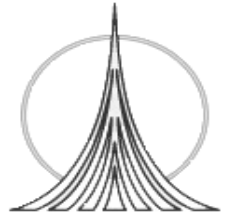




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

TESIS

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE TACROLIMUS, CÁPSULAS DE 5 mg, POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN APLICADO A PERFILES DE DISOLUCIÓN.

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACEUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

NALLELY LUCERO LOZADA ROJAS

DIRECTOR DE TESIS

DRA. LETICIA CRUZ ANTONIO

ASESOR DE TESIS

DR. GILBERTO CASTAÑEDA HERNÁNDEZ

MARZO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	2
A. ASPECTOS GENERALES DE DISOLUCIÓN	
1. Conceptos teóricos para la liberación de un fármaco a partir de los preparados sólidos	4
2. Correlación entre desintegración y disolución	7
3. Factores que determinan la velocidad de disolución	7
a. Relacionados con las propiedades fisicoquímicas	7
b. Relacionados con la formulación y método de manufactura	7
c. Relacionados con la técnica de disolución	8
B. MÉTODOS ANALÍTICOS	8
1. Importancia de los métodos analíticos	8
C. PERFIL DE DISOLUCIÓN	9
1. Requisitos para realizar un perfil de disolución	9
2. Validación del método analítico para perfil de disolución	10
a. Parámetros de validación del sistema	11
1) Linealidad	11
2) Precisión	11
b. Parámetros de validación del método	11
1) Linealidad	11
2) Exactitud	11
3) Precisión	12
a) Repetibilidad	12
b) Reproducibilidad	12
4) Selectividad	12
5) Estabilidad de la muestra	12
3. Comparación de perfiles de disolución	13
a. Modelos independientes	13
1) Índice f_1	13
2) Índice f_2	13
3) Eficiencia de disolución	15
4) Tiempo Medio de Disolución	16
b. Modelos dependientes	16
1) Con base fisicoquímica	16
a) Cinética de Orden Cero	16
b) Cinética de Primer Orden	17
D. MONOGRAFÍA DEL FÁRMACO EN ESTUDIO	18
1. Fórmula desarrollada	18
2. Fórmula condensada	18
3. Peso molecular	18
4. Propiedades fisicoquímicas	18
5. Propiedades farmacológicas	18
a. Propiedades farmacodinámicas	18
b. Indicaciones terapéuticas	19
c. Propiedades farmacocinéticas	19

1) Absorción	19
2) Distribución	20
3) Metabolismo	20
4) Excreción	20
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
IV. OBJETIVO	21
V. HIPÓTESIS	21
VI. METODOLOGÍA	22
A. MATERIALES Y EQUIPO	22
1. Equipo e instrumentos	22
2. Reactivos	22
3. Sustancia de referencia	22
4. Productos farmacéuticos	22
B. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	23
C. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	23
D. PRUEBAS DE CONTROL DE CALIDAD	24
1. Friabilidad	24
2. Desintegración	24
3. Valoración por comparación con un estándar	25
4. Uniformidad de contenido	26
E. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA PERFIL DE DISOLUCIÓN	27
1. Parámetros de validación del sistema	27
a. Linealidad	27
b. Precisión	27
c. Estabilidad de la muestra	28
d. Influencia del filtro	28
2. Parámetros de validación del método	29
a. Linealidad	29
b. Exactitud	29
c. Precisión	29
1) Repetibilidad	29
2) Reproducibilidad	30
d. Selectividad	30
F. APLICACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	30
1. Perfiles de disolución	30
a. Procedimiento	30
b. Cálculos	31
c. Selección de tiempos de muestreo	31
VII. DIAGRAMA DE FLUJO	32
VIII. RESULTADOS	35
A. PRUEBAS DE CONTROL DE CALIDAD	35
1. Friabilidad y tiempo de desintegración	35
2. Valoración y Uniformidad de contenido	36
B. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA PERFIL DE DISOLUCIÓN	38
1. Parámetros de validación del sistema	38
a. Linealidad	38
b. Precisión	39

c. Estabilidad de la muestra	40
d. Influencia del filtro	41
3. Parámetros de validación del método	41
a. Selectividad	41
b. Linealidad	45
c. Exactitud	46
d. Precisión	47
1) Repetibilidad	47
2) Reproducibilidad	48
C. PERFILES DE DISOLUCIÓN	49
1. Selección de tiempos de muestreo	49
2. Perfiles de disolución	50
3. Comparación de perfiles de disolución	55
a. Modelos Independientes	55
1) Tiempo Medio de Disolución	55
2) Eficiencia de Disolución	56
b. Modelos Dependientes	57
IX. ANÁLISIS DE RESULTADOS	59
X. CONCLUSIONES	63
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
XII. ANEXO	67

