



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

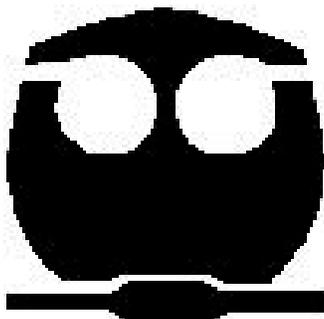
“ESTUDIOS DEL PERFIL DE DISOLUCIÓN DE CÁPSULAS DE
5-O- $[\beta$ -D-APIOFURANOSIL-(1 \rightarrow 6)- β -D-GLUCOPIRANOSIL]-7-
METOXI-3',4'-DIHIDROXI-4-FENILCUMARINA A pH 4.5 POR
CLAR”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

NANCY MONTSERRAT PÉREZ NAVARRO



MÉXICO, D.F.

2009



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: Dra. Inés Fuentes Noriega
Vocal: Dra. Helgi Helen Jung Cook
Secretario: M. en C. María de Lourdes Mayet Cruz
Primer suplente: M. en C. Lauro Misael Del Rivero Ramírez
Segundo suplente: M. en C. Roberto Carlos Cañas Alonso

El presente trabajo se desarrolló en los laboratorios 112 y 113, Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química, Ciudad Universitaria, UNAM.

Asesor del tema

Dra. Inés Fuentes Noriega

Supervisor técnico

M. en C. Roberto Carlos Cañas Alonso

Sustentante

Nancy Montserrat Pérez Navarro

Dra. Rachel Mata Essayag

Facultad de Química PAIP 6390-05

A Dios, Madre Naturaleza, Vida o como quiera que se llame aquello sorprendente que me ha mostrado muchas veces la parte "mágica" de las cosas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente la ENP No.9 "Pedro de Alba" y la Facultad de Química, por abrirme sus puertas y brindarme conocimientos, por permitirme disfrutar de sus instalaciones y dentro de éstas encontrarme con grandes personas y sobre todo pasar muchos de los mejores momentos de mi vida en ella.

A la Dra. Inés Fuentes Noriega por la confianza y apoyo brindados para la realización de este proyecto y por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo.

Al M. en C. Roberto Carlos Cañas Alonso por su apoyo, paciencia, ayuda y tiempo brindados para la realización de este proyecto; sin él no habría sido posible.

A mis sinodales: la Dra. Helgi Helen Jung Cook, así como la M. en C. María de Lourdes Mayet Cruz por dedicar parte de su tiempo a la revisión de este trabajo, así como por las sugerencias y comentarios para su mejora.

A mis compañeros de los laboratorios 112 y 113, a la M. en C. Sofía Margarita Rodríguez A. por la ayuda recibida y en especial a Yukie Lee y Roberto Rodríguez por hacer más ligero el trabajo en el laboratorio y por conformar un buen equipo para que esto resultara favorable.

A mi FAMILIA: Pablo, Victoria, René y Alan; quiénes a pesar de las difíciles circunstancias que el destino ha puesto como prueba no se dan por vencidos, han sido mis principales ejemplos de lucha y son mi mayor impulso para seguir adelante y esforzarme por lograr mis sueños. Gracias por cada esfuerzo realizado para beneficio de mi persona, espero de esta forma gratificarlos, en cierto modo, por ello. No me queda mas que decirles que "LOS AMO Y LE AGRADEZCO A LA VIDA POR PONERLOS EN MI CAMINO".

A "L@s Lok@s": Fab, Eli, Ale, Luis y por supuesto Tuti (que aunque no este físicamente siempre guía con su luz mi camino): porque me han enseñado el verdadero significado de la palabra AMISTAD, porque han sido un gran apoyo y son pieza fundamental para haber llegado a este momento, GRACIAS por todo y espero me brinden la oportunidad de seguir compartiendo con ustedes mi vida como hasta el día de hoy.

A aquellos que me enseñaron que los "Títulos familiares" no son suficientes para unir a las personas, sin embargo son una excelente excusa para acercarse a la gente y descubrir grandes seres humanos, buenos consejeros, pero sobre todo amigos sinceros: Mi adorada Pachita, Tíos: Isa, Justo, Car, Lena, Juve, Pilar y María; Mis primos: Erika, Omar, Melina, Miguel, Manuel, Beto, Carmelita, Dulce, Memo y Daniel.

A aquellos que comprenden perfectamente lo que significa llegar a este momento, con los que no solo me senté en la biblioteca a sufrir con alguna tarea sino con los que ahí mismo compartí pláticas que me permitieron conocerlos más, quienes a través de una sonrisa, una palabra o algún detalle me brindaron apoyo y han permitido llevarme de esta facultad no solo conocimientos sino buenos amigos, que espero conservar con el paso del tiempo: Ángeles F., Carmina S., Carlos M., Alejandra H., Sandra M., Carlos R., Iván L., Paulina Q. y Lluvia D.

A cada una de las personas que han cruzado por mi camino y que han dejado huella en mi vida.

Índice General	Página
Abreviaturas	i
1 Introducción	1
Objetivos	4
2 Generalidades	5
2.1 La medicina herbolaria en México	6
2.2 Copalchi	8
2.3 Propiedades fisicoquímicas de la 5-O-[β-D-apiofuranosil-(1→6)- β-D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina	10
2.4 Generalidades de la diabetes mellitus	11
2.4.1 La Insulina	12
2.4.2 La diabetes mellitus como problema social	13
2.5 La formulación de medicamentos y la Biofarmacia	14
2.5.1 Desintegración	17
2.5.2 Disolución	17
2.5.2.1 Factores que afectan la disolución de formas farmacéuticas sólidas	20
2.5.2.2 Factores que impactan en la velocidad de disolución	21
2.5.2.2.1 Factores asociados a las propiedades fisicoquímicas del fármaco	22
2.5.2.2.2 Factores asociados a la formulación y al proceso de fabricación	23
2.5.2.2.3 Factores asociados al equipo de disolución	25
2.5.2.2.4 Factores asociados al medio de disolución	26
2.5.2.2.5 Factores asociados al medio ambiente	27
2.5.2.3 Equipos utilizados para llevar a cabo las pruebas de disolución in vitro	28
2.5.2.3.1 Aparato I: Canastilla giratoria	29
2.5.2.3.2 Aparato II: Paletas giratorias	30

3	Metodología	31
3.1	Equipo y material	32
3.2	Reactivos	33
3.3	Preparación de soluciones	34
3.3.1	Medio de disolución: Solución amortiguadora de acetatos 0.05M, pH 4.5 ± 0.05	34
3.3.2	Agua acidificada (0.1% TFA)	35
3.3.3	Solución stock de estándar de AG-4-fenilcumarina 1000 µg/mL	35
3.4	Procedimiento Experimental	35
3.4.1	Elección de condiciones cromatográficas	35
3.4.2	Prueba de control de calidad (peso promedio)	36
3.4.3	Validación del método analítico	36
3.4.3.1	Validación del sistema	36
3.4.3.2	Pruebas de estabilidad	36
3.4.3.3	Linealidad	38
3.4.3.4	Exactitud	40
3.4.3.5	Precisión (reproducibilidad y repetibilidad)	40
3.4.3.6	Prueba de influencia del filtro	41
3.4.4	Evaluación del perfil de disolución	42
4	Resultados y análisis de resultados	45
4.1	Determinación de condiciones cromatográficas	46
4.2	Prueba de control de calidad (peso promedio)	49
4.3	Validación del método analítico	50
4.3.1	Pruebas de estabilidad	50
4.3.2	Linealidad	53
4.3.3	Exactitud	54
4.3.4	Precisión (repetibilidad y reproducibilidad)	55
4.3.5	Prueba de influencia del filtro	56
4.4	Evaluación del perfil de disolución	57
5	Conclusiones	59
6	Bibliografía	61

Índice de Tablas		Página
Tabla 1	Tipos de equipos oficiales utilizados en la prueba de disolución	28
Tabla 2	Preparación de la curva patrón	39
Tabla 3	Preparación de la solución para la prueba de influencia del filtro	41
Tabla 4	Resultados para determinar el peso promedio de las cápsulas	49
Tabla 5	Áreas obtenidas para la AG-4-fenilcumarina durante la prueba de estabilidad a temperatura ambiente (mAU*s)	50
Tabla 6	Áreas obtenidas para la AG-4-fenilcumarina durante la prueba de estabilidad a 37° C (mAU*s)	52
Tabla 7	Resultados obtenidos para determinar la linealidad del método con datos de áreas de AG-4-fenilcumarina (mAU*s)	53
Tabla 8	Resultados obtenidos para determinar la exactitud del método con datos de áreas de AG-4-fenilcumarina (mAU*S)	54
Tabla 9	Resultados obtenidos para determinar la repetibilidad del método con datos de áreas de AG-4-fenilcumarina (mAU*s)	55
Tabla 10	Resultados obtenidos para determinar la reproducibilidad del método con datos de áreas de AG-4-fenilcumarina (mAU*s)	55
Tabla 11	Resultados obtenidos para determinar la influencia del filtro	56
Tabla 12	Promedio del porcentaje retenido por los filtros probados	56
Tabla 13	Resultados obtenidos durante el desarrollo del perfil de disolución. % Disuelto	57

Índice de Figuras		Página
Figura 1	<i>Hintonia standleyana</i> Bullock (Rubiaceae)	9
Figura 2	Proceso por el cual un fármaco llega a circulación sistémica	16
Figura 3	Esquema del equipo desgasificador	34
Figura 4	Equipo disolutor utilizado durante el desarrollo experimental	43
Figura 5	Cromatograma obtenido aplicando las condiciones cromatográficas establecidas por Díaz Huerta (2007)	46
Figura 6	Cromatograma obtenido con las condiciones cromatográficas elegidas (Fase móvil: ACNAgua acidificada (0.1% TFA) (19:81) y Flujo: 1.0 mL/min)	47
Figura 7	Cromatógrafo de Líquidos utilizado durante la etapa experimental	48
Figura 8	Cromatograma obtenido con el control de AG-4-fenilcumarina en el tiempo de muestreo = 0, durante la prueba de estabilidad a temperatura ambiente	51

Índice de Gráficos		Página
Gráfico 1	% Promedio no degradado de AG-4-fenilcumarina durante la prueba de estabilidad a temperatura ambiente por 24 h	51
Gráfico 2	% Promedio no degradado de AG-4-fenilcumarina durante la prueba de estabilidad a 37° C por 5 h	52
Gráfico 3	Perfil de disolución de AG-4-fenilcumarina a pH 4.5	58

EMEA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
SS	Secretaría de Salud
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
BCS	Biopharmaceutics Classification System
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
USP	United States Pharmacopeial
OMS	Organización Mundial de la Salud
EUA	Estados Unidos de América
NOM	Norma Oficial Mexicana
ANDA	Abbreviated New Drug Application
NDA	New Drug Application
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
AG-4-fenilcumarina	5-O-[[β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina
g	Gramo
mg	Miligramo
μ g	Microgramo
L	Litro

mL	Mililitro
μ L	Microlitro
$^{\circ}$ C	Grados Celsius
nm	Nanómetro
mm	Milímetro
rpm	Revoluciones por minuto
h	Hora
min	Minuto
CV	Coefficiente de Variación
DE	Desviación Estándar
DEA	Desviación Estándar Absoluta
ERR	Error Relativo a la Regresión
UV	Ultravioleta
TFA	Ácido Trifluoroacético
ACN	Acetonitrilo
SA	Solución Amortiguadora

INTRODUCCIÓN

En México, las plantas medicinales forman parte esencial de las estrategias generadas por la población para enfrentar sus enfermedades cotidianas. Esta práctica no es nueva y se da en nuestro país no solamente en el medio indígena y rural, sino también en zonas urbanas y suburbanas, como resultado de la considerable diversidad biológica del país, de la naturaleza pluriétnica de su población y de la necesidad de recursos accesibles frente a muy diversos padecimientos.

En la actualidad, nuestro país dispone de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, publicada en 2004, sin embargo la información que en ella encontramos corresponde a la publicada en las farmacopeas española y europea. La utilidad de estas monografías en el control de calidad de las plantas introducidas, pero de gran consumo en el México actual, puede ser cuestionada ya que las plantas que se cultivan en distintas regiones del mundo varían en composición, eficacia y toxicidad; estas variaciones deben considerarse al establecer las pruebas de calidad a dichas plantas. Por otro lado, las monografías de plantas autóctonas son prácticamente inexistentes en esta primera edición de la Farmacopea Herbolaria. La razón es que no se dispone de la información científica necesaria para integrarlas.

