecilsulfato de Sodio por fluorescencia y para el Cloruro de Benzalconio por UV, fue necesario aumentar el tiempo de corrida cuando los compuestos de interés eran adicionados a estos medios.

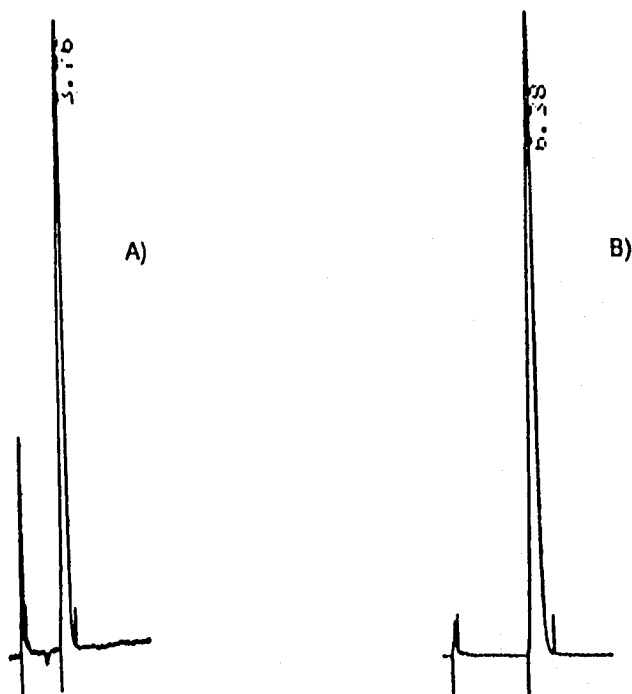


Figura 4.1.
Cromatogramas Típicos de Estradiol (A) y Progesterona (B) en Fase Móvil.

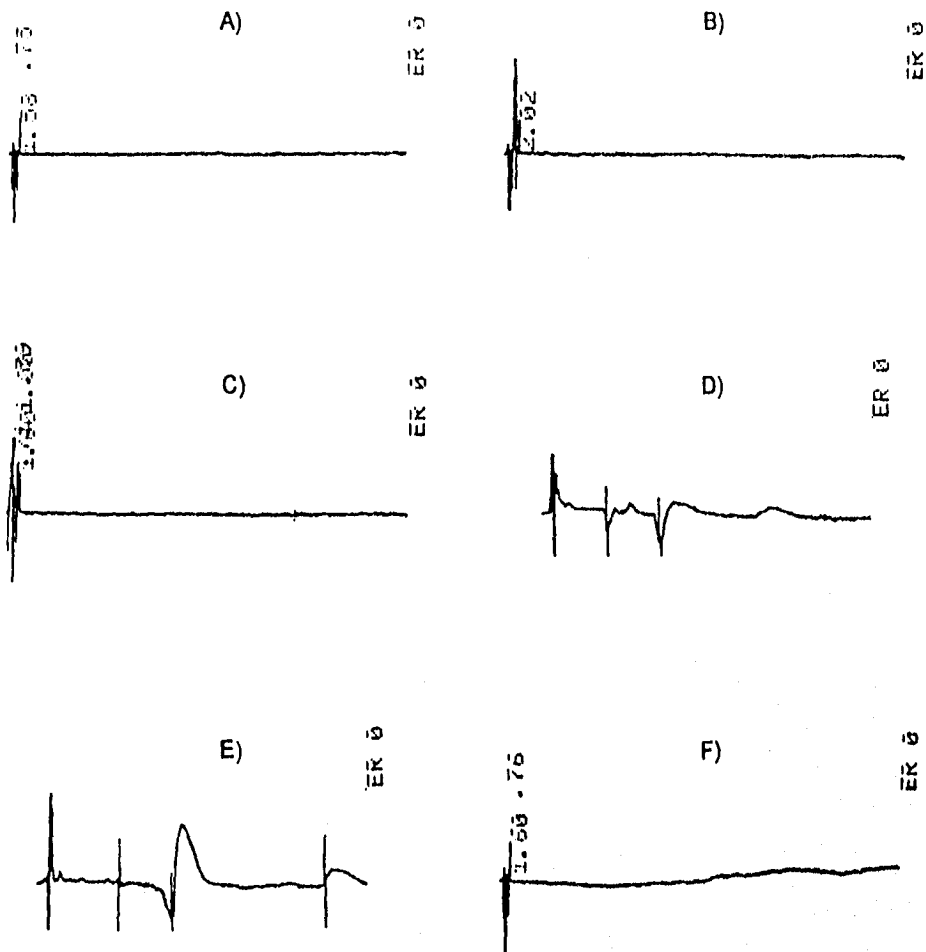


Figura 4.2.
 Cromatogramas de los Medios de Disolución y los Posibles Componentes de la Formulación por Fluorescencia (281nm excitación/305nm emisión).
 A) Agua. B) Amortiguador de Fosfatos 0.2M pH=4.0. C) Amortiguador de Fosfatos 0.2M pH=7.4. D) Dodecilsulfato de Sodio 0.3% (P/V). E) Cloruro de Benzalconio 0.1% (P/V). F) Placebo.

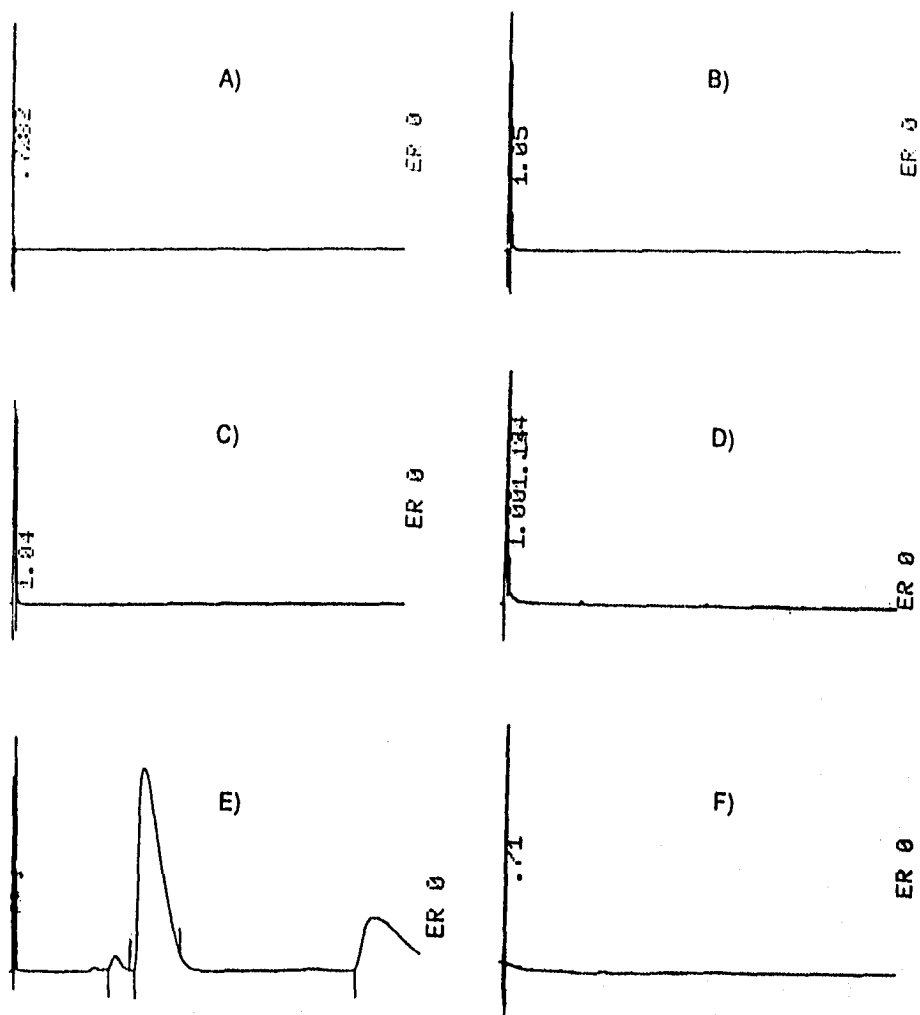


Figura 4.3.