I. INTRODUCCIÓN

La biodisponibilidad depende de una serie de factores que pueden resumirse en dos puntos principales: factores de orden fisiológico y factores de orden tecnológico o de la formulación. Más importante que los factores fisiológicos, por ser previsibles y rectificables, son los factores de orden tecnológico y de la formulación, los cuales pueden afectar profundamente la disponibilidad biológica de los fármacos en una forma farmacéutica. Entre ellos, los coadyuvantes o excipientes que se agregan con distintos propósitos (diluentes, desintegrantes, aglutinantes o lubricantes, todos con diferentes características) contribuyen a retardar en mayor o menor grado la liberación del fármaco desde una forma farmacéutica según la naturaleza y cantidad con que se empleen en la formulación, de igual forma que los factores tecnológicos propiamente dichos, como los métodos de granulación, el tamaño de granulado, la fuerza de compresión, etc. Este conjunto de factores por tanto ejercen una enorme influencia en la velocidad de disolución de los fármacos en los fluidos del tracto gastrointestinal. Por este motivo, debido a la relación directa que existe entre la biodisponibilidad y la velocidad de disolución, correlación que ha sido ampliamente demostrada, se establece que la forma farmacéutica que cede rápidamente su fármaco al medio de disolución tendrá mayores posibilidades de absorberse en mejores condiciones que aquella que la cede en forma lenta o incompleta. Ello explica porqué en varios reglamentos oficiales ya se ha incluido el ensayo de disolución para evaluar la biodisponibilidad *in vitro*, como un método de control de calidad que permite predecir el comportamiento del fármaco en la forma farmacéutica después de su administración.

Considerando todo lo anterior este trabajo presenta un método analítico sensible y confiable para cuantificar Tacrolimus en cápsulas de gelatina dura por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detección UV en un estudio de disolución *in vitro*.

II. MARCO TEÓRICO

A. ASPECTOS GENERALES DE DISOLUCIÓN

La disolución es el proceso por medio del cual una sustancia se dispersa en otra, a nivel molecular y el proceso está determinado por la afinidad entre ambas especies.¹

Desde un punto de vista macroscópico, la disolución de un sólido corresponde a la desintegración de la estructura cristalina bajo la acción del disolvente que lo rodea. Así, las partículas liberadas se distribuyen en la fase del disolvente mediante el proceso de difusión que tiene lugar a partir de la superficie del sólido. La disolución también, puede ser considerada el proceso inverso a la cristalización; es decir, es el proceso por el cual un compuesto químico o fármaco sólido llega a estar disuelto en un disolvente, formando una solución homogénea.²

La disolución es un método común de caracterización empleado en la industria farmacéutica para diseñar formulaciones y asegurar la calidad del producto. Es una prueba de desarrollo requerida por muchas autoridades regulatorias para formas farmacéuticas sólidas, parches transdérmicos y suspensiones orales. La prueba de disolución es el único método de análisis de rutina del producto terminado que mide el efecto de la formulación y las propiedades físicas del fármaco sobre la velocidad de solubilización *in vivo*. Como resultado, la prueba de disolución, es la única prueba que monitorea el impacto de las condiciones de almacenamiento y proceso de manufactura sobre la velocidad de liberación del fármaco de su forma farmacéutica. Estas sensibilidades han permitido el uso de la disolución como una medida del biodesarrollo de una formulación.

La prueba de disolución ha emergido como una prueba *in vitro* de gran valor para caracterizar el desempeño de un producto farmacéutico. Es una herramienta importante en el desarrollo de fármacos y de control de calidad. En el desarrollo de fármacos se usa como guía de desarrollo de formulación para seleccionar una formulación apropiada para análisis *in vivo*. La prueba de disolución es usada como un control de calidad lote a lote antes de que el producto sea liberado al mercado. Para formas farmacéuticas sólidas, la prueba de disolución se usa de base para generar especificaciones (metodología de la prueba, criterios de aceptación, etc.). La disolución también se emplea para identificar problemas de biodisponibilidad y para evaluar la necesidad de estudios de bioequivalencia relativos a la Guía SUPAC (Scale Up and Post Approval

Change)¹⁰ donde la disolución puede funcionar como una señal de bioequivalencia. En el presente, la mayoría de las formas sólidas orales requieren como prueba de control de calidad a la disolución antes de que el producto sea liberado al mercado. Para que la prueba sea útil debe ser simple, confiable, reproducible y debe ser capaz de discriminar entre diferentes grados de desempeño del producto. El valor de la prueba es significativamente relevante cuando el desempeño del producto es evaluado en función del tiempo, por ejemplo, un perfil de disolución en lugar de una determinación con un solo punto. Por la importancia de la disolución, la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América (FDA, por sus siglas en inglés), ha desarrollado guías relacionadas a la disolución que proveen información y recomendaciones sobre el desarrollo de la metodología de disolución, elección de especificaciones de disolución y aplicaciones regulatorias de la prueba de disolución.^{3,4}

Durante los últimos años, el aumento en el conocimiento científico de los principios y mecanismos de la disolución ha marcado una nueva era. La disolución es usada como un marcador sustituto para la prueba de bioequivalencia, como evidencia de la Guía de Clasificación Biofarmacéutica.⁵