Antes de su puesta en el mercado, todo nuevo medicamento debe probar su eficacia y su seguridad. Organismos de regulación como la EMEA (European Medicines Agency), la FDA (Food and Drug Administration) en Estados Unidos o la SS (Secretaría de Salud) en México se encargan de establecer los procedimientos de pruebas para medicamentos y de velar por su aplicación. La Secretaría de Salud, a través de la COFEPRIS, que es un órgano descentralizado, actualmente se encuentra en proceso de cambio, estableciendo nuevos reglamentos para el control de medicamentos herbolarios.

Cabe recordar que una vez que un medicamento es considerado prometedor, pasa a la fase de investigación preclínica, donde se analiza “in-vitro” (es decir, en laboratorio, por ejemplo, en cultivos celulares) y a continuación “in-vivo” en animales de laboratorio. Esta etapa es indispensable para asegurar la seguridad de las primeras fases de ensayos en el hombre. Si el medicamento pasa con éxito la fase de pruebas preclínicas, entra en fase de investigación clínica, en la cual el medicamento es evaluado en humanos.

Como parte de la investigación preclínica, durante el desarrollo de la formulación es fundamental establecer el perfil de disolución del fármaco en la forma de dosificación seleccionada. Dicha etapa es importante ya el proceso de absorción de un fármaco contenido en una forma farmacéutica sólida, después de la administración oral, depende, entre otros aspectos, de la liberación del principio activo del producto y de la disolución o solubilización en las condiciones fisiológicas. Debido a la naturaleza de estos factores, la evaluación de la velocidad de disolución in vitro puede ser una predicción del comportamiento in vivo, siempre y cuando el paso limitante para la absorción sea la disolución.

Con base en lo antes expuesto, Guerrero Analco y colaboradores desarrollaron la investigación científica (2005, 2006 y 2007), con el fin de elaborar la monografía correspondiente a la especie *H. standleyana*, la cual es una especie ampliamente utilizada en México con fines terapéuticos, principalmente para el tratamiento de la diabetes mellitus, padecimiento que afecta a gran parte de la población mexicana y que va en aumento. Entre sus resultados, comprobaron que un extracto integro preparado a partir de la corteza de *H. standleyana* ocasiona un decremento significativo de la concentración de glucosa en sangre de ratas normales y diabéticas. El fraccionamiento biodirigido del extracto antihiper glucémico permitió el aislamiento y la caracterización de cinco compuestos, entre los que se encuentra la 5-O-[β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina, cumarina identificada como el principio activo responsable de la actividad antihiper glucémica del extracto. El preparado fitofarmacéutico, desarrollado a partir del extracto acuoso de la corteza de árbol, se encuentra contenido en cápsulas de gelatina dura para continuar con su estudio.

Con el fin de continuar el trabajo de investigación realizado por Guerrero Analco y colaboradores, el presente trabajo tiene como principales objetivos desarrollar y validar un método analítico para cuantificar mediante CLAR el compuesto 5-O-[β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina presente en las cápsulas de gelatina dura; así como desarrollar el perfil de disolución de dichas cápsulas a pH 4.5 para determinar su comportamiento en ese pH.

GENERALIDADES

2.1 LA MEDICINA HERBOLARIA EN MÉXICO

Las plantas medicinales juegan un papel primordial en los sistemas de salud de numerosas regiones del mundo, en particular en los países en vías de desarrollo, algunos de los cuales cuentan con sistemas de medicina tradicional milenarios. En el caso específico de México, las plantas medicinales han constituido desde épocas precolombinas, el recurso más importante con el que cuenta la población para procurar alivio a sus enfermedades. Al igual que en otras regiones del mundo, muchas especies se explotan y comercializan de manera irracional, muchas veces bajo la creencia que son inocuas. Aun mas, estas plantas y los productos derivados de ellas no son sujetos a control de calidad alguno, por lo que en muchas ocasiones el usuario consume productos adulterados o de mala calidad. A pesar de ello a la fecha no se han elaborado monografías para este tipo de productos de manera rigurosa

En México, las plantas medicinales forman parte esencial de las estrategias generadas por la población para enfrentar sus enfermedades cotidianas. Esta presencia relevante se da en nuestro país como resultado de la considerable diversidad biológica del país, de la naturaleza pluriétnica de su población y de la necesidad de recursos accesibles frente a muy diversos padecimientos. Lo anterior se enmarca en el término *herbolaria* que no refiere exclusivamente al conjunto de especies medicinales utilizadas empíricamente, sino también al saber que articula la aplicación de esos recursos y que es motivo de creciente interés.

La riqueza florística de México, la abundancia y diversidad de su flora medicinal, fueron reconocidas desde la época precortesiana. Durante las jornadas mismas de la conquista, los españoles se percataron de la presencia y eficacia de la medicina nativa. Las plantas medicinales de México fueron pronto objeto de comercio hacia Europa, y han motivado desde entonces numerosas y diversas investigaciones en varias de sus facetas. Sin embargo, su aplicación empírica ya llevaba implícita desde antes de la conquista un profundo saber, resultado de una investigación sistemática desde la perspectiva de las ciencias autóctonas.

Las plantas medicinales no son inocuas; tienen un efecto terapéutico sobre el ser humano e implican riesgos cuando se emplean de forma inapropiada. Por ello, es necesario establecer lineamientos oficiales relacionados con el control de calidad, destinados a asegurar en la medida de lo posible la idoneidad de las plantas utilizadas en nuestro país.

La atracción en ascenso por el uso de las plantas medicinales en México, y también su creciente promoción mercantil, no son privativas del país, sino comunes en diversas regiones del mundo, dicho interés en aumento tiene implicaciones sanitarias no desdeñables tanto positivas como negativas, las cuales forman parte de los factores que han orillado a la Secretaría de Salud a generar una regulación en cuanto a dichos productos; sin embargo dicha regulación es muy pobre en comparación con la existente para los medicamentos aislados y químicamente definidos, por lo que los esfuerzos por atender dicha área, así como el impulsar el aprovechamiento del potencial terapéutico de la flora en México continúan.

2.2 COPALCHI

La palabra “copalchi” proviene de dos palabras del náhuatl “copal” y “chichic” que significan “incienso amargo o resina de incienso amargo”, respectivamente. Este término se utiliza para designar al menos a 11 especies de árboles o arbustos que pertenecen a las familias Rubiaceae y Euphorbiaceae y que de acuerdo a algunos autores conforman un complejo de plantas medicinales. Las plantas del complejo copalchi se caracterizan por sus cortezas extremadamente amargas y útiles en el tratamiento del paludismo y de la diabetes.

Dentro de la familia Rubiaceae existen cinco géneros que son los más utilizados y comercializados: *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC) Bullock, *Exostema caribaeum* (Jacq.) Rom. Et Schult., *E. Mexicanum* Gray e *Hintonia standleyana* Bullock; a su vez el género *Hintonia* está constituido por cuatro especies: *H. latiflora*, *H. standleyana*, *H. octomera* (Hemsley) Bullock y *H. lumaeanana* (Baillon) Bullock.

H. standleyana se conoce popularmente con los nombres de copalchi, falsa quina, cocostic-quina y quina amarilla. La corteza de la planta se utiliza principalmente en la medicina tradicional para el tratamiento de fiebres asociadas al paludismo, para tratar la diabetes y otros padecimientos. Su distribución geográfica abarca el centro y sur de México (cuenca alta del río Balsas). Morfológicamente se observa que los lóbulos y la corola de *H. standleyana* son pubescentes y blancos, la superficie de las hojas también es pubescente y en el envés se presentan vellosidades a lo largo de las venas.

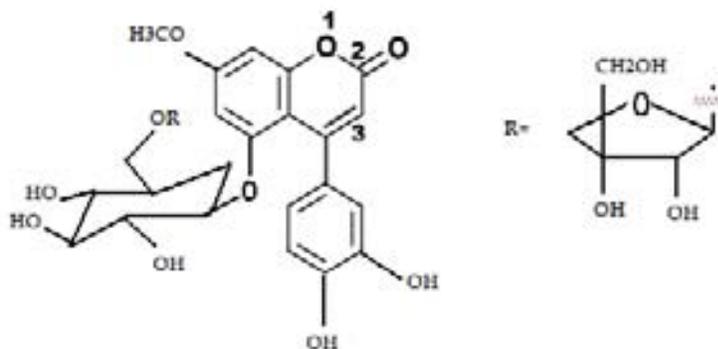


Figura 1. *Hintonia standleyana* Bullock (Rubiaceae)

El primer estudio fotoquímico y farmacológico orientado a establecer la inocuidad, eficacia y la composición química de la especie *H. standleyana* se realizó por Guerrero Analco y colaboradores en las instalaciones del conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM en el año 2007. En dicho estudio se identificaron compuestos de naturaleza glicosídica, a partir del extracto de la corteza de *H. standleyana*, los cuales constituyen nuevos productos naturales y algunos de los cuales se identifican como los principios antidiabéticos de dicha especie, tal caso es para la 5-O-[β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina.

2.3 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LA 5-O-[β-D-APIOFURANOSIL-(1→6)-β-D-GLUCOPIRANOSIL]-7-METOXI-3',4'-DIHIDROXI-4-FENILCUMARINA

Fórmula estructural:



Nombre químico: 5-O-[β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina.

Fórmula condensada: $C_{27}H_{30}O_{15}$

Peso Molecular: 594 g/mol

Punto de fusión: $> 250^{\circ} C$

Descripción: Polvo cristalino de color amarillo

Soluble en: agua, etanol, metanol, isobutanol

Insoluble en: acetonitrilo, cloroformo, acetato de etilo

pKa: no determinado

λ máxima de absorción UV (6mg/ml de agua): 255.7 nm y 326.9 nm

2.4 GENERALIDADES DE LA DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica debida a que el páncreas no produce insulina suficiente o a que el organismo no la puede utilizar eficazmente. La insulina es una hormona que regula el azúcar en la sangre (glucemia). La hiperglucemia (aumento de la glucemia) es un efecto frecuente de la diabetes no controlada, y con el tiempo produce importantes lesiones en muchos sistemas orgánicos, y en particular en los nervios y los vasos sanguíneos.

La diabetes mellitus se clasifica principalmente en tres tipos:

▪ **Diabetes Tipo I:** antes conocida como diabetes insulino dependiente, se caracteriza por una ausencia de la producción de insulina debido a la destrucción de las células beta del páncreas por procesos autoinmunes o idiopáticos. Sin la administración diaria de insulina exógena, este tipo de diabetes lleva rápidamente a la muerte.

Sin suficiente insulina, la glucosa se acumula en el torrente sanguíneo, en lugar de penetrar en las células. El cuerpo es incapaz de utilizar la glucosa como energía a pesar de los altos niveles en el torrente sanguíneo, lo que lleva a que aumente el hambre. Además, los altos niveles de glucemia causan aumento de la micción y esto lleva a que se presente sed excesiva.

▪ **Diabetes Tipo II:** antes conocida como diabetes no insulino dependiente, se debe a que el organismo no utiliza eficazmente la insulina. El 90% de los diabéticos del mundo padecen diabetes de tipo 2, que se debe en gran parte a la inactividad física y al peso corporal excesivo.

La diabetes es causada por un problema en la forma en que el cuerpo produce o utiliza la insulina. Puede haber una resistencia a la insulina o una producción insuficiente de insulina para la utilización en las células del cuerpo. Por lo general, este tipo de diabetes se desarrolla gradualmente, debido a que el páncreas se va deteriorando con el tiempo, por la sobreproducción de insulina en primera instancia y el posteriormente el déficit. Los síntomas pueden ser similares a los de la diabetes de tipo I, pero menos acentuados. En consecuencia, es posible que la enfermedad sólo se diagnostique varios años después de su inicio, una vez que ya han aparecido sus complicaciones. Hasta hace poco este tipo de diabetes sólo se observaba en los adultos, pero ahora también empieza a verse en niños obesos.

▪ **Diabetes gestacional:** es la hiperglucemia que se identifica por vez primera durante el embarazo. Sus síntomas son similares a los de la diabetes de tipo II, pero suele diagnosticarse por las pruebas realizadas durante los exámenes prenatales, más que por la manifestación de síntomas.