Cromatogramas de los Medios de Disolución y los Posibles Componentes de la Formulación por UV (256nm).

A) Agua. B) Amortiguador de Fosfatos 0.2M pH=4.0. C) Amortiguador de Fosfatos 0.2M pH=7.4. D) Dodecilsulfato de Sodio 0.3% (P/V). E) Cloruro de Benzalconio 0.1% (P/V). F) Placebo.

b) Efecto de Los Medios de Disolución. Las tablas 4.7. y 4.8. presentan los porcentajes de recobro en los diferentes medios de disolución para el Estradiol y la Progesterona, respectivamente.

Tabla 4.7. Efecto de los Medios de Disolución en la Respuesta del Estradiol.

CONC. ADICIONADA	REPLICA	MEDIO				
		A	B	C	D	E
15.00ng/mL	1	99,2	101,8	99,7	92,6	93,5
	2	99,8	101,4	99,6	94,4	89,5
	3	101,8	102,0	102,0	99,0	94,8
	n	3	3	3	3	3
	PROMEDIO	99,6	101,7	100,4	95,0	92,6
	D.E.	1,89	0,32	1,34	2,77	2,75
	C.V.	1,90	0,32	1,34	2,92	2,98
DIFERENCIA RESPECTO A "A" =		0,00	2,10	0,82	-4,60	-7,02
80.00ng/mL	1	100,7	101,7	100,7	99,5	99,7
	2	101,4	100,6	97,3	99,2	96,8
	3	102,3	102,2	100,7	99,8	97,4
	n	3	3	3	3	3
	PROMEDIO	101,5	101,5	99,6	99,5	97,9
	D.E.	0,78	0,80	1,97	0,27	1,51
	C.V.	0,77	0,79	1,98	0,27	1,55
DIFERENCIA RESPECTO A "A" =		0,00	0,03	-1,89	-1,99	-3,51
150.0ng/mL	1	101,5	102,2	101,6	100,1	95,5
	2	101,2	102,1	100,8	101,2	97,8
	3	102,7	101,9	100,7	100,7	99,7
	n	3	3	3	3	3
	PROMEDIO	101,8	102,1	101,0	100,7	96,7
	D.E.	0,78	0,19	0,50	0,51	1,18
	C.V.	0,77	0,19	0,49	0,50	1,22
DIFERENCIA RESPECTO A "A" =		0,00	0,28	-0,74	-1,12	-5,10

A: Agua. B: Amortiguador de Fosfatos 0.2M pH=4.0. C: Amortiguador de Fosfatos 0.2M pH=7.4. D: Dodecilsulfato de Sodio al 0.3% (P/V). E: Cloruro de Benzalconio al 0.1% (P/V).

La mayor diferencia del porcentaje de recobro respecto al agua, se presentó en las muestras adicionadas en Cloruro de Benzalconio en el nivel de concentración de 15.00ng/mL.

Tabla 4.8. Efecto de los Medios de Disolución en la Respuesta de la Progesterona.

CONC. ADICIONADA	REPLICA	MEDIO				
		A	B	C	D	E
0,7000µg/mL	PORCENTAJE DE RECOBRO					
	1	102,0	97,0	100,2	104,5	100,2
	2	97,6	96,8	97,6	102,2	102,8
	3	96,1	97,3	98,9	105,5	96,0
	n	3	3	3	3	3
	PROMEDIO	98,6	97,0	98,9	104,1	99,7
	D. E.	3,09	0,25	1,31	1,71	3,44
	C.V.	3,13	0,25	1,33	1,65	3,45
DIFERENCIA RESPECTO A "A" =	0,00	-1,56	0,31	5,47	1,06	
2,500µg/mL	PORCENTAJE DE RECOBRO					
	1	96,3	96,4	93,4	100,5	97,7
	2	96,8	96,1	93,5	99,2	92,3
	3	98,0	95,8	93,9	99,7	98,1
	n	3	3	3	3	3
	PROMEDIO	97,0	95,8	93,6	99,4	96,0
	D. E.	0,89	0,64	0,26	1,15	3,23
	C.V.	0,92	0,67	0,30	1,16	3,36
DIFERENCIA RESPECTO A "A" =	0,00	-1,24	-3,40	2,43	-0,97	
7,000µg/mL	PORCENTAJE DE RECOBRO					
	1	99,0	97,4	98,4	101,0	96,6
	2	97,7	97,9	98,3	100,8	94,8
	3	98,5	97,4	98,0	101,7	104,2
	n	3	3	3	3	3
	PROMEDIO	98,4	97,5	97,6	101,1	98,5
	D. E.	0,64	0,29	1,12	0,47	4,99
	C.V.	0,65	0,29	1,15	0,47	5,06
DIFERENCIA RESPECTO A "A" =	0,00	-0,89	-0,84	2,74	0,13	

A: Agua. B: Amortiguador de Fosfatos 0.2M pH=4.0. C: Amortiguador de Fosfatos 0.2M pH=7.4. D: Dodecilsulfato de Sodio al 0.3% (P/V). E: Cloruro de Benzalconio al 0.1% (P/V).

Para la Progesterona la mayor diferencia del porcentaje de recobro, respecto a las muestras en agua, fue en Dodecilsulfato de Sodio en el nivel de concentración de 0.7000µg/mL.

4.4 Límite de Cuantificación

El límite de cuantificación del método se determinó para Estradiol en 5.000ng/mL y en 0.5000µg/mL para Progesterona, ya que son las mínimas concentraciones que cumplen con los requisitos de exactitud y precisión. En todos los experimentos no se observó una desviación absoluta mayor al 15% ni un coeficiente de variación mayor al 15%.

4.5 Linealidad e Intervalo Dinámico de Trabajo

La tabla 4.9 presenta los estadísticos de regresión de las curvas patrón de Estradiol generadas durante los 4 días de la prueba, y en la tabla 4.10 se muestran los resultados de la calidad de ajuste del Estradiol. En las figuras 4.3 a 4.6 se presentan las gráficas de linealidad para el Estradiol.

Tabla 4.9. Datos de Regresión de las Curvas Patrón de Estradiol. Intervalo de 5.000ng/mL a 200.0 ng/mL.

DÍA	ORDENADA AL ORIGEN (A)	PENDIENTE (B)	COEF. DE DETERMIN. (r ²)
1	-361,4	15368	0,999968
2	425,2	16062	0,999983
3	275,3	16730	0,999990
4	-9019,0	14079	0,999968

Tabla 4.10. Calidad de Ajuste de las Curvas Patrón de Estradiol. Intervalo de 5.000ng/mL a 200.0ng/mL.