La Clasificación Biofarmacéutica toma en cuenta tres factores: disolución, solubilidad y permeabilidad intestinal, que gobiernan la velocidad y extensión de la absorción del fármaco de la forma farmacéutica de liberación inmediata. La Clasificación Biofarmacéutica provee una estructura científica para la clasificación de sustancias basada en la solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal, que en combinación con los datos de disolución proporcionan una razón fundamental para las excepciones biológicas de productos farmacéuticos de liberación inmediata. En adición, la Guía General de Biodisponibilidad y Bioequivalencia permiten las excepciones biológicas para productos farmacéuticos de liberación modificada basados en la proporcionalidad de la formulación y comparación de perfiles de disolución. Estos cambios en los requerimientos de Bioequivalencia, se mueven desde requerimientos de estudios *in vivo* y dependen más de una prueba de disolución, que claramente establecen un cambio en la aplicación de la disolución.⁶

Generalmente se manejan dos términos relacionados con la disolución de un sólido en un líquido. Uno de ellos es la disolución intrínseca y se refiere a las características de disolución de un fármaco puro, en condiciones de superficie constante. El segundo término es el de disolución

aparente, el cual se aplica al proceso de disolución de fármacos contenidos en un medicamento, sin considerar una superficie constante de sólido.⁷

1. Conceptos teóricos para la liberación de un fármaco a partir de los preparados sólidos

Al administrar un fármaco por vía oral en forma sólida, tal como una tableta, frecuentemente se encuentra que la velocidad de absorción está controlada a su vez por la velocidad con la que el fármaco se disuelve en los fluidos del sitio de absorción. Si la velocidad de disolución es lenta o incompleta, el nivel sanguíneo alcanzado con este fármaco resultará bajo e insuficiente para lograr un efecto terapéutico adecuado.

El objetivo de un medicamento es originar una respuesta terapéutica en el organismo y esto es el resultado de una serie de fenómenos o etapas consecutivas, las cuales están en función tanto del fármaco por sí mismo, como del individuo al que se administra. Por lo que un medicamento debe ser seguro, eficaz y con una biodisponibilidad adecuada u óptima.

Se define como biodisponibilidad a la proporción del fármaco que se absorbe a la circulación general después de la administración de un medicamento y el tiempo que requiere para hacerlo.⁸

Para determinar la velocidad de disolución de fármacos sólidos en condiciones estandarizadas, deben considerarse diversos procesos fisicoquímicos tales como la humidificación de los preparados sólidos, la capacidad de penetración del medio de disolución en los preparados, el proceso de hinchamiento, la desintegración y la desagregación. Wagner propuso el esquema presentado en la figura 1 para los procesos involucrados en la disolución de preparados sólidos.¹

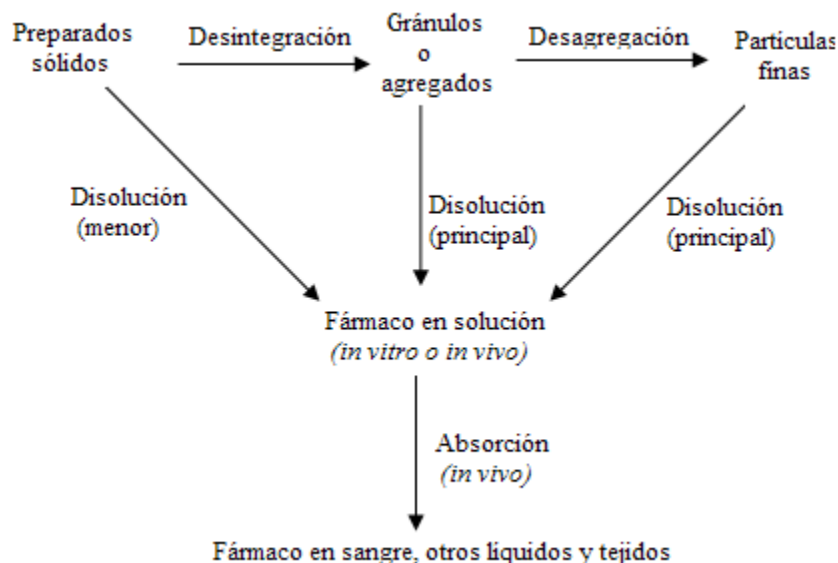


Figura 1. Diagrama esquemático de Wagner que ilustra los procesos en la disolución de preparados sólidos.

Más tarde, este esquema fue modificado por Cartensen, quien explicó que la humidificación 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 (tensión interfásica) y el ángulo de contacto, entre la superficie del sólido y el líquido. En general, un ángulo de contacto de más de 90 grados indica una pobre capacidad de humectación. La incorporación de una sustancia tensoactiva, en el preparado o en el medio de disolución, reduce el ángulo de contacto e incrementa la disolución. 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 una barrera en la interfase. En el caso de las cápsulas, la capa de gelatina es extremadamente hidrosoluble y por lo tanto no existen problemas en cuanto a la capacidad de humectación del preparado (si bien pueden existir en cuanto 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 desagregación. Los lubricantes hidrofóbicos, como el talco y el estearato de magnesio, muy a menudo empleados en la preparación de comprimidos y cápsulas, enlentecen la velocidad de penetración y, por lo tanto, el proceso de desagregación. El gran tamaño de los poros facilita la penetración pero si es

demasiado grande puede inhibir la penetración por disminución de la tensión interna causada por el hinchamiento del desintegrante.