A diferencia de la diabetes de tipo I, la diabetes gestacional no es causada por la carencia de insulina, sino por los efectos bloqueadores de las otras hormonas en la insulina producida, una condición referida como resistencia a la insulina.

2.4.1 LA INSULINA

La insulina es una hormona polipeptídica, producida por las células beta de los islotes de Langherhans de una glándula denominada páncreas. Estas células la producen en forma de un precursor activo denominado proinsulina que posteriormente pasará al aparato de Golgi donde se elimina un parte y se unen los dos fragmentos restantes mediante puentes de disulfuro.

Al viajar por la sangre la glucosa necesita combinarse con insulina para penetrar en las células. Al no existir insulina (Diabetes Mellitus tipo I) o al no ser esta reconocida por las células (Diabetes Mellitus tipo II), la glucosa no ingresa a las células y su concentración aumenta, elevando la glicemia y dando lugar a lo que se denomina hiperglicemia. Mantiene la concentración de glucosa en la sangre. Lo consigue porque cuando el nivel de glucosa es elevada el páncreas la libera a la sangre. Su función es favorecer la absorción celular de la glucosa. Es una de las dos hormonas que produce el páncreas junto con el glucagón (al contrario de la insulina, cuando el nivel de glucosa disminuye es liberado a la sangre).

2.4.2 LA DIABETES MELLITUS COMO PROBLEMA SOCIAL

La incidencia de la diabetes, que causa cada año la muerte de 3,2 millones de personas en el mundo, se incrementará hasta llegar a afectar a 366 millones de ciudadanos en el año 2030 si la población no cambia los hábitos de vida que conducen al sobrepeso y la obesidad. Éste es el alarmante panorama que muestra un informe presentado por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2004). Actualmente existen al menos 171 millones de diabéticos en el mundo y esta cifra podría aumentar un 150% para el año 2030, según señala el informe. En concreto, según estas estimaciones, cada minuto se producen en el mundo seis muertes por diabetes o afecciones conexas, cifra que triplica los cálculos precedentes.

A diferencia de lo que sucede en los países ricos, en los pobres las dos terceras partes de diabéticos están en edad de trabajar (entre 35 y 64 años), mientras que en el mundo industrializado más de la mitad de enfermos tiene más de 65 años.

Los primeros lugares en la lista de los diez países con el mayor número de personas que sufren diabetes en el mundo lo ocupan India, China y EUA. Les siguen, en orden descendente, Indonesia, Japón, Pakistán, Rusia, Brasil, Italia y Bangladesh. La OMS ha observado que el incremento más dramático de casos se ha producido en Asia, especialmente en China y la India, pero la situación se agrava rápidamente también en África y América Latina. En este último lugar Brasil cuenta con el mayor número de enfermos con 4,5 millones de casos, seguido de México con 2,1 millones, Argentina con 1,4 millones, Colombia con 883.000 casos y Perú con 754.000 casos.

2.5 LA FORMULACIÓN DE MEDICAMENTOS Y LA BIOFARMACIA

La formulación de los medicamentos generalmente incluye el principio activo y una selección de ingredientes (excipientes) que conforman la forma de dosificación (tabletas, capsulas, etc.). Los medicamentos son diseñados para liberar el fármaco para efectos sistemáticos o locales. El diseño y formulación de medicamentos requiere una profunda comprensión de los principios fisicoquímicos y biofarmacéuticos en la liberación de fármacos.

La Biofarmacia es el estudio del impacto *in-vivo* de las propiedades fisicoquímicas del fármaco y del medicamento en la liberación del fármaco en el cuerpo bajo condiciones normales o patológicas. El principal interés de la Biofarmacia es la biodisponibilidad de los fármacos. La biodisponibilidad se refiere a la cantidad y magnitud de principio activo que esta disponible en el sitio de acción.

Los estudios biofarmacéuticos permiten el diseño racional de medicamentos basándose en:

- 1) Las propiedades físicas y químicas del fármaco.
- 2) La vía de administración del medicamento, incluyendo la naturaleza anatómica y fisiológica del sitio de aplicación.
- 3) El efecto farmacodinámico deseado (acción inmediata o prolongada).
- 4) Propiedades toxicológicas del fármaco.
- 5) Seguridad de los excipientes.
- 6) Efecto de los excipientes y de la forma farmacéutica en la liberación del fármaco.

Cada vía de administración de fármacos presenta consideraciones biofarmacéuticas especiales para el diseño de un medicamento. Para elegir la vía de administración de un fármaco y realizar un diseño conveniente de un medicamento, la biodisponibilidad del principio activo puede variar de una rápida y completa absorción a una lenta y sostenida velocidad de absorción o inclusive prácticamente no absorberse, según el objetivo terapéutico. Una vez que el fármaco es absorbido sistémicamente, ocurren los procesos fisiológicos normales para la distribución y eliminación, que por lo general no están influenciados por la formulación del medicamento. La velocidad de liberación del fármaco del medicamento, así como el grado y tipo de absorción del fármaco, son importantes para determinar la intensidad y duración de la acción del fármaco.

La absorción sistémica del fármaco consiste en la sucesión de ciertos procesos, tales procesos para los medicamentos sólidos orales de liberación inmediata son: (1) la desintegración del medicamento y la subsecuente liberación del fármaco, (2) la disolución del fármaco en un ambiente acuoso y (3) la absorción a través de las membranas celulares.

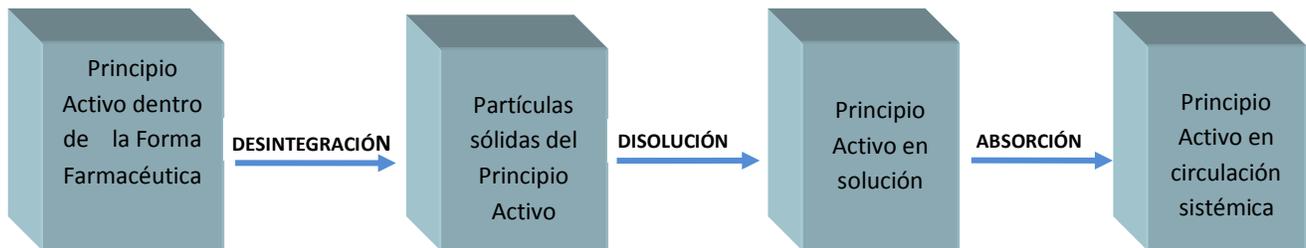


Figura 2. Proceso por el cual un fármaco llega a la circulación sistémica

En el proceso de desintegración, disolución y absorción del fármaco, la velocidad a la cual el fármaco llega a la circulación sistémica se determina por la etapa más lenta de la secuencia. Excepto para los medicamentos de liberación controlada, la desintegración de un medicamento oral sólido es usualmente más rápida que la disolución y la absorción del fármaco. Para fármacos que tienen una solubilidad acuosa muy pobre, la velocidad a la cual se disuelve el fármaco (disolución) es a menudo el paso más lento, por lo tanto, ejerce un efecto limitante en la biodisponibilidad del fármaco. En contraste, para un fármaco que tiene una alta solubilidad en agua, la velocidad de disolución es rápida, y la velocidad a la cual el fármaco atraviesa las membranas celulares puede ser el paso limitante.

2.5.1 DESINTEGRACIÓN

Para las formas farmacéuticas orales de liberación inmediata, el medicamento debe desintegrarse en pequeñas partículas para liberar el principio activo. El proceso de desintegración no implica la completa disolución de la forma farmacéutica y/o del principio activo. Una completa desintegración es definida por la USP como “el estado en el cual ningún residuo de la unidad, excepto fragmentos del recubrimiento insoluble o cápsulas permanecen en la malla del equipo como una masa insoluble”. Sin embargo la prueba de desintegración permite la medición precisa de la formación de fragmentos, gránulos o agregados de las formas farmacéuticas sólidas; a partir de éstos ensayos no se obtiene información sobre el grado de disolución del principio activo. A pesar de lo anterior, ha habido un cierto interés en utilizar la prueba de desintegración para poder clasificar los fármacos dentro del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS).

En general la prueba de desintegración sirve como un componente del control de calidad durante la producción de formas farmacéuticas sólidas.

2.5.2 DISOLUCIÓN

Disolución se define como el proceso por medio del cual una sustancia se dispersa en otra, a nivel molecular. Dicho proceso está determinado por la afinidad entre ambas especies, dando como origen a una solución, la cual es una dispersión molecular homogénea.

El proceso de absorción de un fármaco contenido en una forma farmacéutica sólida, después de la administración oral, depende, entre otros aspectos, de la liberación del principio activo del producto y de la disolución o solubilización en las condiciones fisiológicas; debido a la naturaleza de estos factores, la evaluación de la velocidad de disolución *in vitro* puede ser una predicción del comportamiento *in vivo*, siempre y cuando el paso limitante para la absorción sea la disolución. En base a esta consideración, se utilizan las pruebas de disolución *in vitro* para las formas de dosificación oral sólidas, como comprimidos y cápsulas, para evaluar la calidad de un producto medicinal lote a lote; así como para guiar el desarrollo de nuevas formulaciones (para determinar si existen interferencias de los excipientes o del proceso de manufactura y en su caso aplicar medidas correctivas pertinentes); asegurar la calidad y el rendimiento continuo del producto después de ciertos cambios, tales como modificaciones en la formulación, el proceso de fabricación, el sitio de fabricación y el aumento en escala del proceso de fabricación y en algunos casos, para predecir la biodisponibilidad y bioequivalencia de los productos.

El perfil de disolución es la determinación experimental de la cantidad de fármaco disuelto a diferentes tiempos, en condiciones experimentales controladas, a partir de la forma farmacéutica y se representa gráficamente como la velocidad de disolución (tiempo), contra el porcentaje de fármaco disuelto.

En México, la Secretaría de Salud a través de la NOM-177-SSA1-1998, establece los lineamientos para llevar a cabo un perfil de disolución como prueba de intercambiabilidad de medicamentos. En dicha norma se especifica que para realizar el perfil de disolución, deben seleccionarse por lo menos cinco tiempos de muestreo (excepto el tiempo cero) que permitan caracterizar apropiadamente la curva ascendente y la fase de meseta. Únicamente dos puntos estarán en la meseta de la curva y los otros tres distribuidos entre la fase ascendente y de inflexión. Cuando el 85

por ciento del fármaco se disuelve en un tiempo menor o igual a quince minutos, no es necesario caracterizar la curva ascendente, pero los tiempos de muestreo deben estar suficientemente espaciados a lo largo del perfil de disolución; los muestreos deben realizarse, dentro de los tiempos establecidos en el método de evaluación con una variación que no afecte los resultados de la prueba. Puede utilizarse una curva de calibración de la sustancia de referencia para calcular por interpolación la concentración del fármaco disuelto.

El método analítico que se utilice para construir el perfil de disolución debe estar debidamente validado, y cumplir al menos con los siguientes parámetros: linealidad, y precisión. Los criterios y requisitos que deben cuidarse en cuanto al equipo para la realización de perfiles de disolución en formas farmacéuticas orales de liberación inmediata son: verificar que el equipo cumpla con las dimensiones y especificaciones descritas en el método general de análisis de la FEUM o de la farmacopea utilizada, así como con la normatividad aplicable. Evaluar la magnitud de la vibración del equipo en condiciones estáticas. Calibrar el equipo de disolución realizando las pruebas de confiabilidad del equipo con tabletas calibradoras cuya certificación sea trazable y los resultados de estas pruebas deben estar dentro de los límites de aceptación.

En Estados Unidos de América, la instancia encargada de la regulación en cuanto a la fabricación, distribución y venta de Medicamentos es la FDA (Food and Drug Administration), a la cual se le hacen llegar las solicitudes de fármacos nuevos (NDA), las cuales contienen datos de biodisponibilidad y de disolución *in vitro* que, junto con los datos de química, fabricación y controles, caracterizan la calidad y el rendimiento del producto terapéutico. Se requieren datos de bioequivalencia aceptables y datos comparables de disolución *in vitro* para la aprobación de las solicitudes abreviadas de fármacos nuevos (ANDA) (21 CFR 314.94). Las especificaciones *in vitro* para los productos genéricos deberán establecerse en base a un perfil de disolución. Una vez establecidas las especificaciones en una NDA, se publican las

especificaciones de disolución para la seguridad cualitativa de lote en lote en la *Farmacopea de los Estados Unidos (USP)* como normas en compendio, que se convierten en las especificaciones oficiales para todos los productos genéricos.