DÍA	CONCENTRACION ADICIONADA (ng/mL)					
	5,000	10,00	20,00	50,00	100,0	200,0
	CONCENTRACION INTERPOLADA (ng/mL)					
1	5,334	9,803	19,85	49,54	100,7	199,8
2	4,953	10,26	20,28	49,45	99,91	200,1
3	4,810	10,31	19,68	50,18	100,1	199,9
4	4,986	9,822	19,55	50,81	99,95	199,9
n	4	4	4	4	4	4
PROMEDIO	5,021	10,05	19,84	50,00	100,2	199,9
D. E.	0,222	0,274	0,319	0,637	0,364	0,151
C.V.	4,43	2,72	1,61	1,27	0,36	0,08
%D.A.	0,41	0,49	0,80	0,01	0,16	0,03

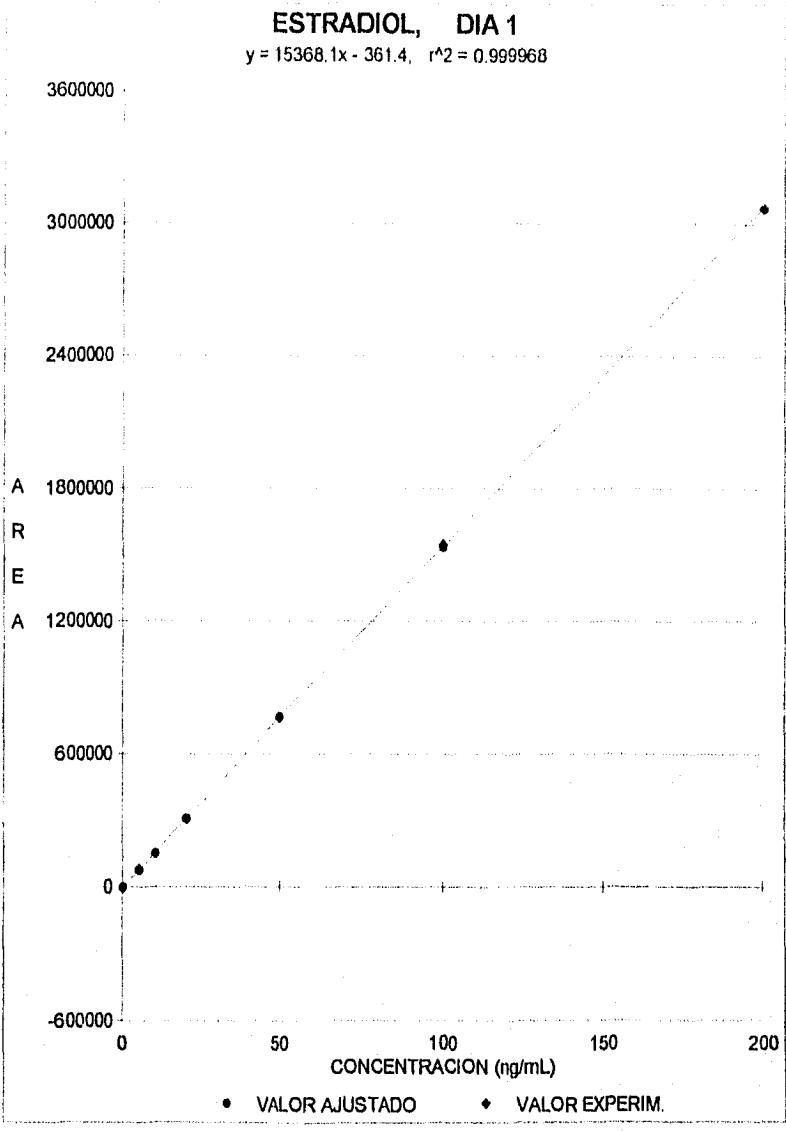


Figura 4.3.
 Gráfica de Linealidad para Estradiol. Día 1.

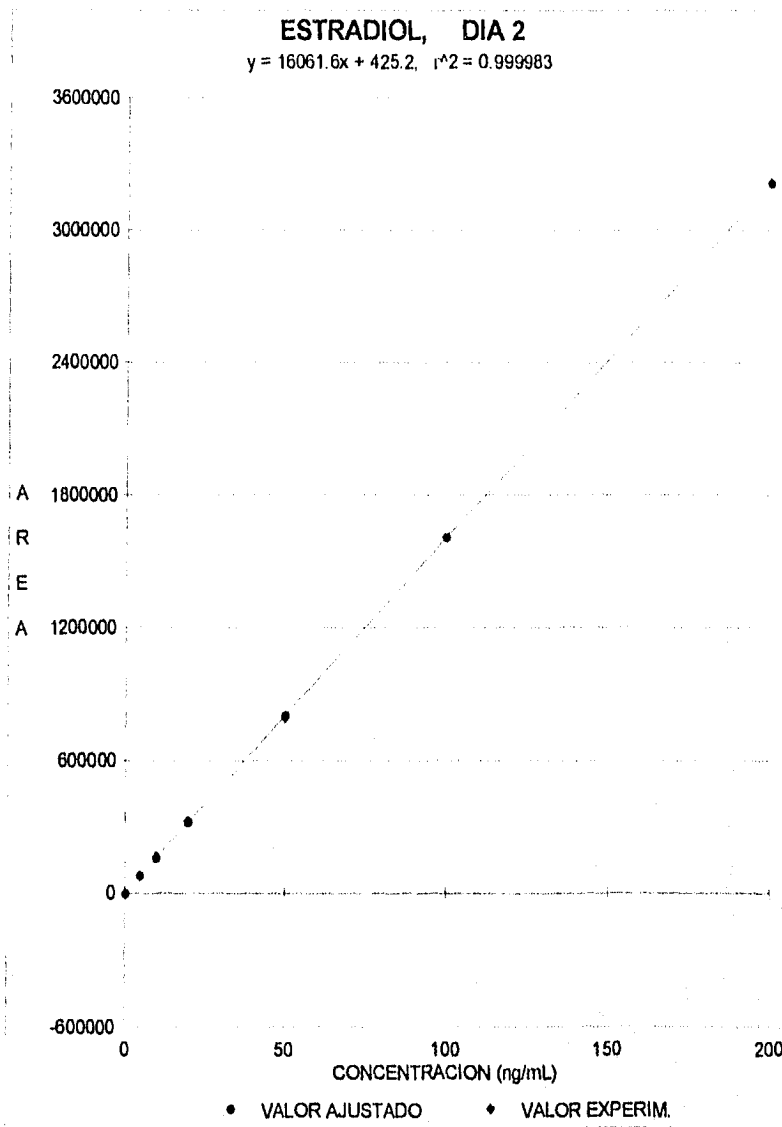


Figura 4.4.
 Gráfica de Linealidad para Estradiol. Día 2.