Cuando la desintegración y la desagregación se producen, las partículas de fármaco quedan expuestas en el medio de disolución y la disolución tiene lugar, la figura 2 representa gráficamente el modelo propuesto por Cartensen, en donde la velocidad de disolución de un fármaco puede llegar a ser la etapa limitante antes de que éste aparezca en sangre. De cualquier forma, cuando la forma farmacéutica se encuentra en el tracto gastrointestinal en forma sólida hay dos posibilidades de limitar la velocidad de disolución.¹

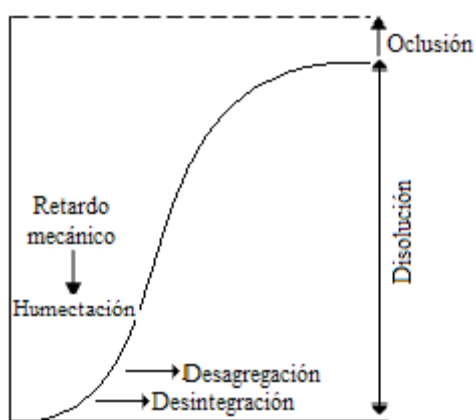


Figura 2. Curva de disolución con forma de S de preparados sólidos

La forma farmacéutica debe disolverse primero, para que después el fármaco se encuentre en solución y pueda atravesar la membrana gastrointestinal. Los fármacos fácilmente solubles en agua tenderán a disolverse haciendo que la difusión pasiva y/o el transporte activo del fármaco sea el paso limitante para la absorción a través de la membrana gastrointestinal. Por el contrario, la velocidad de absorción de fármacos poco solubles estará limitada por la velocidad de disolución de fármacos sin disolver o la desintegración de la forma farmacéutica.⁷

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 su 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.⁹

2. Correlación entre desintegración y disolución

En general, la desintegración ha resultado ser un mal indicador de la biodisponibilidad debido a la turbulenta agitación mantenida durante la prueba. Se ha hallado que otros varios factores como la solubilidad, el tamaño de la partícula y la estructura cristalina, entre otros, afectan la disolución de la sustancia pero no tienen importancia en cuanto a la desintegración.¹

3. Factores que determinan la velocidad de disolución

a. Relacionados con las propiedades fisicoquímicas del fármaco

Estos incluyen: solubilidad, el tamaño de partícula, estado cristalino (polimorfismo), estado de hidratación, solvatación, formación de complejos, pKa, naturaleza química (ácido, base, sal, anhidro, hidrato), otras propiedades físicas como la densidad, viscosidad y la capacidad de humectación contribuyen a los problemas generales de disolución de floculación, flotación y aglomeración. También se ha hallado que las características de adsorción de los fármacos tienen un efecto significativo sobre la disolución de ciertos fármacos.^{1,7}

b. Relacionados con la formulación y método de manufactura

Se ha demostrado que la velocidad de disolución de fármacos puros se puede ver modificada significativamente cuando son mezclados con varios excipientes durante el proceso de manufactura del producto. Estos excipientes son adicionados para satisfacer ciertas funciones farmacéuticas y puede incluir, diluentes, desintegrantes, colorantes, agentes de granulación, lubricantes. En ciertos casos, diversos estudios demostraron que las malas formulaciones de comprimidos y cápsulas causan una marcada reducción de la biodisponibilidad y un deterioro de la respuesta clínica.

Los numerosos factores de procesamiento involucrados en la elaboración de los comprimidos influyen enormemente sobre las velocidades de disolución de los ingredientes activos. El método de granulación, el tamaño, la densidad, el contenido de humedad y la edad de los gránulos, así como la fuerza de compresión utilizada en el proceso de formación de los comprimidos contribuyen a las características de velocidad de disolución del producto final.^{1,7}

c. Relacionados con la técnica de disolución

Estos incluyen aspectos tales como geometría del agitador y del recipiente para disolución, efecto de la velocidad de agitación, gases disueltos en el medio, volumen, temperatura, pH, viscosidad del medio, excentricidad del equipo, vibración externa.⁷

B. MÉTODOS ANALÍTICOS

1. Importancia de los métodos analíticos

Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico en una muestra.

Como en muchas de las actividades de la industria farmacéutica se hace uso del método científico para cumplir este atributo, es necesario llevar a cabo en la mayoría de las ocasiones estudios experimentales que permitan demostrar la confiabilidad de lo que se está midiendo, un proceso que permite cumplir este fin es la validación. La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.