2.5.2.1 FACTORES QUE AFECTAN LA DISOLUCIÓN DE FORMAS FARMACÉUTICAS SÓLIDAS

Para determinar la velocidad de disolución en los preparados sólidos en condiciones estandarizadas, deben considerarse diversos procesos fisicoquímicos como los procesos de humectación, la capacidad de penetración del medio de disolución, el proceso de hinchamiento, la desintegración y la disgregación.

La humectación de la superficie de los preparados sólidos controla el acceso de líquido hacia la superficie del sólido y muchas veces es el factor limitante en el proceso de disolución. La velocidad de la humectación depende directamente de la tensión superficial en la interfase y el ángulo de contacto entre la superficie del sólido y el líquido. Además, la presencia de aire en el medio de disolución hace que las burbujas de aire sean atrapadas en los poros de los comprimidos y actúen como barrera en la interfase. En el caso de las cápsulas, la capa de gelatina es extremadamente hidrofílica y por lo tanto no existen problema en cuanto a la capacidad de humectación del preparado (si bien pueden existir en cuanto a los polvos en su interior).

Una vez que el preparado sólido se ha desintegrado en gránulos o agregados, las características de penetración desempeñan un papel primario en el proceso de disgregación. Los lubricantes hidrofóbicos disminuyen la velocidad de penetración y por lo tanto el proceso de disgregación. El gran tamaño de los poros facilita la

penetración, pero si es demasiado grande puede inhibirla por disminución de la tensión interna causada por el hinchamiento del desintegrante.

Cuando se produce la disgregación y dislocación, las partículas del fármaco quedan expuestas al medio de disolución y la disolución tiene lugar como lo marca la teoría de la película que indica que una partícula sólida sumergida en un líquido es sometida a dos pasos consecutivos: el primer paso, la solución, es casi instantáneo; el segundo la difusión, es mucho más lento y por lo tanto es el paso limitante de la velocidad. La velocidad de la disolución se define como la cantidad de fármaco que se disuelve por unidad de tiempo bajo condiciones estandarizadas de la interface líquida/sólida, la temperatura y la composición del solvente.

2.5.2.2 FACTORES QUE IMPACTAN EN LA VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN

Se clasifican en 5 categorías:

- 1) Factores asociados a las propiedades fisicoquímicas del fármaco
- 2) Factores asociados a la formulación y al proceso de fabricación
- 3) Factores asociados al equipo de disolución
- 4) Factores asociados al medio de disolución
- 5) Factores asociados al medio ambiente

2.5.2.2.1 FACTORES ASOCIADOS A LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL FÁRMACO

Las propiedades fisicoquímicas del fármaco desempeñan un papel primario en el control de su disolución a partir de un preparado, como son:

- Estado amorfo o cristalino. Las formas amorfas de un fármaco usualmente presentan mayor solubilidad y por lo tanto mejor grado de disolución en comparación con la que presenta una forma cristalina.
- Grado de hidratación. El grado de hidratación es un factor importante ya que se ha encontrado que las formas anhidras tienen una solubilidad y disolución acuosa mayor que las formas hidratadas.
- Estado químico (ácido, base o sal). La formación de sales tiene por objetivo tener una forma ionizada del fármaco, para aumentar su disolución, el pKa del compuesto también influye significativamente.
- Tamaño de partícula. Dado que el área de superficie aumenta con la disminución del tamaño de partícula, pueden lograrse velocidades de disolución mayores.
- Solubilidad. La solubilidad es un parámetro termodinámico que representa la concentración de la solución de un fármaco en equilibrio con el soluto, según la ecuación de Noyes-Whitney, la solubilidad de una sustancia representa el factor más importante en la velocidad de disolución, ya que si la superficie del sólido permanece constante durante todo el proceso, la velocidad de disolución es directamente proporcional a la solubilidad.

2.5.2.2 FACTORES ASOCIADOS A LA FORMULACIÓN Y AL PROCESO DE FABRICACIÓN

Se ha demostrado que la velocidad de disolución de un fármaco puro puede ser alterada en forma significativa cuando se mezcla con diversos aditivos durante el proceso de elaboración de preparados sólidos. Estos aditivos se agregan para satisfacer ciertas funciones farmacéuticas como diluyentes, tinturas, fijadores, agentes de granulación, desintegrantes y lubricantes; por ejemplo:

- Diluyentes y desintegrantes. Uno de los diluyentes más utilizados es el almidón, el cual puede aumentar la velocidad de disolución en fármacos hidrófobos al formar una capa fina de partículas de almidón impartiendo una propiedad hidrofílica al preparado y por ende mejora la velocidad de disolución.
- Compactadores y agentes de granulación. Pueden darle características hidrofílicas a la superficie hidrofóbica de un fármaco, mejorando su solubilidad.
- Lubricantes. Los lubricantes hidrófobos como el estearato de magnesio, estearato de aluminio, ácido esteárico y el talco reducen el área de la interfase del fármaco con el disolvente por la modificación de las características de la superficie del comprimido, dando una disminución en la capacidad de humidificación, la prolongación de su tiempo de desintegración y disminución de su disolución.

Los numerosos factores de procesamiento involucrados en la elaboración de los comprimidos influyen mucho sobre las velocidades de disolución. El método de granulación, el tamaño, la densidad, el contenido de humedad y la antigüedad de los gránulos así como la fuerza de compresión utilizada en el proceso de formación de los comprimidos, contribuyen a las características de la velocidad de disolución del producto final.

El proceso de granulación en general aumenta la velocidad de disolución de los fármacos poco solubles. El proceso de granulación húmeda ha sido considerado tradicionalmente como un método superior al procedimiento de doble compresión o de compresión en seco. En general la granulación húmeda mejora la velocidad de disolución por medio de proporcionar propiedades hidrofílicas a la superficie de los granulados.

Sin embargo con los nuevos equipos y materiales para la elaboración de comprimidos, resulta más evidente que una cuidadosa preparación, una apropiada secuencia de mezclado y el tiempo en que se agregan los diversos ingredientes son los criterios principales que afectan las características de disolución.

También se ha encontrado que la fuerza de compresión tiene un gran efecto sobre la disolución, ya que de esta depende la densidad aparente, la porosidad, la dureza y el tiempo de desintegración; el efecto inhibitor es debido al aumento de la unión entre las partículas produciendo un aumento en la densidad y dureza y por lo tanto la reducción de la penetrabilidad del disolvente.

2.5.2.2.3 FACTORES ASOCIADOS AL EQUIPO DE DISOLUCIÓN

La mayoría de los métodos oficiales construyen sus equipos de la misma manera, sus principales componentes son: contenedores, agitadores, controles de temperatura y sistemas de detección analítica. El diseño y la geometría de los equipos han estado cambiando con el tiempo y se pueden clasificar de acuerdo a la hidrodinamia asociada al equipo; se reconocen dos categorías principales: los métodos de vaso que son sistemas cerrados y los sistemas de flujo continuo de compartimentos abiertos, siendo los aparatos I (canastas) y II (paletas) los más utilizados.

Respecto a la geometría de los aparatos I y II, la desviación que presenten los parámetros a calibrar, afectan los valores de porcentaje disuelto originales, los parámetros son:

Parámetro	% de desviación permitido
Horizontalidad del equipo	-25 a + 2
Centrado de los vasos	-13 a +2
Alineamiento y excentricidad	-8 a +4
Vibración	-10 a +5
Agitación	± 10

2.5.2.2.4 FACTORES ASOCIADOS AL MEDIO DE DISOLUCIÓN

La elección del medio apropiado para las pruebas de disolución depende ampliamente de la solubilidad del fármaco, así como de motivos económicos y prácticos. Existen factores que afectan la disolución del fármaco relacionados con el medio de disolución como son:

- Agitación. Es la forma de asemejar los principales movimientos peristálticos en el tracto gastrointestinal. La relación entre la intensidad de la agitación y la velocidad de disolución varía en forma considerable con el tipo de agitación usado, el grado de flujo laminar y turbulento en el sistema, la forma y el diseño del agitador y las propiedades fisicoquímicas del sólido. Cuando se usa un dispositivo agitador como una paleta, la agitación genera un flujo que continuamente modifica la interfase líquido-sólido entre el disolvente y el fármaco, mejorando la velocidad de disolución.
- Temperatura. Dado que la solubilidad de los fármacos depende de la temperatura, su control cuidadoso durante el proceso es muy importante y debe mantenerse dentro de un intervalo de ± 0.5 de grado. En general se mantiene la temperatura a 37 °C durante las determinaciones de disolución.
- pH. El pH del medio de disolución es muy importante en el desarrollo de una prueba de disolución, ya que dependiendo del pKa del soluto, el pH determinará la carga de la molécula en solución. La estabilidad del medicamento en medios de disolución puede limitar el rango de pH, que se debe mantener en ± 0.05 .

- Tensión superficial. Debido a que las sustancias tensoactivas y los agentes humectantes reducen el ángulo de contacto y por lo tanto mejoran el proceso de penetración de la matriz por el medio de disolución, lo cual produce un aumento de la velocidad de liberación del fármaco.

- Gases disueltos. La cantidad de gas disuelta en equilibrio con el líquido disminuye la temperatura, y el aire disuelto en los medios puede formar burbujas, al depositarse burbujas de aire en la forma farmacéutica produce la disminución de la disolución debido a que la superficie de contacto del sólido con el disolvente es modificada. Por tal motivo es importante deaerear el medio de disolución ya sea por filtración al vacío, burbujeo con Helio, agua caliente colocada a vacío con o sin sonicación o el uso de un dispositivo dosificador de medio, comercialmente disponible.

- Viscosidad. El coeficiente de difusión, y por lo tanto, la movilidad de las partículas disueltas a través de la capa de difusión es inversamente proporcional a la viscosidad del medio, por lo que si se cuenta con una solución viscosa, se afectará negativamente la velocidad de disolución.

2.5.2.2.5 FACTORES ASOCIADOS AL MEDIO AMBIENTE

- Almacenaje y empaque. La temperatura y humedad son factores importantes en el almacenaje y empaque, ya que estas condiciones pueden alterar el contenido de humedad permisible para el fármaco, o bien sensibilizar la afinidad por la humedad de los excipientes, alterando con ello el proceso de disolución.

2.5.2.3 EQUIPOS UTILIZADOS PARA LLEVAR A CABO LAS PRUEBAS DE DISOLUCIÓN IN VITRO

Existen diversos equipos de disolución, los cuales están diseñados para evaluar diferentes formas farmacéuticas. La Farmacopea de cada país, contiene la descripción detallada de las características de los equipos, la metodología y los criterios de aceptación para los productos farmacéuticos que deben ser sometidos a esta prueba. Dentro de los equipos oficiales para realizar pruebas farmacopéicas oficiales se encuentran:

Tabla 1. Tipos de equipos oficiales utilizados en la prueba de disolución

No. de Aparato	Nombre del Aparato	Tipo de Forma Farmacéutica	Referencia Farmacopéica
I	Canastilla Giratoria	Sólidos	FEUM, USP
II	Paletas Giratorias	Sólidos y Suspensiones	FEUM, USP
III	Cilindro Recíproco (BIO DIS)	Sólidos (medicamentos de liberación prolongada)	USP
IV	Celda de Flujo Continuo	Sólidos (medicamentos que contengan fármacos poco solubles en agua)	USP
V	Paleta Sobre Disco	Parche transdérmico	USP
VI	Cilindro Giratorio	Parche transdérmico	USP
VII	Disco Recíproco	Sólidos (medicamentos de liberación prolongada)	USP

Como podemos observar en la **Tabla 1**, en México la FEUM hace referencia a los aparatos I y II, por lo cuál se detallarán a continuación.

2.5.2.3.1 APARATO I: CANASTILLA GIRATORIA

Consta de un vaso cilíndrico de vidrio inactivo transparente, de fondo esférico de 160 a 175 mm de alto y de 98 a 106 mm de diámetro interno con capacidad de 1000 mL, con una tapa que debe estar ajustada para retardar la evaporación y que permita la inserción de un termómetro, así como la toma de muestra, el vaso firmemente ajustado debe estar sumergido en un baño de agua de tamaño adecuado que tenga un ligero movimiento constante y que mantenga la temperatura del medio de disolución a $37^{\circ}\text{C} + 0.5^{\circ}\text{C}$. El eje transmisor debe girar suavemente y sin bamboleo.