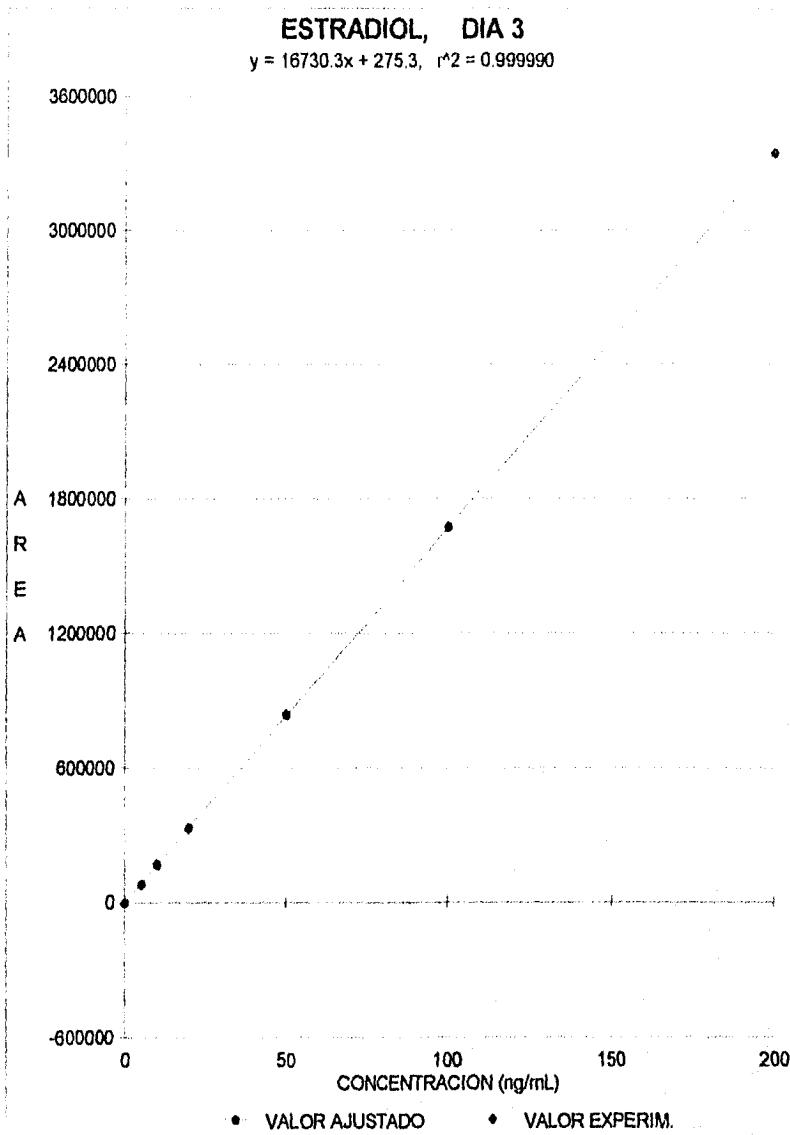


Figura 4.5.
Gráfica de Linealidad para Estradiol. Día 3.

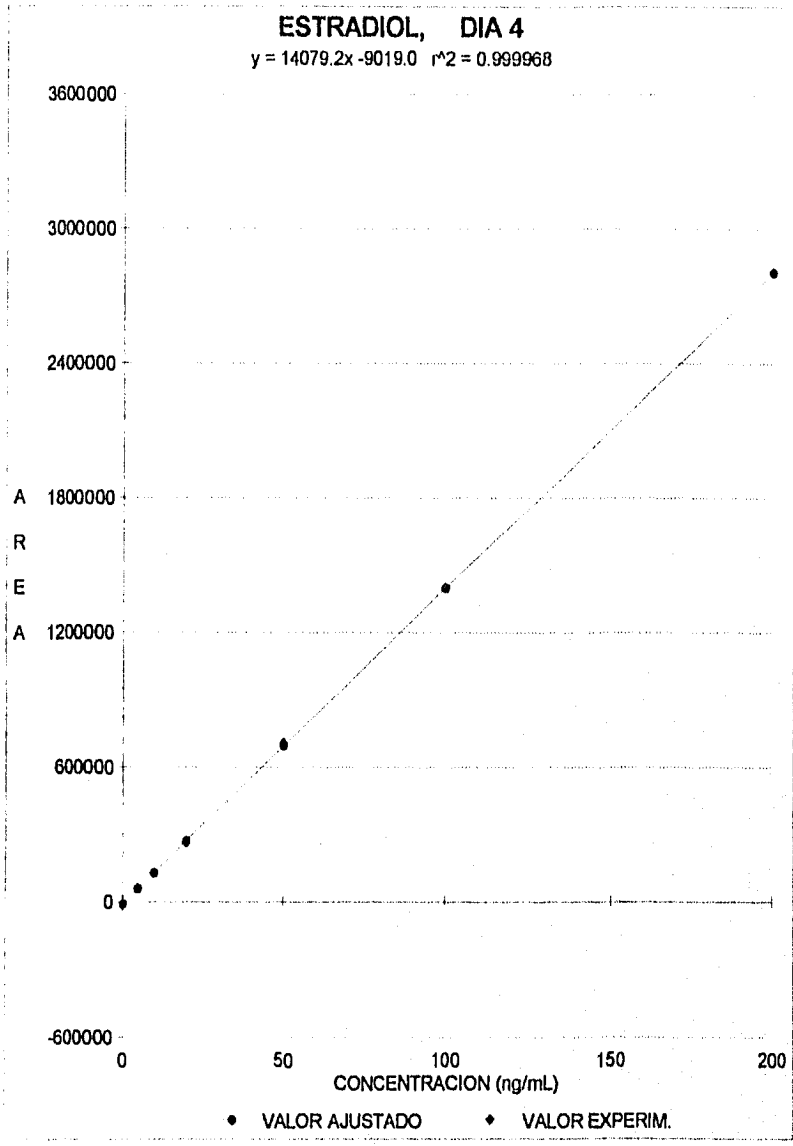


Figura 4.6.
 Gráfica de Linealidad para Estradiol. Día 4.

En la tabla 4.11 se muestran los estadísticos de regresión de las curvas patrón generadas durante los 4 días de la prueba y la tabla 4.12 presenta los resultados de la calidad de ajuste de la Progesterona. En las figuras 4.7 a 4.10 se presentan las gráficas de linealidad para la Progesterona.

Tabla 4.11. Datos de Regresión de las Curvas Patrón de Progesterona. Intervalo de 0.5000µg/mL a 8.000µg/mL.

DÍA	ORDENADA AL ORIGEN (A)	PENDIENTE (B)	COEF. DE DETERMIN. (r ²)
1	10561	236045	0,99989
2	10080	242038	0,99767
3	-3117	236609	0,99998
4	-4464	236966	0,99987

Tabla 4.12. Calidad de Ajuste de las Curvas Patrón de Progesterona. Intervalo de 0.5000µg/mL a 8.000µg/mL.

DÍA	CONCENTRACION ADICIONADA (µg/mL)					
	0,5000	1,000	2,000	4,000	6,000	8,000
	CONCENTRACION INTERPOLADA (µg/mL)					
1	0,4826	0,9659	2,052	3,999	5,962	8,019
2	0,4463	0,9530	1,952	4,292	5,926	7,931
3	0,5135	0,9974	1,960	4,013	5,993	8,003
4	0,5099	0,9786	1,970	4,050	6,027	7,964
n =	4	4	4	4	4	4
PROMEDIO =	0,4880	0,9767	1,989	4,068	5,977	7,979
D. E =	0,0311	0,019	0,044	0,138	0,043	0,040
C.V. =	6,37	1,92	2,20	3,37	0,72	0,50
%DA =	2,39	2,13	0,57	2,21	0,38	0,26

Los resultados presentan un coeficiente de determinación mayor a 0.98 para ambos compuestos. La máxima desviación que se encontró para el Estradiol fue del 0.80% respecto al valor nominal, que corresponde a la concentración de 20ng/mL. Para la Progesterona la máxima desviación encontrada fue de 2.39% respecto al valor nominal, que corresponde a la concentración de 0.5000µg/mL. Por lo tanto, se considera que las curvas patrón de ambos compuestos presentan una relación lineal entre la concentración y la respuesta generada en el intervalo de 5.000 a 200.0ng/mL para el Estradiol y en el intervalo de 0.5000 a 8.000µg/mL para la Progesterona.