Es conocido que las técnicas y métodos analíticos están en cambio y mejoramiento constante; y en muchos casos en la tecnología de vanguardia. Es importante enfatizar que cada técnica analítica tiene sus propias características que varían de fármaco a fármaco. Además, el diseño de la técnica puede ser también influenciado por el objetivo final del estudio. Se necesitan criterios específicos de validación para métodos enfocados a cada sustancia de interés (fármaco y/o metabolito). Mientras la validación de cada método mantenga su propio rumbo, puede haber situaciones donde la comparación de los métodos será necesaria, por ejemplo, cuando más de un método ha sido empleado en un largo periodo. Cuando las muestras son conducidas a más de un sitio, es necesario validar el o los métodos analíticos en cada lugar y proveer información apropiada de validación para establecer la fiabilidad inter – laboratorio. A menos que el método sea usado de manera regular que provea confianza en su validez continua, es esencial documentar que el método sigue siendo válido previo al análisis de muestras en el estudio. Una validación adecuada para el propósito anterior frecuentemente consiste en correr una curva estándar con

nuevas muestras de estándar para mostrar que la respuesta, vínculo y características generales del método son similares a los resultados de validación previa.⁹

La validación del método incluye todos los procedimientos requeridos para demostrar que un método particular aplicado a la determinación cuantitativa de la concentración de una sustancia de interés (o series de sustancias) en una matriz es confiable para la aplicación destinada. Aunque son varias etapas en el desarrollo y validación de un procedimiento analítico, la validación de un método analítico puede concebirse como una consistencia de dos etapas: (1) la del desarrollo del método analítico en el cual se define el ensayo; y (2) la aplicación del análisis actual a muestras de estudios de disolución, farmacocinética, biodisponibilidad y bioequivalencia.¹⁰

C. PERFIL DE DISOLUCIÓN

Un perfil de disolución considera diversos tiempos de muestro, lo que permite establecer la velocidad de disolución. Un gran número de estudios reportados en la literatura, han demostrado que si una prueba comparativa de los perfiles de disolución entre el medicamento de referencia y el de prueba, se diseña y se lleva a cabo de acuerdo con un procedimiento establecido, equivalentes farmacéuticos que muestran comportamiento semejante en relación con sus características de velocidad de disolución probablemente tendrán también una biodisponibilidad comparable.⁹

1. Requisitos para realizar un perfil de disolución

En la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, se describen los requisitos para realizar la prueba de perfil de disolución de formas farmacéuticas sólidas de liberación inmediata, utilizando como modelo estadístico el factor de similitud f_2 . Los requisitos para llevar a cabo este tipo de prueba son los siguientes:

- a. Utilizar como medicamento de referencia el indicado por la Secretaria de Salud a través del área competente, el cual debe estar comercialmente disponible y vigente.
- b. Los medicamentos de prueba y referencia deben tener al menos un año de vigencia antes de su fecha de caducidad al momento de realizar el estudio.

- c. El perfil de disolución del medicamento de prueba se debe realizar con un lote estándar de producción o bien con un lote escalado, que asegure que no se modifica significativamente la reproducibilidad de los perfiles de disolución, cuando lotes subsecuentes del medicamento sean fabricados nuevamente.
- d. Las pruebas deben llevarse a cabo con los mismos lotes del producto de prueba y el de referencia.
- e. Utilizar sustancias de referencia trazables.
- f. Los instrumentos de medición deben estar calibrados.
- g. Los medicamentos de referencia y de prueba deben cumplir con las pruebas de valoración y de uniformidad de contenido descritos en los métodos generales de análisis de la FEUM, en farmacopeas reconocidas internacionalmente o métodos validados.
- h. El porcentaje de valoración del medicamento de prueba no debe diferir en más del 5.0 % del medicamento de referencia.
- i. Realizar los perfiles de disolución con 12 unidades, tanto del medicamento de prueba como del de referencia, en las mismas condiciones experimentales.
- j. Seleccionar por lo menos 5 tiempos de muestreo y utilizar una curva de calibración para calcular por interpolación la concentración del fármaco disuelto.
- k. Validar el método analítico para los medicamentos de prueba y de referencia.
- l. Si se tienen disponibles los placebos realizar la validación mediante el porcentaje de recuperación; si no es posible obtener los placebos realizar la validación mediante el método de estándar adicionado.⁸

2. Validación del método analítico para perfil de disolución⁸

La validación del método es imprescindible en este tipo de análisis ya que nos proporciona la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado. Para tal efecto el analista debe considerar el ensayo de disolución en su totalidad. Ninguna variable se debe considerar menos importante y todas deben formar parte del protocolo analítico.

Como se mencionó anteriormente, la NOM-177-SSA1-1998, establece validar el método analítico en ausencia de los placebos de los medicamentos, es decir, realizar la validación mediante el método de estándar adicionado. Esta técnica es de las más importantes para la

detección y corrección de desviación en el método analítico. El objetivo del método de estándar adicionado es evaluar el sesgo de cuantificación (error) en un método analítico, cuando se desconocen los compuestos de la matriz (excipientes de la muestra). Esta técnica es útil para la detección y corrección del error constante y el error proporcional. Su magnitud puede ser determinada cuantitativamente y realizar la corrección correspondiente. Los parámetros que se deben evaluar para este tipo de validación son los siguientes:

a. Parámetros de validación del sistema

1) Linealidad

Es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra. Se debe demostrar una linealidad del sistema con al menos cinco puntos (excepto el cero) por duplicado, con un coeficiente de regresión mayor o igual que 0.99 y un coeficiente de variación debido a la regresión no mayor que el 2%.