El regulador de velocidad de rotación debe mantener la velocidad constante. La velocidad de rotación mas comúnmente usada es 100 rpm. La canastilla consta de dos partes: la parte superior está unida al eje transmisor del movimiento y es de acero inoxidable; se ajusta a la parte inferior por medio de tres ganchos para permitir que se coloque la muestra en el interior de la canastilla y la sostenga firmemente, permitiendo que gire en forma concéntrica al eje del vaso durante la rotación. La canastilla es de acero inoxidable y la malla es del número cuarenta.

Se encuentran disponibles estándares calibradores para asegurar que la operación mecánica y operativa son correctas. Las tabletas calibradoras que contienen prednisona son hechas para pruebas de disolución que requieren tabletas desintegrantes; mientras que las que contienen ácido salicílico son utilizadas como estándar de tabletas no desintegrantes. El aparato I se utiliza preferentemente para cápsulas formas de dosificación que tienden a flotar o a desintegrarse lentamente.

2.5.2.3.2 APARATO II: PALETAS GIRATORIAS

Consta de un vaso cilíndrico de vidrio inerte transparente, de fondo esférico de 160 a 175 mm de alto y de 98 a 106 mm de diámetro interno con capacidad de 1000 mL, con una tapa que debe estar ajustada para retardar la evaporación y que permita la inserción de un termómetro, así como la toma de muestra, el vaso firmemente ajustado debe estar sumergido en un baño de agua de tamaño adecuado que tenga un ligero movimiento constante y que mantenga la temperatura del medio de disolución a $37^{\circ}\text{C} + 0.5^{\circ}\text{C}$. El regulador de velocidad de rotación debe mantener la velocidad constante y con una variación de + cuatro por ciento. La hélice agitadora es una paleta. Para su uso se debe colocar el volumen del medio de disolución, en el vaso del aparato, permitir que la temperatura del medio se equilibre. Se deben colocar las unidades de dosis en el aparato, sin provocar burbujas, y operar inmediatamente a la velocidad y tiempos indicados. Tomar las alícuotas necesarias a los tiempos establecidos, en la zona intermedia entre la superficie del medio de disolución y la parte superior de la paleta, y filtrarlas o dar el tratamiento para determinar la cantidad de principio activo disuelto en las muestras.

Utiliza el mismo tipo de estándares de calibración que el aparato I. Las velocidades más comúnmente utilizadas son 50 rpm para formas farmacéuticas sólidas y 25 rpm para suspensiones. Generalmente se prefiere este aparato para tabletas. Un *sinker*, como lo son unas cuantas vueltas con alambre de platino, puede ser usado para prevenir la flotación de la cápsula o tableta. El *sinker* no debe alterar las características de disolución de la forma farmacéutica.

METODOLOGÍA

3.1 EQUIPO Y MATERIAL

- ✓ Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent Technologies 1100
 - Detector UV-Vis de arreglo de diodos (DAD)
 - Sistema de desgasificación en línea
 - Bomba cuaternaria / isocrática
 - Automuestreador
 - Sistema de recolección de datos HP-Chemstation para sistemas Agilent LC y LC/MS
- ✓ Columna Phenomenex Synergi 4U MAX-RP 80A, C12, 150 x 4.6 mm
- ✓ Balanza analítica Sartorius
- ✓ Disolutor Pharma Alliance Tdt-08I
- ✓ Sonificador Transsonic T70014
- ✓ Sistema de purificación de agua Milli-Q
- ✓ Sistema de filtración para disolventes (Equipo de filtración Millipore, Membrana Millipore tipo HVLP 0.45 µm para filtrar solventes orgánicos y acuosos)
- ✓ Potenciómetro Thermo Orion Modelo 410
- ✓ Lavador ultrasonido Fisher Scientific
- ✓ Termómetro
- ✓ Cronómetro
- ✓ Espátula como-níquel
- ✓ Naves de vidrio para pesar
- ✓ Probeta de vidrio de 500 mL
- ✓ Probeta de plástico de 1000 mL
- ✓ Pipetas Pasteur de plástico
- ✓ Viales de vidrio para equipo cromatográfico con tapones
- ✓ Micropipetas con puntas intercambiables de plástico
- ✓ Matraces aforados (5, 10, 20, 50, 250, 500 y 1000 mL)
- ✓ Vasos de precipitado (250, 500 y 1000 mL)
- ✓ Tubos de ensaye
- ✓ Gradilla para tubos de ensaye

- ✓ Piseta de plástico
- ✓ Filtros swinex
- ✓ Membrana de nylon 0.45 μm (membrana Millipore HAWP04700, Lote: R1BN78967)
- ✓ Filtros de teflón en forma de cubeta poro 10 μm
- ✓ Papel aluminio

3.2 REACTIVOS

- ✓ Agua desionizada
- ✓ Agua destilada
- ✓ Acetonitrilo grado CLAR
- ✓ Hidróxido de sodio perlas: JT Baker Lote No. A38C62
- ✓ Acetato de sodio trihidratado, cristal: JT Baker Lote No. B19C15
- ✓ Acido acético glacial: JT Baker Lote No. Y45C60
- ✓ Acido trifluoroacético concentrado: Aldrich T62200-500G, No de Lote: 06830AE
- ✓ ESTÁNDAR: AG-4-fenilcumarina. Lote RM86-DG0001. Obtenido en el Laboratorio 124, Edificio E, Facultad de Química, UNAM.
- ✓ MUESTRA: Cápsulas con preparado fitofarmacéutico de corteza de árbol *Hintonia standleyana*. Lote: 1506-D, encapsuladas en el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Edificio A, Facultad de Química, UNAM.

NOTA: No existe marbete en las cápsulas, solo se cuenta con los siguientes datos:

- ❖ 1 g del preparado fitofarmacéutico contiene 143.4 mg AG-4-fenilcumarina
- ❖ Peso promedio del contenido de las cápsulas: 223.7 mg

3.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

3.3.1 MEDIO DE DISOLUCIÓN: SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE ACETATOS 0.05 M, pH 4.5 ± 0.05

- Pesar 3.0 g de acetato de sodio trihidratado ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) y colocar en un matraz volumétrico de 1L que contenga aproximadamente 100 mL de agua destilada.
- Medir 1.8 mL de ácido acético glacial (CH_3COOH) y verter al matraz que contiene el agua y el acetato de sodio.
- Aforar con agua destilada.
- Verificar el pH. En caso de ser necesario ajustar con una solución de NaOH saturada o con ácido acético (1:1) según el caso.
- Desgasificar al vacío como se describe a continuación: Colocar el medio de disolución dentro del garrafón de vidrio **B** del equipo desgasificador, colocar las conexiones como se muestra en la **Figura 1**, tapar ambos garrafones y conectar al vacío. Esperar a que todo el contenido del garrafón **B** pase al garrafón **A** cerrar la llave de vacío e invertir las conexiones entre garrafones. Repetir el procedimiento por triplicado.

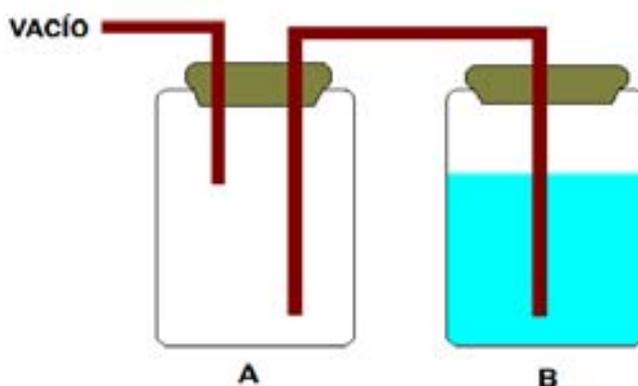


Figura 3. Esquema del equipo desgasificador

3.3.2 AGUA ACIDIFICADA (0.1% TFA)

- En un matraz volumétrico de 500 mL que contenga aproximadamente 100 mL de agua desionizada colocar 500 μ L de ácido trifluoroacético concentrado.
- Aforar con agua desionizada.
- Desgasificar en el sonicador.

3.3.3 SOLUCIÓN STOCK DE ESTÁNDAR DE AG-4-FENILCUMARINA 1000 μ g/mL

- Pesar exactamente 0.005 g de estándar de AG-4-fenilcumarina y transferir a un matraz aforado de 5 mL.
- Aforar con medio de disolución.

3.4 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.4.1 ELECCIÓN DE CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Establecer las condiciones cromatográficas de trabajo para la detección y cuantificación de AG-4-fenilcumarina, tomando como base lo reportado por Díaz Huerta (2007).

- Probar con distintas condiciones, variando la proporción de fase móvil y/o la velocidad de flujo. Para cada condición probada se utiliza una solución 50 µg/mL de AG-4-Fenilcumarina preparada a partir de solución stock de estándar de AG-4-fenilcumarina 1000 µg/mL.

3.4.2 PRUEBA DE CONTROL DE CALIDAD (PESO PROMEDIO)

- Se tomaron al azar 20 cápsulas, se obtuvo el peso individual de cada una y se determinó el peso promedio.

3.4.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

3.4.3.1 VALIDACIÓN DEL SISTEMA

En la NOM-177-SSA1-1998 se menciona que se debe realizar la validación del sistema en cuanto a linealidad y precisión. Experimentalmente no se realizó esta etapa ya que en el trabajo realizado por Díaz Huerta (2007) se llevó a cabo y se obtuvieron datos satisfactorios, por lo que únicamente se llevó a cabo la validación del método.

3.4.3.2 PRUEBAS DE ESTABILIDAD

- Determinar las condiciones de temperatura y tiempo, en las que el compuesto permanece estable.

Procedimiento:

a) Temperatura ambiente en el equipo cromatográfico / 24 h

- Por triplicado se prepara una solución 50 µg/mL de AG-4-fenilcumarina a partir de solución stock de estándar de AG-4-fenilcumarina 1000 µg/mL y se transfieren a un vial.
- Los viales se colocan en el equipo cromatográfico, cubiertos con papel aluminio para evitar contacto con la luz.
- Se hace la primer corrida cromatográfica, tomando los datos obtenidos como tiempo cero; posteriormente se realiza la corrida cromatográfica a cada tiempo de muestreo (1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 y 24 h).

b) 37° C / 5 h

- Por duplicado se prepara una solución 50 µg/mL de AG-4-fenilcumarina a partir de solución stock de estándar de AG-4-fenilcumarina 1000 µg/mL y se transfieren las soluciones a un tubo de ensayo (cada una a un tubo distinto), los cuales se someten a un baño de agua a 37° C (Sistema abierto).
- 1 mL de cada solución se transfieren a un vial. Se realiza la primer corrida cromatográfica (tiempo cero). Se mantiene el resto de la solución en el baño de agua.
- Posteriormente se repite el paso anterior a cada tiempo de muestreo (15, 30, 45, 60, 120, 180 y 300 min).

3.4.3.3 LINEALIDAD

Para evaluar la linealidad se debe preparar una curva con al menos 5 puntos (que incluya los puntos extremos excepto cero) por triplicado. El coeficiente de regresión debe ser mayor o igual que 0.99 y el error relativo debido a la regresión no mayor al 3%.

Procedimiento:

- Se prepara una solución stock 1000 µg/mL con el preparado fitofarmacéutico contenido en cápsulas, a partir de ésta se prepara por triplicado la curva patrón.
- Realizar la corrida cromatográfica de cada una de las muestras.
- Realizar los cálculos pertinentes con las áreas obtenidas para cada muestra.

Cálculos para preparar la solución stock 1000 µg/mL con el preparado fitofarmacéutico:

Se parte de la siguiente igualdad: $10 \text{ mg} / 10 \text{ mL} = 1 \text{ mg} / \text{mL} = 1000 \text{ µg} / \text{mL}$

$$\begin{array}{l} 1.0 \text{ g de preparado fitofarmacéutico} \rightarrow 143.4 \text{ mg AG-4-fenilcumarina} \\ X \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \rightarrow 10.0 \text{ mg AG-4-fenilcumarina} \end{array}$$

$$X = 0.0697 \text{ g} \approx 0.07 \text{ g del preparado fitofarmacéutico}$$

$$0.07 \text{ g del preparado fitofarmacéutico} = 10.0 \text{ mg de AG-4-fenilcumarina}$$

- De acuerdo a los cálculos anteriores, se pesan 0.07 g de preparado fitofarmacéutico contenido en las cápsulas y se transfieren a un matraz aforado de 10 mL y finalmente se afora con SA de acetatos pH 4.5 (Ver **Tabla 2**).