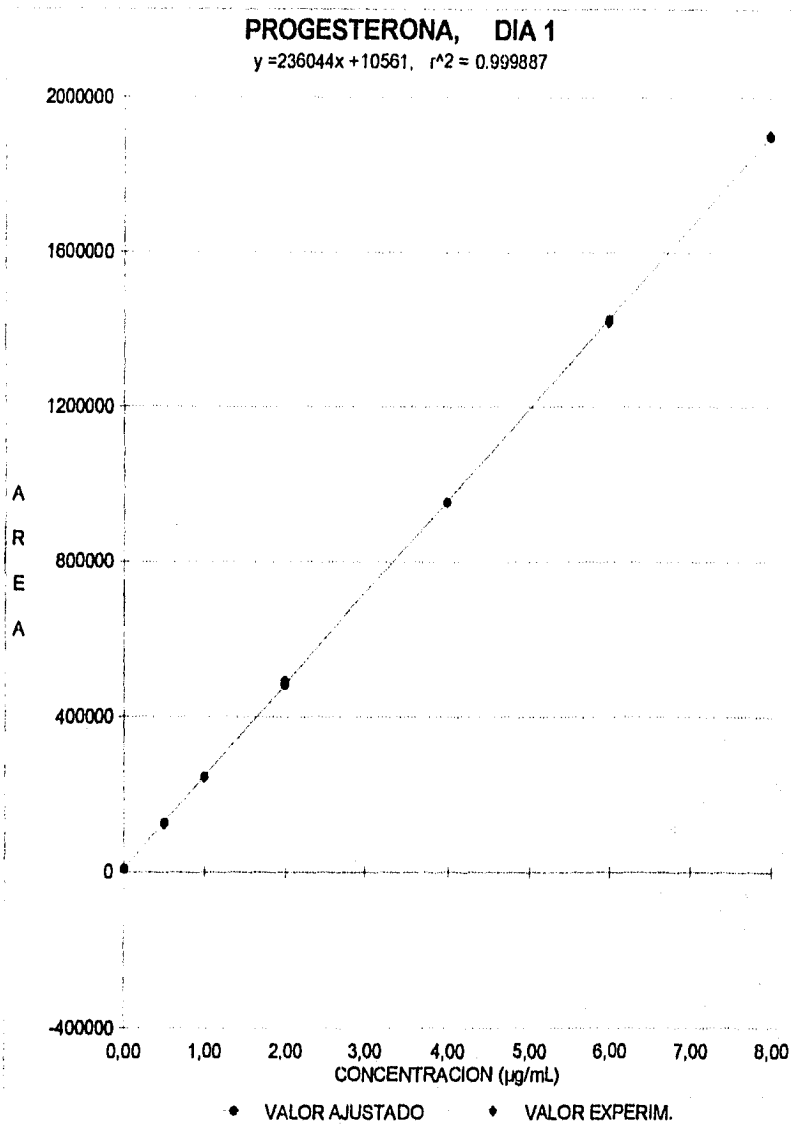


Figura 4.7.
 Gráfica de Linealidad para Progesterona. Día 1.

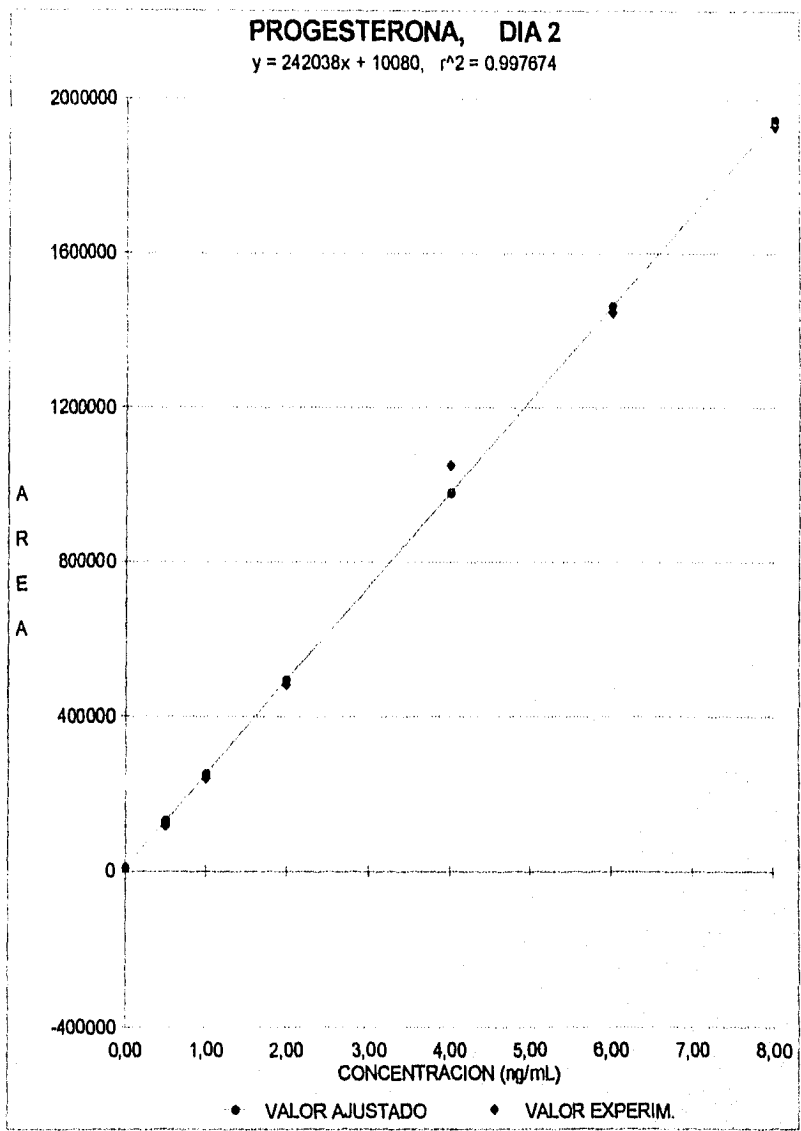


Figura 4.8.
 Gráfica de Linealidad para Progesterona. Día 2.

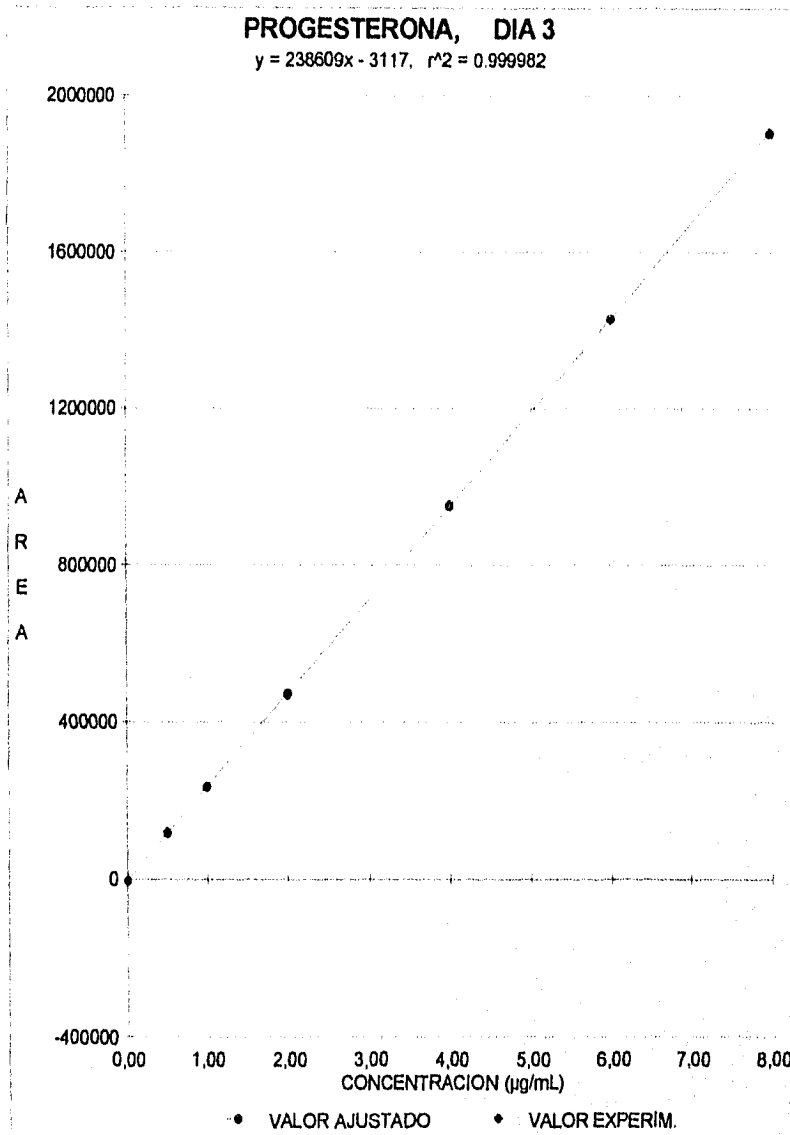


Figura 4.9.
 Gráfica de Linealidad para Progesterona. Día 3.