2) Precisión.

Se denomina precisión al grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto. De los datos de linealidad se debe demostrar que el coeficiente de variación del factor de respuesta no debe ser mayor que el 2%.

b. Parámetros de validación del método, para los medicamentos de prueba y referencia:

1) Linealidad.

El método debe demostrar una linealidad con al menos 5 puntos (que incluya los puntos extremos excepto el cero) por triplicado, con un coeficiente de regresión mayor o igual que 0.99 y un coeficiente de variación debido a la regresión no mayor que el 3%.

2) Exactitud

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

3) Precisión

Se denomina precisión al grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.

a) Repetibilidad

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

b) 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%.

4) Selectividad

Es la capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto por analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra. Se debe demostrar la selectividad del método para el fármaco ante otros componentes de la muestra, cualquier interferencia no debe producir un error mayor al aceptado en precisión y exactitud.

5) Estabilidad de la muestra

Es la propiedad del compuesto por analizar de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis. Determinar las condiciones de temperatura y tiempo entre otras, en las que el fármaco permanezca estable. La diferencia del por ciento recuperado no debe ser mayor que 2.0% con respecto a la cantidad inicial.

3. Comparación de perfiles de disolución¹²

El proceso de disolución se puede caracterizar mediante modelos independientes y dependientes.

a. Modelos independientes

Los parámetros puntuales empíricos son magnitudes que se calculan o se deducen de los datos experimentales, como el tiempo que tarde en disolverse un determinado porcentaje de la dosis ($t_{10\%}$, $t_{50\%}$, $t_{80\%}$, etc).

1) Índice f_1 (Moore y Flanner)

En 1996 Moore y Flanner propusieron un índice llamado factor de diferencia (f_1) el cual calcula la diferencia porcentual (%) entre las dos curvas en cada punto de muestreo y es una medida del error relativo entre las dos curvas. El factor f_1 es proporcional a la diferencia promedio entre los dos perfiles. Cuando f_1 toma valores entre 0 a 15 se considera que no hay diferencia entre los perfiles de disolución.

2) Índice f_2 (Moore y Flanner)

Este factor ha sido adoptado por el Centro para la Evaluación e Investigación de Fármacos (Center of Drug Evaluation and Research, FDA), y por la Unidad de Evaluación de Medicinas de la Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales (Human Medicines Evaluation Unit of The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA), así como un criterio para asegurar la similitud entre dos perfiles de disolución *in vitro* y es incluido en la Guía de Formas Farmacéuticas Sólidas Orales de Liberación Inmediata (Guidance on Immediate Release Solid Oral Dosage Forms; Scale – Up and Postapproval Changes; Chemistry, Manufacturing, and Controls; In Vitro Dissolution Testing; In Vivo Bioequivalence Documentation, CMC, 1995), comúnmente llamada SUPAC – IR y en la Nota para la Guía sobre la Calidad de Productos de Liberación Modificada (Note for Guidance on Quality of Modified Release Products: A. Oral Dosage Forms; B. Transdermal Dosage Forms; Section I. Quality, EMEA, 1999).¹²

Este método se basa en la utilización de los factores de ajuste propuestos por Jeffrey W. Moore y colaboradores en 1996¹³, los cuales comparan la diferencia en el porcentaje de fármaco disuelto por unidad de tiempo entre una formulación de referencia y una formulación de prueba. Este factor de ajuste es denotado por f_2 (factor de similitud) y puede ser definido por:

$$f_2 = 50 \log \frac{100}{\sqrt{1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - P_t)^2}}$$

Donde:

n = Número de tiempos de muestreo

R_t = Porcentaje disuelto promedio en el tiempo t del medicamento de referencia

P_t = Porcentaje disuelto promedio en el tiempo t del medicamento de prueba

El factor f_2 es una transformación logarítmica del recíproco de la raíz cuadrada de la suma del cuadrado del error y es una medida de la similitud en el porcentaje de disolución entre ambas curvas. El procedimiento específico para determinar el factor de similitud, f_2 , es el siguiente:

- Determinar el porcentaje disuelto a cada tiempo de muestreo en cada unidad de dosificación, así como los porcentajes disueltos promedio y los coeficientes de variación.
- Calcular el factor de similitud a partir de los valores medios de disolución de ambas curvas en cada intervalo de tiempo, usando para ello la ecuación 1.

Dos curvas pueden ser consideradas similares siempre que el valor de f_2 esté cercano a 100, en un intervalo entre 50 y 100.^{8, 13, 14, 15}

Este modelo independiente es aplicable para la comparación de perfiles siempre que se cumplan los siguientes requisitos:

- Los ensayos de disolución se deben haber realizado bajo idénticas condiciones, usando los mismos tiempos de muestreo para ambos productos.