Tabla 2. Preparación de la curva patrón

A partir de	Alícuota de solución stock (µL)	Aforo con SA de acetatos pH 4.5 (mL)	Concentración (µg/mL)
Solución stock 1000 µg/mL	25	10	2.5
	100	10	10.0
	250	10	25.0
	400	10	40.0
	500	10	50.0

Para establecer el rango de concentraciones de la curva patrón se tomo en cuenta la siguiente relación:

1.0 g de preparado fitofarmacéutico → 143.4 mg AG-4-fenilcumarina

0.2234 g de preparado fitofarmacéutico → Y
(Peso promedio del contenido de las cápsulas)

$$Y = 32.03 \text{ mg} \approx 32.0 \text{ mg AG-4-fenilcumarina}$$

Cada cápsula contiene aproximadamente 32.0 mg de AG-4-fenilcumarina

3.4.3.4 EXACTITUD

El promedio del porcentaje de la recuperación de los datos de linealidad no debe variar con respecto a la cantidad nominal en más de 3% en cada punto.

3.4.3.5 PRECISIÓN (REPRODUCIBILIDAD Y REPETIBILIDAD)

Repetibilidad: El coeficiente de variación del porcentaje de recuperación de los datos de linealidad no debe ser mayor que el 3%.

Reproducibilidad: Evaluar el efecto de los eventos aleatorios en la precisión del método analítico, tales como los días, los analistas o los equipos. Debe analizarse una muestra homogénea del producto, al menos por triplicado para probar cada condición. El coeficiente de variación global no debe ser mayor que el 3%.

Procedimiento:

- Reproducibilidad intralaboratorio; se preparan dos curvas patrón, cada una en diferente día.

- Realizar la corrida cromatográfica de cada una de las muestras.

- Realizar los cálculos pertinentes con las áreas obtenidas para cada muestra.

3.4.3.6 PRUEBA DE INFLUENCIA DEL FILTRO

Procedimiento:

- Se preparan una solución de 25 µg/mL (concentración intermedia de la curva patrón), a partir de una solución stock 1000 µg/mL con el preparado fitofarmacéutico contenido en las cápsulas.

Tabla 3. Preparación de las solución para la prueba de influencia del filtro

A partir de	Alícuota de solución stock (µL)	Aforo con SA de acetatos pH 4.5 (mL)	Concentración (µg/mL)
solución stock 1000 µg/mL	1250	50	25

- Se transfiere 1.0 mL de la solución anterior a un vial y se obtiene su respuesta cromatográfica. La respuesta obtenida se consideran como el 100% al realizar los cálculos.
- 3.0 mL de la solución inicial se hacen pasar por el filtro a probar y se determina su respuesta cromatográfica; éste procedimiento se realiza 6 veces utilizando el mismo filtro.
- Con los datos cromatográficos obtenidos para las 6 muestras, se lleva a cabo la relación con respecto a la muestra sin filtrar y se obtiene el promedio del porcentaje retenido por el filtro.
- Utilizando la misma solución 25 µg/mL de preparado fitofarmacéutico, se repite todo el procedimiento usando el segundo filtro a probar.

3.4.4 EVALUACIÓN DEL PERFIL DE DISOLUCIÓN

Procedimiento:

- Encender el disolutor y establecer condiciones de trabajo en el controlador del equipo.
- Verter 900 mL del medio de disolución desgasificado en cada vaso del disolutor, teniendo cuidado de que no se formen burbujas al momento de trasvasar.
- Colocar cada vaso en el en el baño del disolutor, esperar a que se alcance la temperatura de trabajo en cada uno de ellos y se mantenga constante.
- Colocar los vástagos del disolutor en su respectivo lugar; los vástagos deberán tener colocada la canastilla con la correspondiente cápsula en su interior.
- Bajar los vástagos y accionar las rpm
- En cada tiempo de muestreo, se toman 2 mL del medio que contiene cada vaso, haciendo pasar la muestra por el filtro elegido.
- Colocar 1 mL la muestra filtrada en un vial cromatográfico.
- Realizar la corrida cromatográfica (Ver condiciones en el punto 4.1).
- Junto con las muestras problema se realiza la corrida cromatográfica de una curva patrón, preparada de la misma forma que para la prueba de linealidad en la etapa de validación, pero utilizando estándar de AG-4-fenilcumarina en lugar del preparado fitofarmacéutico contenido en las cápsulas, así como un blanco de acetatos.

Condiciones de la prueba:

- ✓ No. de unidades: 12 cápsulas
- ✓ Medio de disolución: SA de Acetatos, 0.05M, pH 4.5 ± 0.05
- ✓ Aparato: USP I (canastillas)
- ✓ Velocidad de agitación: 100 rpm
- ✓ Volumen de medio de disolución en cada vaso: 900 mL
- ✓ Temperatura: 37° C ± 0.5
- ✓ Volumen de muestreo a cada tiempo: 2 mL (sin reposición de medio)
- ✓ Tiempos de muestreo: 10, 15, 20, 30, 45 y 60 min
- ✓ Filtro: Swinex con membrana de nylon 0.45 µm
- ✓ Método de análisis: CLAR



Figura 4. Equipo disolutor utilizado durante el desarrollo experimental

Cálculos para determinar el perfil de disolución:

- Graficar las áreas vs las concentraciones de AG-4-fenilcumarina para cada punto de la curva patrón, obtener la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación.

- Calcular la concentración de cada muestra interpolando el área obtenida y determinar la cantidad disuelta en cada tiempo de muestreo en cada vaso.

- Calcular el porcentaje disuelto en cada tiempo y determinar el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación en por ciento a cada tiempo.

- Elaborar la curva del porcentaje disuelto versus tiempo de muestreo.

RESULTADOS
Y
ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 DETERMINACIÓN DE CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Resultados obtenidos aplicando las condiciones cromatográficas establecidas por Díaz Huerta (2007):

- Fase Móvil: Acetonitrilo - Agua acidificada (0.1% TFA) (19:81)
- Velocidad de flujo: 0.4 mL/min
- Temperatura de la columna: 25° C
- Detector: UV a 327 nm
- Volumen de inyección: 20 µL
- Tiempo de corrida: 14.0 min
- Tiempo de retención de AG-4-fenilcumarina: 11.073

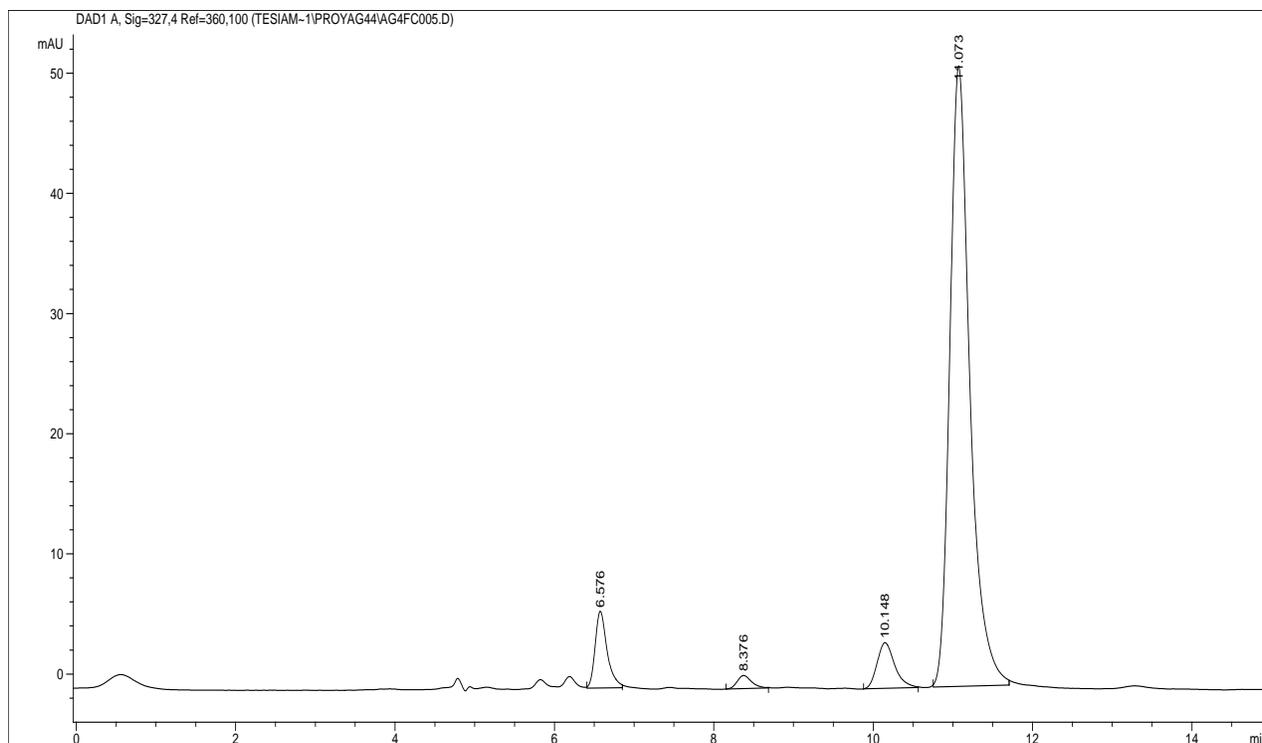


Figura 5. Cromatograma obtenido aplicando las condiciones cromatográficas establecidas por Díaz Huerta (2007)

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se modificaron tanto el flujo como la proporción de fase móvil con el objetivo de obtener un menor tiempo de retención y elegir las mejores condiciones cromatográficas de trabajo.

Las condiciones cromatograficas de trabajo elegidas son:

- Columna: Phenomenex Synergi 4U MAX-RP 80A, C12, 150 x 4.6 mm, empacada con gel sílice, Part No.: ODF-4337-EO, Serial No.: 3417 99-22
- Fase Móvil: Acetonitrilo - Agua acidificada (0.1% TFA) (19:81)
- Velocidad de flujo: 1.0 mL/min
- Temperatura de la columna: 25° C
- Detector: UV a 327 nm
- Volumen de inyección: 20 µL
- Tiempo de corrida: 8.0 min
- Tiempo de retención de AG-4-fenilcumarina: 5.6 min

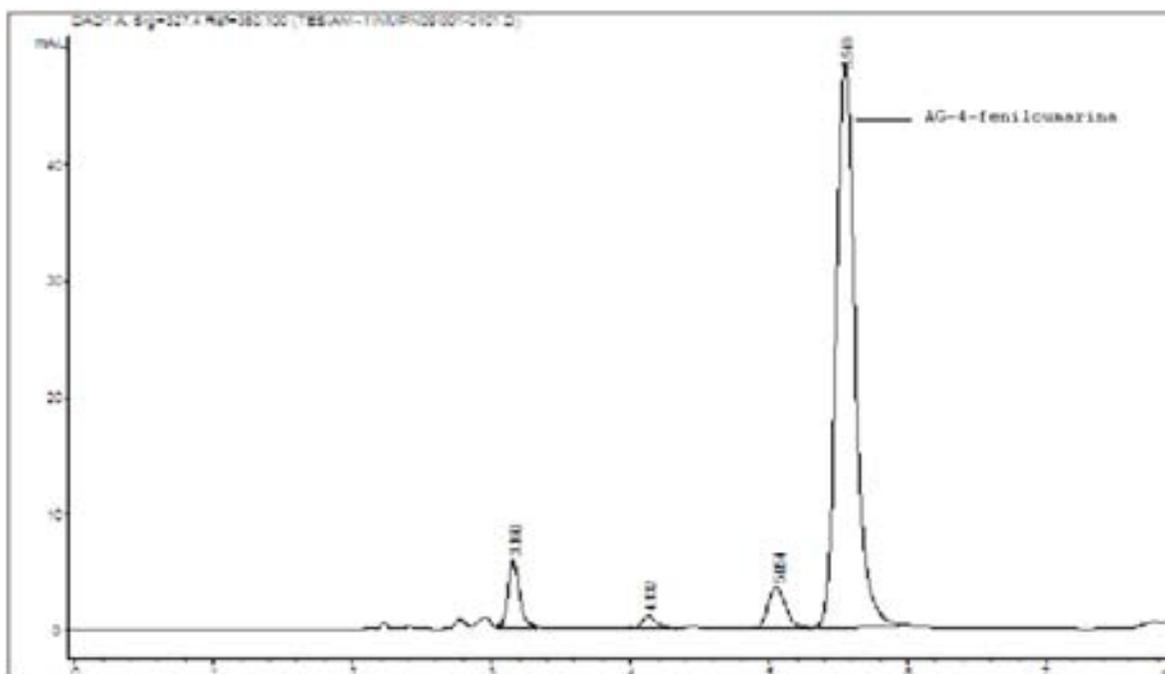


Figura 6. Cromatograma obtenido con las condiciones cromatográficas elegidas (Fase móvil: ACN – Agua acidificada (0.1% TFA) (19:81) y Flujo: 1.0 mL/min)