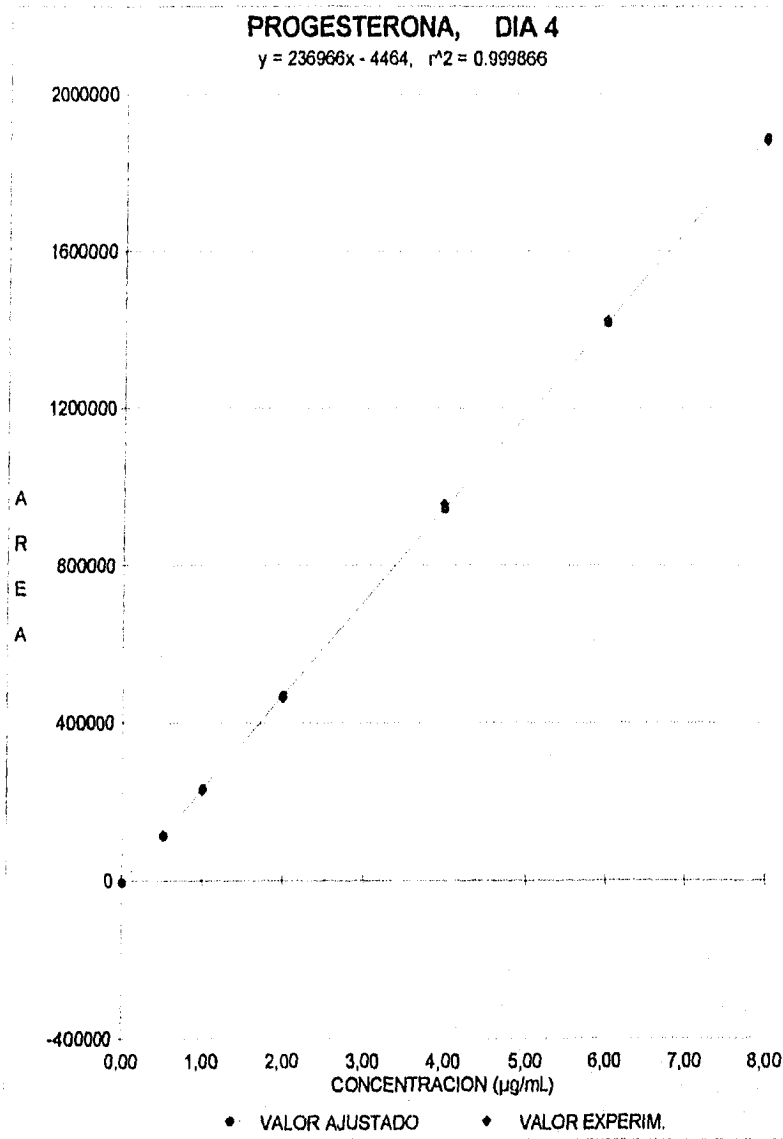


Figura 4.10.
 Gráfica de Linealidad para Progesterona. Día 4.

4.6 TOLERANCIA

a) Estabilidad de la Muestra en el Medio de Disolución a Temperatura Ambiente y Refrigeración: Las figuras 4.11. y 4.12. presentan ejemplos de la cuantificación de las muestras adicionadas en algunos de los medios de disolución, almacenadas tanto a temperatura ambiente como a refrigeración. De acuerdo a éstos:

Para Estradiol: las muestras adicionadas en agua, amortiguador de fosfatos a pH=4.0 y dodecilsulfato de sodio almacenadas a temperatura ambiente y refrigeración fueron estables 72 horas. Las muestras adicionadas en amortiguador de fosfatos pH=7.4 y cloruro de benzalconio almacenadas a temperatura ambiente y refrigeración fueron estables 24 horas.

Para Progesterona: las muestras adicionadas en agua, amortiguador de fosfatos pH=4.0, dodecilsulfato de sodio y cloruro de benzalconio almacenadas a temperatura ambiente y refrigeración y las muestras adicionadas en amortiguador de fosfatos pH=7.4 almacenadas a temperatura ambiente fueron estables 72 horas. Las muestras adicionadas en amortiguador de fosfatos pH=7.4 almacenadas a refrigeración fueron estables 48 horas.

Cabe señalar que las muestras de Estradiol y Progesterona adicionadas en dodecilsulfato de sodio y almacenadas a refrigeración presentaron precipitación por lo que fue necesario agitar y colocarlas en baño de agua a 60° aproximadamente hasta disolver, antes de ser analizadas.

b) Tolerancia a Diferentes Columnas: Las tablas 4.13. y 4.14. presentan los resultados de regresión de la misma curva patrón de Estradiol y Progesterona inyectada tanto en la columna de baja eficiencia como en la de alta eficiencia. En los 2 casos, se observa que no existe gran diferencia en los valores obtenidos con ambas columnas. En los cromatogramas de las figuras 4.13. y 4.14. se demuestra que no se presentan interferencias en la región cromatográfica de los activos.

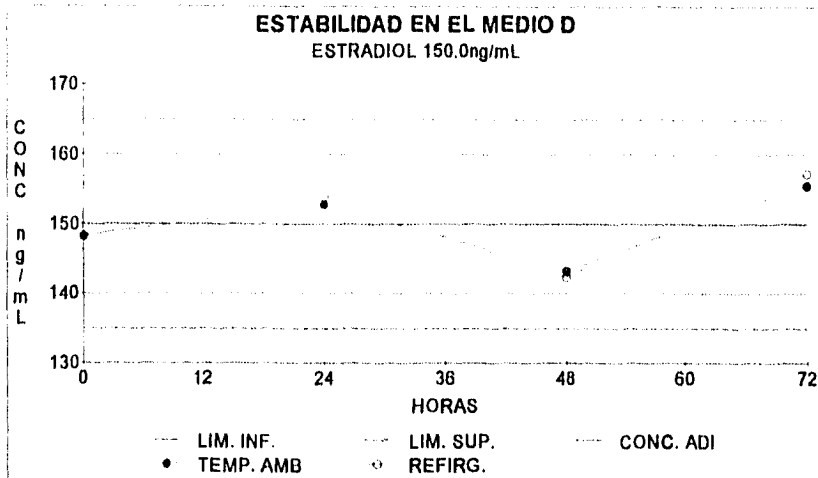


Figura 4.11.
Gráficas de Estabilidad del Estadiol en Dodecilsulfato de Sodio al 0.3% (P/V) a Temperatura Ambiente y Refrigeración.