Figura 7. Cromatógrafo de Líquidos utilizado durante la etapa experimental

4.2 PRUEBA DE CONTROL DE CALIDAD (PESO PROMEDIO)

Tabla 4. Resultados para determinar el peso promedio de las cápsulas

No. de cápsula	Peso de la cápsula con contenido (g)	No. de cápsula	Peso de la cápsula con contenido (g)
1	0.2995	11	0.2970
2	0.2960	12	0.2969
3	0.2976	13	0.2977
4	0.2982	14	0.2972
5	0.2987	15	0.2979
6	0.2970	16	0.2982
7	0.2982	17	0.2969
8	0.2978	18	0.2987
9	0.2970	19	0.2977
10	0.2973	20	0.2979
PROMEDIO		0.2977	
D.E.		0.0007	
% C.V.		0.2423	

4.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

4.3.1 PRUEBAS DE ESTABILIDAD

a) Temperatura ambiente en equipo cromatográfico/ 24 h

Tabla 5. Áreas obtenidas para la AG-4-fenilcumarina durante la prueba de de estabilidad a temperatura ambiente (mAU*s)

TIEMPO (h)	CONTROL	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MUESTRA 3	PROMEDIO	CONC PROM (Mg/mL)	% NO DEGRADADO PROMEDIO
0	356.47415	320.0629	318.46345	325.08115	321.20	50.00	100
1	354.96835	320.23596	320.94333	324.03003	321.74	50.08	100.17
2	355.92816	319.99271	320.6936	323.03024	321.24	50.01	100.01
3	355.85822	319.08368	320.43323	324.6268	321.38	50.03	100.06
5	355.77914	320.40973	320.37857	324.20541	321.66	50.07	100.14
7	354.42624	319.76709	320.04269	324.16739	321.33	50.02	100.04
9	355.6795	320.07568	320.11462	324.11517	321.43	50.04	100.07
11	355.95065	320.62854	319.5816	324.49124	321.57	50.06	100.11
24	356.2962	317.93671	318.56656	323.3472	319.95	49.80	99.61
				PROMEDIO	321.2778		
				D.E.	0.5306		
				% C.V.	0.1651		

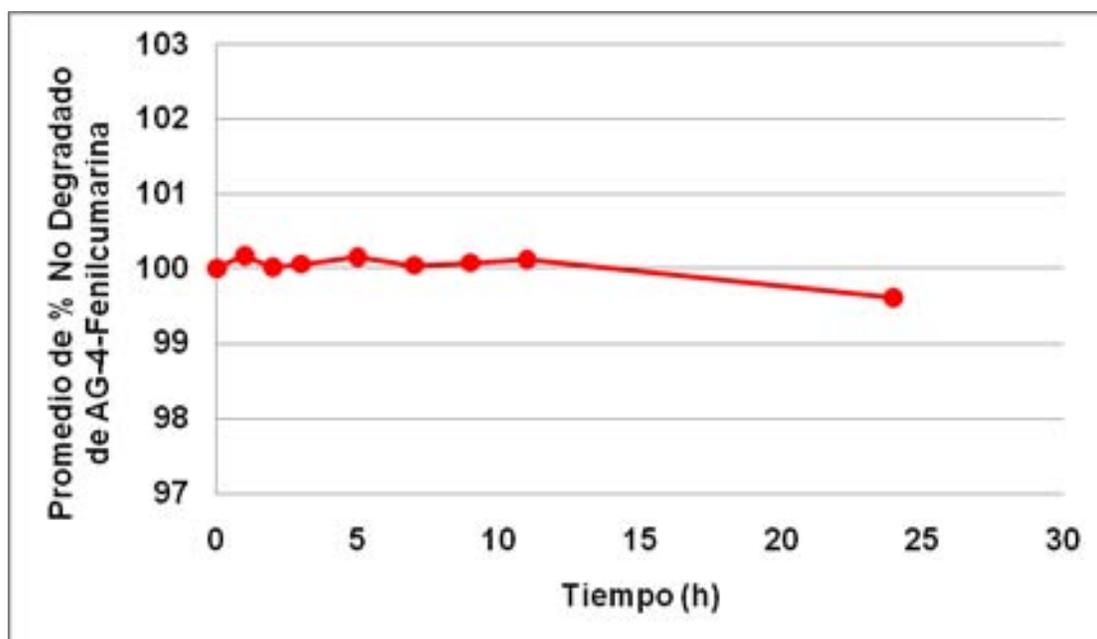


Gráfico 1. % Promedio no degradado de AG-4-fenilcumarina durante la prueba de estabilidad a temperatura ambiente por 24 h

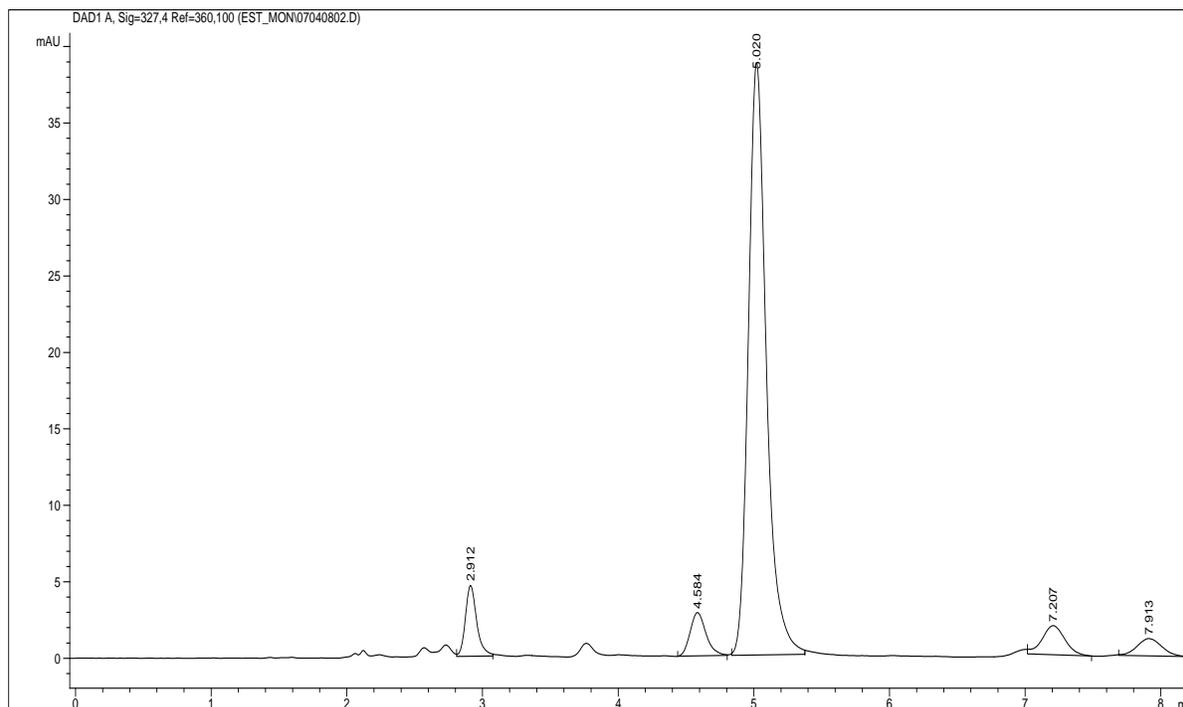


Figura 8. Cromatograma obtenido con el control de AG-4-fenilcumarina en el tiempo de muestreo = 0, durante la prueba de estabilidad a temperatura ambiente

b) 37° C / 5 h

Tabla 6. Áreas obtenidas para la AG-4-fenilcumarina durante la prueba de estabilidad a 37° C (mAU*s)

TIEMPO (min)	MUESTRA 1	MUESTRA 2	PROMEDIO	CONC PROM (µg/mL)	% NO DEGRADADO PROMEDIO
0	317.57556	324.85901	321.22	50.00	100.00
20	318.09805	327.09048	322.59	50.21	100.43
40	314.19305	325.30048	319.75	49.77	99.54
60	318.56793	322.46011	320.51	49.89	99.78
80	317.31766	324.22354	320.77	49.93	99.86
120	312.25171	327.13788	319.69	49.76	99.53
180	314.86954	325.00256	319.94	49.80	99.60
300	315.22842	324.25143	319.74	49.77	99.54
		PROMEDIO	32.5262		
		D.E.	1.0045		
		% C.V.	0.314		

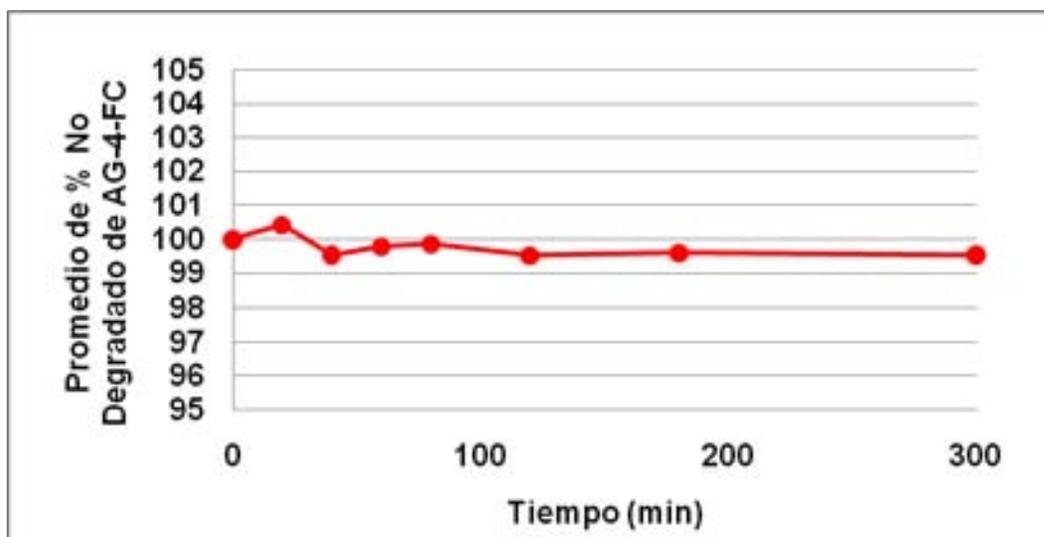


Gráfico 2. % Promedio no degradado de AG-4-fenilcumarina durante la prueba de estabilidad a 37° C por 5 h

Con los datos obtenidos en esta etapa podemos considerar que el compuesto en estudio (AG-4-fenilcumarina) es estable en las condiciones de trabajo en el intervalo de tiempo de 24 h a temperatura ambiente y durante 5 h a 37° C; ya que el coeficiente de variación global es menor al 2%.

4.3.2 LINEALIDAD

Tabla 7. Resultados obtenidos para determinar la linealidad del método con datos de áreas de AG-4-fenilcumarina (mAU*s)

CONCENTRACION (µg/mL)	AG-4-FC ÁREAS (mAU*s)		
	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3
2.5	21.49817	25.11489	23.43969
10	86.26311	83.66632	84.3081
25	209.68854	206.35306	209.39821
40	328.7883	327.58102	322.91541
50	411.03113	408.03702	408.22388
INTERCEPTO (b)	3.2365	4.0655	4.1533
PENDIENTE (m)	8.1654	8.0818	8.059
CORRELACION (r)	0.9999	1	0.9997
% ERR	1.049940		

La tabla anterior demuestra que el método analítico es lineal en el intervalo de 2.5 a 50 µg/mL, ya que el coeficiente de correlación de cada curva es mayor al 0.99 y el error relativo debido a la regresión es menor al 3.0%.