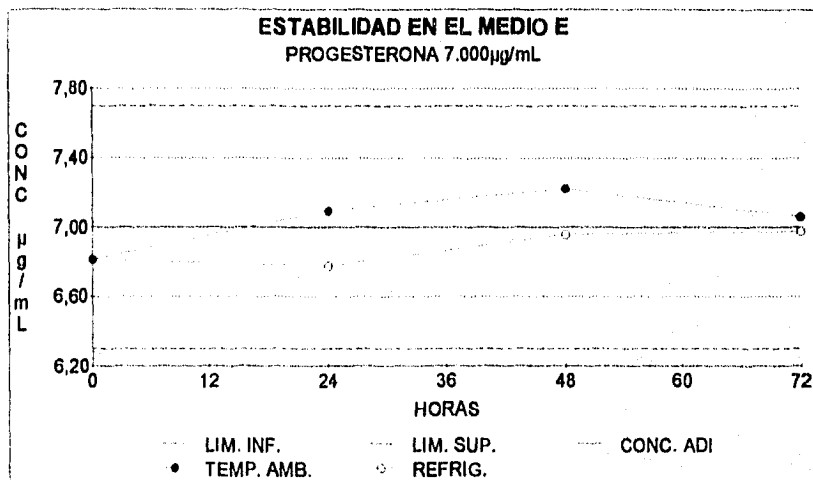


Figura 4.12.
Gráficas de Estabilidad de la Progesterona en Cloruro de Benzalconio al 0.1% (P/V) a Temperatura Ambiente y Refrigeración.

Tabla 4.13. Resultados de Regresión de la Curva Patrón de Estradiol en Diferentes Columnas

COLUMNA	PENDIENTE	ORDENADA	r ²	N
BAJA EFICIENCIA	14843,6	-11984,77	0,999955	679
ALTA EFICIENCIA	14574,0	-33953,06	0,999881	1074

Tabla 4.14. Resultados de Regresión de la Curva Patrón de Progesterona en Diferentes Columnas

COLUMNA	PENDIENTE	ORDENADA	r ²	N
BAJA EFICIENCIA	224474,8	401,94	0,999966	903
ALTA EFICIENCIA	223363,5	-8457,44	0,999992	1478

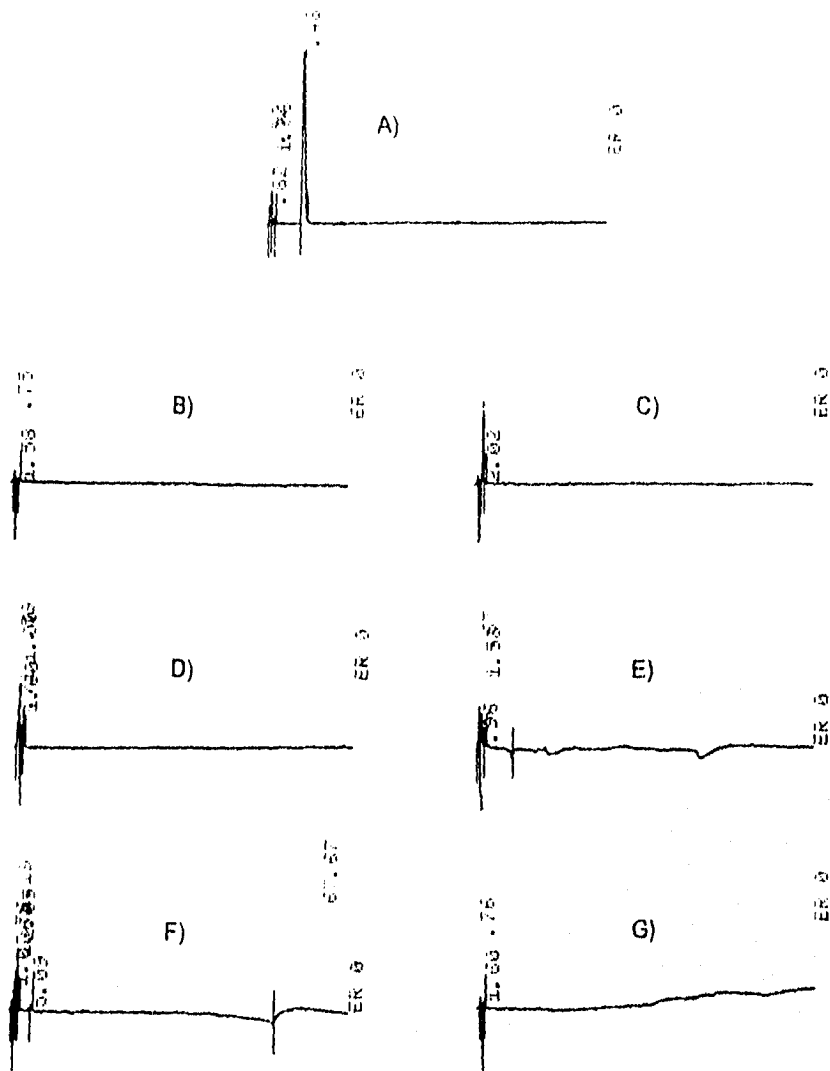


Figura 4.13.

Cromatogramas Obtenidos en la Columna de Alta Eficiencia por Fluorescencia.
 A) Cromatograma Típico de Estradiol. B) Agua. C) Amortiguador de Fosfatos
 0.2M pH=4.0. D) Amortiguador de Fosfatos 0.2M pH=7.4. E) Dodecilsulfato de
 Sodio 0.3% (P/V). F) Cloruro de Benzalconio 0.1% (P/V). G) Placebo.

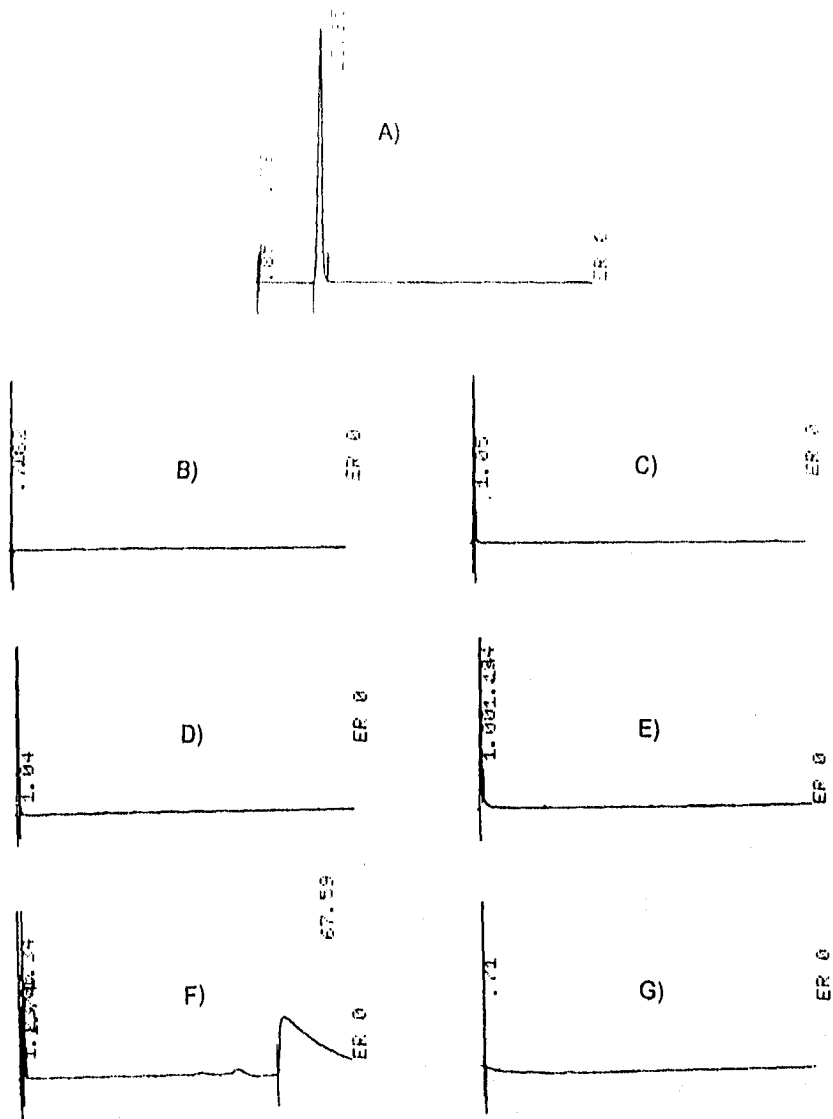


Figura 4.14.