4.3.3 EXACTITUD

Tabla 8. Resultados obtenidos para determinar la exactitud del método con datos de áreas de AG-4-fenilcumarina (mAU*s)

CONCENTRACION NOMINAL (µg/mL)	CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL (µg/mL)			
	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	
2.5	2.1821	2.6285	2.4218	
10	10.1758	9.8553	9.9345	
25	25.4097	24.9980	25.3738	
40	40.1096	39.9606	39.3848	
50	50.2605	49.8910	49.9140	
CONCENTRACION (µg/mL)	% DEA			PROMEDIO
	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	
2.5	12.7147	5.1412	3.1293	7.00
10	1.7579	1.4472	0.6551	1.29
25	1.6386	0.0081	1.4953	1.05
40	0.2741	0.0984	1.5381	0.64
50	0.5210	0.2181	0.1719	0.30

Con respecto a la exactitud podemos considerar que el método es exacto en el intervalo de 10 a 50 µg/mL por presentar una desviación estándar absoluta mayor al 3%.

4.3.4 PRECISIÓN (REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD)

REPETIBILIDAD

Tabla 9. Resultados obtenidos para determinar la repetibilidad del método con datos con datos de áreas de AG-4-fenilcumarina (mAU*s)

CONCENTRACION (µg/mL)	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	PROMEDIO	DE	% CV
2.5	21.49817	25.11489	23.43969	23.3509	1.8100	7.75
10	86.26311	83.66632	84.3081	84.7458	1.3526	1.60
25	209.68854	206.35306	209.39821	208.4800	1.8476	0.89
40	328.7883	327.58102	322.91541	326.4282	3.1015	0.95
50	411.03113	408.03702	408.22388	409.0973	1.6773	0.41

En base a los resultados obtenidos se considera que el método es repetible en el intervalo de concentraciones de 10 a 50 µg/mL.

REPRODUCIBILIDAD

Tabla 10. Resultados obtenidos para determinar la reproducibilidad del método con datos de áreas de AG-4-fenilcumarina (mAU*s)

CONC. (µg/mL)	DIA 1			DIA 2			PROMEDIO	DE	%CV
	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3			
2.5	23.10908	22.83004	22.46636	21.49817	25.11489	23.43969	23.0764	1.2010	5.20
10	85.05016	88.70728	84.57635	86.26311	83.66632	84.3081	85.4285	1.8263	2.14
25	203.32947	202.95692	192.81839	209.68854	206.35306	209.39821	204.0908	6.2218	3.05
40	327.69531	327.83554	323.87613	328.7883	327.58102	322.91541	326.4486	2.4222	0.74
50	401.69452	398.65796	410.58029	411.03113	408.03702	408.22388	406.3708	5.0399	1.24

En cuanto a la reproducibilidad, se puede considerar que el método es repetible en el intervalo de concentraciones de 10 a 50 µg/mL.

4.3.5 PRUEBA DE INFLUENCIA DEL FILTRO

Tabla 11. Resultados obtenidos para determinar la influencia del filtro

TRATAMIENTO	ÁREAS (mAU*s)					
	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MUESTRA 3	MUESTRA 4	MUESTRA 5	MUESTRA 6
SIN FILTRAR	206.71362					
TEFLON (10 µm)	195.17020	197.24318	197.35062	200.97191	194.97820	198.87364
SWINEX (0.45 µm)	205.78215	202.39915	200.86079	200.17232	196.97603	198.90106

Cálculos para obtener el porcentaje retenido por cada filtro:

Área de solución sin filtrar (mAU*s) → 100%

Área de la solución filtrada (mAU*s) → **x**

% Retenido por el filtro = 100 – **x**

Por ejemplo (Filtro de prueba: Teflón, muestra 1):

206.71362 mAU*s → 100%

195.17020 mAU*s → **x** **x** = 94.4157%

% Retenido por el filtro = 100 – 94.4157 = 5.5842 %

Tabla 12. Promedio del porcentaje retenido por los filtros probados

% Retenido Promedio (n=6)	
TEFLON (10 µm)	4.49
SWINEX (0.45µm)	2.84

En la tabla anterior muestra que el porcentaje de fármaco retenido por el filtro swinex supera, en pequeña proporción, el límite especificado que corresponde al 2%; sin embargo éste es menor al porcentaje de fármaco retenido por el filtro de teflón. Por lo tanto se elige el filtro swinex como el filtro de trabajo en la etapa de desarrollo del perfil de disolución.

4.4 EVALUACIÓN DEL PERFIL DE DISOLUCIÓN

Tabla 13. Resultados obtenidos durante el desarrollo del perfil de disolución.

Tiempo (min)	PROMEDIO % DISUELTO (n=12)	D.E.	%C.V.
10	27.81538	4.84	17.39
15	60.79355	7.73	12.71
20	82.25017	3.17	3.85
30	86.93392	0.77	0.88
45	87.54687	0.77	0.88
60	87.34571	0.84	0.97

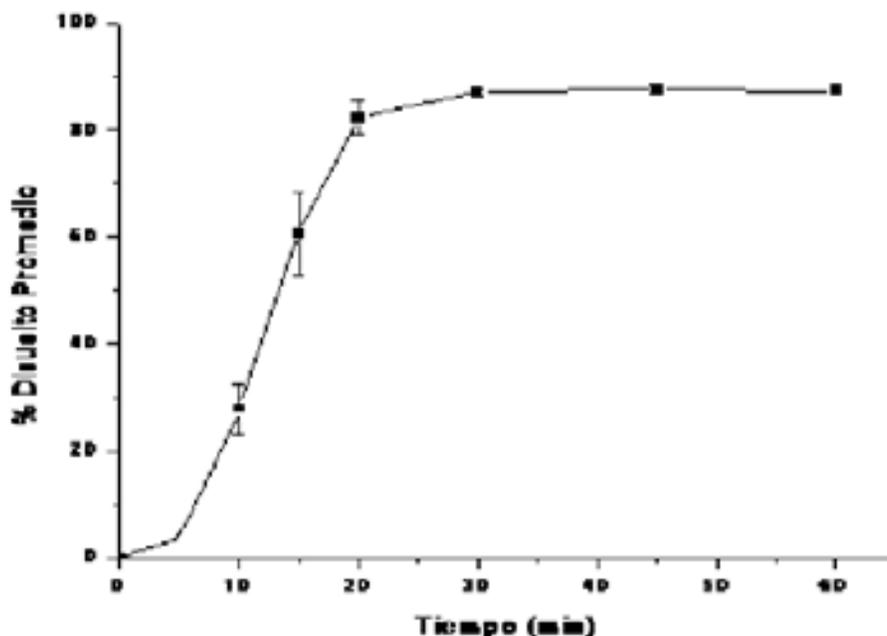


Gráfico 3. Perfil de disolución de AG-4-fenilcumarina a pH 4.5

La **Tabla 13** presenta la desviación estándar y el coeficiente de variación del porcentaje de AG-4-fenilcumarina disuelto a cada tiempo de muestreo. En el primer tiempo de muestreo, 10 minutos, el coeficiente de variación fue menor al 20%, a excepción del segundo tiempo de muestreo, los subsecuentes tiempos de muestreo presentaron coeficientes de variación menores al 10%.

Del **Gráfico 3** es posible deducir que para las cápsulas en estudio el promedio de porcentaje disuelto es del 86.9% a los 30 minutos a pH 4.5. La Guía para Industria “Exención de los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia in vivo para formas posológicas orales solidas de liberación inmediata en base a su sistema de clasificación biofarmacéutica”, publicada por la FDA, considera que un producto es de rápida disolución cuando no menos del 85% de la cantidad total de principio activo se disuelve en los primeros 30 minutos a 3 diferentes pHs que vayan de 1.2 a 6.8; por lo que se propone llevar a cabo este mismo estudio en dos pHs diferentes para poder llevar a cabo la clasificación de este compuesto en base a dicho sistema.

CONCLUSIONES

Con el fin de obtener más información acerca del compuesto 5-O-[β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina, considerado como un posible fármaco con actividad hipoglucemiante que sea el principal principio activo de medicamentos de origen herbolario en el futuro, se realizó el estudio del perfil de disolución a pH 4.5 de cápsulas que contienen dicho compuesto, obteniéndose lo siguiente:

- Se desarrolló un método analítico para cuantificar mediante cromatografía líquida de alta resolución, el compuesto 5-O-[β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina presente en cápsulas de gelatina dura. Dicho método se validó en el rango de 2.5 a 50 μ g/mL.
- Se desarrolló el perfil de disolución de dichas cápsulas a pH 4.5; del cual se puede deducir que a los 30 minutos se disuelve más del 85% del principio activo. En las condiciones analizadas, el mayor porcentaje de disolución del fármaco corresponde al 87%.
- **PROPUESTA:** Se propone realizar el estudio de los perfiles de disolución a los pHs 1.2 y 6.8 para poder clasificar al compuesto en base al Sistema de Clasificación Biofarmacéutica.

BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. **Guía de Validación de Métodos Analíticos**. México; 2002.
- ✓ Déciga Campos, Myrna, et al; **Antinociceptive activity of 3-O- β -D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F from *Hintonia standleyana* (Rubiaceae)**. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2006.
- ✓ Díaz Huerta, Mitzi Rocío. **Validación de métodos analíticos por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) para cuantificar Xantocilina en *Matricaria recutita* y establecer los perfiles de disolución de cápsulas duras de un extracto acuoso de *Hintonia standleyana***. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México; 2007.
- ✓ Fung Ho, Win, et al; **Training Guide. High Performance Liquid Chromatography**. Valid Analytical Measurement; 2000.
- ✓ Ganong William, F. **Fisiología Medica**. Editorial El Manual Moderno. 14a ed. México, D.F.; 1996.
- ✓ Genaro A., **Remington Farmacia**. Editorial Medica Panamericana. 19a ed. Buenos Aires, Argentina; 1995.
- ✓ Guerrero Analco, José A., et al; **Antihyperglycemic Effect of Constituents from *Hintonia standleyana* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats**. Planta Med, 2005.
- ✓ Guerrero Analco, José A., et al; **Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae family**. Phytochemistry, 2007.

- ✓ Guerrero Analco, José A. **Compuestos antihiperlipémicos y antinociceptivos de la especie *Hintonia stadleyana* Bullock (Rubiaceae). Una contribución a la determinación de los parámetros de inocuidad, calidad y eficacia de la droga cruda.** Tesis de Doctorado, Facultad de Química, UNAM, México; 2007.
- ✓ **Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation.** FDA, 2000, (<http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/2396dft.htm>).
- ✓ **Guidance for Industry. Botanical Drug Products.** FDA, 2004, (www.fda.gov/cder/guidance/4592fnl.htm).
- ✓ **Guidance for Industry. Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms.** FDA, 1997, (<http://www.fda.gov/cder/Guidance/1713bp1.pdf>)
- ✓ **Guidance for Industry. Text on Validation of Analytical Procedures. ICH-Q2A.** FDA, 1995, (<http://www.fda.gov/cder/Guidance/ichq2a.pdf>).
- ✓ **Manual de Biofarmacia.** UNAM, Facultad de Química, México; 2002.
- ✓ **National Diabetes Information Clearinghouse** (<http://diabetes.niddk.nih.gov>)
- ✓ **NOM-177-SSA1-1998.** Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. Secretaría de Salud.
- ✓ Pellati, Federica, et al; **Development and validation of HPLC methods for the analysis of phenethylamine and indoloquinazoline alkaloids in *Evodia* species.** Journal of separation science, 2006.

- ✓ Sánchez Ruíz, Juan Francisco, et al; **Validación de Métodos Analíticos**. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, México; 2006.
- ✓ Secretaría de Salud. **Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos**. 8a edición, México; 2004.
- ✓ Secretaría de Salud. **Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos**. 1a edición, México; 2001.
- ✓ Shargel L., et al; **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. Mc Graw Hill. 5a ed. New York, USA; 2005.
- ✓ **United States Pharmacopeia USP 30 – NF 25**. USA; 2006.
- ✓ Villalobos Sánchez, Nohemí. **Estudio comparativo de perfiles de disolución en tabletas de maleato de enapril a diferentes pH's**. Tesis de Licenciatura, UNAM, Facultad de Química, México; 2007.
- ✓ Yost, R. W., et al; **Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica**. Perkin-Elmer. 1980.