Cromatogramas Obtenidos en la Columna de Alta Eficiencia por UV.
 A) Cromatograma Típico de Progesterona. B) Agua. C) Amortiguador de Fosfatos 0.2M pH=4.0. D) Amortiguador de Fosfatos 0.2M pH=7.4. E) Dodecilsulfato de Sodio 0.3% (P/V). F) Cloruro de Benzalconio 0.1% (P/V). G) Placebo.

CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES Y PROPUESTAS

CONCLUSIONES.

- 1) Se desarrolló y validó un método para la cuantificación de Estradiol y Progesterona en muestras provenientes de perfiles de disolución.
- 2) La exactitud y la precisión del método se consideran adecuadas, ya que cumplen con los criterios de aceptación establecidos.
- 3) El método resulta ser específico a los diferentes medios probados, ya que no se encontraron interferencias de éstos, ni de los posibles componentes de la formulación; además, la cuantificación de los principios activos disueltos en los distintos medios, no presentó una diferencia mayor al 10% respecto a los disueltos en agua.
- 4) El límite de cuantificación para el Estradiol es de 5.000ng/mL y de 0.5000µg/mL para la Progesterona, ya que en estos niveles la exactitud y precisión fueron menores al 15%.
- 5) El método de cuantificación presenta una relación lineal para el Estradiol en el intervalo de 5.000 a 200.0ng/mL y para la Progesterona en el intervalo de 0.5000 a 8.000µg/mL.
- 6) El Estradiol disuelto en agua, amortiguador de fosfatos pH=4.0 y dodecilsulfato de sodio, almacenado a temperatura ambiente y refrigeración es estable por 72 horas. Cuando es disuelto en amortiguador de fosfatos pH=7.4 y cloruro de benzalconio almacenado a temperatura ambiente y refrigeración, la estabilidad es menor a 72 horas.

7) La Progesterona disuelta en agua, amortiguador de fosfatos pH=4.0, dodecilsulfato de sodio y cloruro de benzalconio, almacenada a temperatura ambiente y refrigeración es estable por 72 horas; al igual que cuando se disuelve en amortiguador de fosfatos pH=7.4 y almacenada a temperatura ambiente. Cuando es disuelta en amortiguador de fosfatos pH=7.4 y almacenada en refrigeración, la estabilidad es menor a 72 horas.

8) El método es tolerante al uso de columnas de baja y alta eficiencia.

9) El método puede soportar diferentes medios de disolución.

PROPUESTAS.

Una vez establecido el método de disolución definitivo, el método analítico deberá ser retomado para disminuir el tiempo de corrida y establecer un criterio de aceptación para exactitud y precisión de $\pm 5\%$ como máximo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **U. S. Pharmacopeial Convention Inc.(1995);** The United States Pharmacopeia 23 ed.; National Formulary 18 ed.; Rockville MD; U.S.A., 1995, pp. 622, 1368, 1791-1798, 1924-1929 y 1982-1984
2. **Florez K.;** Analytical Profiles of Drug Substances, vol 15, Academic Press, U. K., 1986, pp. 286-312.
3. **Moffat, A. C., Jackson, J. V., Moss, M. S., Widdop, B.,** Clarke's Isolation and Identification of Drugs, 2nd edition, The Pharmaceutical Press, Great Britain, 1986, pp. 830-831 y 929-930.
4. **Windholz, M., Budavari, S., et al,** The Merck Index, 11th edition, Merck and Co. Inc., 1989, pp. 583 y 1234.
5. **Cedric, M., Smith, M. D., y col.,** Farmacología, Ed. Panamericana, Argentina, 1993, pp. 660-679.
6. **Foye, W. O.,** Principios de Química Farmacéutica, tomo II, Ed. Reverté, España, 1988, pp. 519-574.
7. **Goodman, A., Rall, T. W., y col.,** Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 8a. edic., Ed. Médica Panamericana, México, 1991, pp. 1340-1366 y 1388.
8. **Abdou, H. M.,** Dissolution, Bioavailability and Bioequivalence, Mack Printing Company, U.S.A., 1989, pp. 11-20, 53-169, 215-239.
9. **Banakar, U. V.,** Pharmaceutical Dissolution Testing, vol 49, Marcel Dekker Inc., U.S.A., 1992, pp. 299-302.
10. **Banker, G. S., Rhodes, C. T.,** Modern Pharmaceutics, 2nd edition, Marcel Dekker Inc., 1990, pp. 635-661.
11. **Kydoneus, A.,** Treatise on Controlled Drug Delivery, Marcel Dekker Inc., U.S.A., 1992, pp. 315-325.

12. **Gennaro, A. R.**, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, Mack Publishing Company, U.S.A., 1990, pp. 1662-1664.
13. **Hanson, W. A.**, Handbook of Dissolution, 2nd edition, Aster Publishing Corporation, U.S.A., 1991, pp. 1-52.
14. **Adamovics, J. A.**, Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals, vol 49, Marcel Dekker Inc., U.S.A., 1990, pp. 3-6 y 167-207.
15. **Munson, J. W.**, Pharmaceutical Analysis, vol 11 part B, Marcel Dekker Inc., U.S.A., 1984, pp. 15-154.
16. **Piemonte, G., Tagliaro, F., Marigo, M., Frigerio, A.**, Developments in Analytical Methods in Pharmaceutical, Biomedical and Forensic Sciences, Plenum Press, U.S.A., 1987, pp. 1-17.
17. **Skoog, D. A., West, D. M.**, Análisis Instrumental, 2a. edic., Ed. McGraw-Hill, México, 1993, pp. 721-736.
18. **Vickrey, T. M.**, Liquid Chromatographic Detectors, vol 23, Marcel Dekker Inc., U.S.A., 1983, pp. 23-121.
19. **Tsuji, K., Morozowich, W.**, GLC and HPLC determination of Therapeutics Agents, vol 9 part 1, Marcel Dekker Inc., U.S.A., 1978, pp. 1-43.
20. **Madan, D. K., Cadwallader, D. E.**, Journal of Pharmaceutical Sciences, 62(9), 1973, pp. 1567-1569.
21. **Muramatsu M., Iwahashi, M., Takeuchi, U.**, Journal of Pharmaceutical Sciences, 68(2), 1979, pp. 175-177.
22. **Mills, T., Roberson, J. C.**, Instrumental Data for Drug Analysis, 2nd edition, Elsevier Science Publishing Inc., vol 2, 3, U.S.A., 1987, pp.835, 1938-1939.
23. **Möller, H., Wirbitzk, E.**, S. T. P. Pharma Practiques, 3(5), 1993, pp. 348-356.
24. **Welling, P. G., Fogue, S. T., Cook, J. A., deVries, T. M.**, Drug Information Journal, 29, 1995, pp. 893-902.
25. **Leeson, L. J.**, Drug Information Journal, 29, 1995, pp. 903-915.
26. **Hokanson, G. C.**, Pharmaceutical Technology, 18(9), 1994, pp. 118-130.
27. **Hokanson, G. C.**, Pharmaceutical Technology, 18(10), 1994, pp. 92-100.

28. Molnar, I., Practical Aspects of Modern High Performance Liquid Chromatography, Walter de Gruyter & Co., Germany, 1982, pp. 227-239.
29. Quintero F., Implementación de Técnicas Analíticas para Asegurar la Composición Química del 17 β -Estradiol sometido al Proceso de Microesferización, (Tesis) Facultad de Química Ciudad Universitaria, 1994.