- Se debe contar con 5 o más puntos de muestreo del perfil de disolución.
- El coeficiente de variación de los valores medios de disolución en el primer tiempo de muestreo no debe ser mayor o igual que el 20% y para el resto de los tiempos no debe exceder el 10%.

Si el coeficiente de variación del porcentaje disuelto es mayor que el 20% para el primer tiempo de muestreo y mayor que el 10% para los tiempos subsecuentes, se utiliza un modelo de análisis multivariado o modelo de series de tiempo

3) Eficiencia de disolución.¹⁶

La Eficiencia de Disolución (ED), se define como el porcentaje del área de un rectángulo descrito por el 100 % disuelto y el tiempo, de este modo, es posible comparar diferentes formulaciones a condición de que esta comparación sea realizada a los mismos tiempos. Por ejemplo, el índice ED (%)₃₀ indicaría que todas las comparaciones han sido efectuadas a los 30 minutos en una formulación y sólo pueden ser comparadas con el ED (%)₃₀ de otras formulaciones. El concepto de Eficiencia de la Disolución tiene ciertas ventajas, la primera es que la suma de los datos de liberación del principio activo permite una fácil comparación entre varias formulaciones. La segunda ventaja, y probablemente la más importante, es que puede ser relacionada con los datos *in vivo*. Si se supone que el grado de absorción de un fármaco *in vivo* es proporcional a la concentración del fármaco en la solución y el tiempo que esta solución está en contacto con la región del tracto gastrointestinal donde se produce la absorción, se puede ver que la ED se describe como una función de estas dos variables.

Se calcula a partir de las curvas acumulativas de fármaco disuelto, siendo necesario que se haya disuelto, como mínimo, el 90% de la dosis:

$$ED(\%) = \frac{\int_0^t y \times dt}{y_{100} \times t} \times 100\%$$

Donde y es el porcentaje de fármaco disuelto al tiempo t

4) Tiempo medio de disolución(TMD)¹²

El tiempo medio de disolución se calcula a partir de las curvas acumulativas de las cantidades disueltas de fármaco en función del tiempo mediante la ecuación:

$$\text{TMD} = \frac{\sum[t * \Delta Q]}{Q_{\infty}} * 100$$

b. Modelos dependientes¹²

1) Con base fisicoquímica

a) Cinética de orden cero

La denominación del modelo de orden cero surge de la base teórica desarrollada para el estudio cinético de reacciones químicas, en las que el término “orden” de reacción se refiere a la forma en que la concentración de una sustancia influye en la velocidad de una reacción química, de manera que se denomina “cinética de orden cero” aquella en la que la velocidad es independiente de la concentración.

En el medio biológico, la disolución de un sólido viene seguida de su absorción, por lo que la concentración de soluto se mantiene en valores pequeños, muy alejados de su solubilidad (sobre todo en fármacos de alta permeabilidad), en estos casos la velocidad de disolución es independiente de la concentración del fármaco disuelto y puede presentarse cuando la cantidad disuelta no exceda de un 10% de la solubilidad del producto en el disolvente. También es posible observar este tipo de cinética en productos que se disuelven muy lentamente y en los cuales, si bien el orden total corresponde a un proceso de primer orden, la parte inicial de la curva de disolución corresponde a una cinética de pseudo orden cero.

Si la velocidad es constante e independiente de la cantidad de soluto presente y se puede expresar por:

$$-\frac{dQ}{dt} = k$$

Donde:

Q= Cantidad de soluto

k = Constante de la velocidad (pendiente de la curva)

El signo – significa la disminución de la cantidad de soluto en la forma sólida.

La integración, que permite conocer el fenómeno desde el instante t_0 al instante t , nos da la expresión instantánea de la cantidad remanente de Q_t de soluto:

$$Q_t = Q_0 - kt$$

La vida media, o tiempo necesario para la liberación de la mitad de la cantidad de soluto presente, se expresa por:

$$t_{1/2} = \frac{Q_0}{2k}$$

b) Cinética de primer orden

En estos métodos, a medida que la cantidad de fármaco en la forma farmacéutica va disminuyendo, se incrementa la cantidad de principio activo en la solución, como consecuencia aumenta la concentración de la solución, las condiciones se tornan de primer orden, en la cual la velocidad de disolución esta en función de la concentración del fármaco disuelto. La velocidad es proporcional a la cantidad que permanece por disolver; la liberación del soluto disminuye con el tiempo de manera exponencial, lo que puede expresarse como:

$$-\frac{dQ}{dt} = kQ$$

Integrando y aplicando logaritmos decimales:

$$\log Q_t = \log Q_0 - \frac{kt}{2,303}$$

y en forma exponencial:

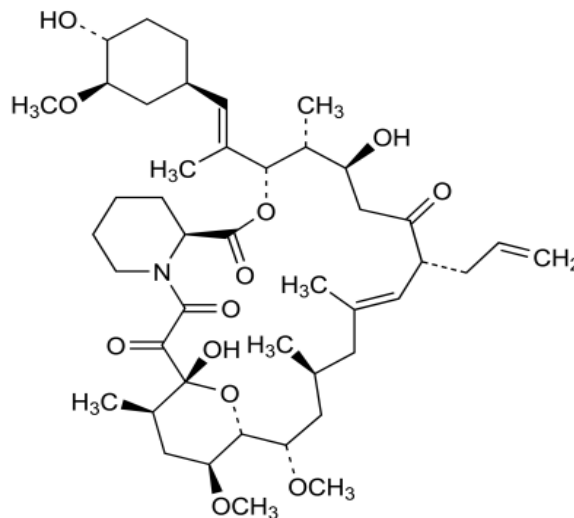
$$Q_t = Q_0 e^{-kt}$$

El tiempo de liberación del 80%, es:

$$t_{80\%} = \frac{\ln 100 - \ln(100-80)}{-kd}$$

D. MONOGRAFÍA DEL FÁRMACO EN ESTUDIO

1. Fórmula desarrollada
2. Fórmula condensada: $C_{44}H_{69}NO_{12}$
3. Peso molecular: 804.0 g/mol
4. Log P: 5.59



5. Propiedades fisicoquímicas

Polvo cristalino blanco con punto de fusión de 127° a 129° C. Prácticamente insoluble en agua, soluble en metanol, etanol, acetona, acetato de etilo, triclorometano y éter dietílico. Moderadamente soluble en hexano y éter de petróleo.^{17, 18}

6. Propiedades farmacológicas

El tacrolimus es un agente macrólido inmunosupresor obtenido por fermentación del *Streptomyces tsukubaensis*, encontrado en Japón¹⁹

a. Propiedades farmacodinámicas.

El tacrolimus induce una inmunosupresión al inhibir la primera fase de la activación de las células T. En esta primera fase, se activa la transcripción de ciertos factores como la interleucina (IL)-2, IL-3, IL-4, el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos y de interferón gamma, factores que permiten que las células T progresen desde la fase G0 a la G1. El tacrolimus se fija a una inmunofilina, la FKBP12, formando un complejo que inhibe la actividad de fosfatasa de la calcineurina. Como la calcineurina cataliza una reacción de desfosforilización crítica para la transcripción del gen de las linfocinas, la inhibición de la calcineurina resulta en el bloqueo de la

transducción de un factor nuclear necesario para la activación de las células B y T. La reducción de los niveles de los activadores de las células T, reduce la respuesta proliferativa de estas células T frente a antígenos y mitógenos.

En dermatitis atópica, el tacrolimus actúa inhibiendo la inflamación al reducir la actividad de las células T. El tacrolimus se une también a los receptores esteroides de la superficie de las células, inhibiendo la liberación de mediadores de los mastocitos, regulando el número de los receptores a IL-8, disminuyendo la adhesión intracelular y la expresión de la E-selectina en los vasos sanguíneos. Todas estas acciones resultan en una disminución del reconocimiento de los antígenos y en una regulación de la cascada inflamatoria. El tacrolimus tópico no inhibe la síntesis de colágeno y no produce una atrofia de la piel como ocurre en el caso de los corticoides.

b. Indicaciones terapéuticas.

El tacrolimus tiene propiedades inmunosupresoras similares a la ciclosporina, pero es mucho más potente en igual volumen. Al igual que esta tiene un amplio rango de interacciones. El tacrolimus ha sido estudiado en pacientes trasplantados de corazón, pulmón, hígado, riñón, páncreas, intestino delgado y médula ósea, siendo muy efectivo en la prevención del rechazo resistente a corticoides y ciclosporina.¹⁸⁻²¹ En este sentido, el tacrolimus es de 10 a 100 veces más potente de la ciclosporina.

c. Propiedades farmacocinéticas^{20, 21, 22}

1) Absorción

El tacrolimus se absorbe rápidamente, alcanzando el pico máximo en 0.5–1 hora, sin embargo algunos pacientes con trasplante hepático pueden tener el pico a las dos horas. En la absorción influye la baja solubilidad del medicamento y la motilidad gastrointestinal. La biodisponibilidad es pobre y muy variable, de 4–89% (=25%) y se ve reducida en presencia de alimentos, por esto se recomienda administrar en forma consistente ya sea en ayunas o con el mismo tipo de alimentos. Esta variabilidad se ha visto en diversas poblaciones de pacientes sin importar el tipo de órgano trasplantado

El tacrolimus es sustrato e inhibidor de la glicoproteína P, una bomba (ATP)-dependiente localizada en el epitelio intestinal y en la barrera hematoencefálica que es capaz de extraer el

fármaco de las células intestinales, llevándolo de nuevo al lumen donde es metabolizado por el citocromo P450 (CYC) 3A4, lo que limita su biodisponibilidad. Cuando el tacrolimus se administra con inhibidores del CYP3A4 y de la glicoproteína P (p.ej. diltiazem, eritromicina, o ketoconazol), la biodisponibilidad del inmunosupresor aumenta, incrementando sus concentraciones en la sangre.

2) Distribución

La unión de tacrolimus a proteínas plasmáticas es aproximadamente del 99% y es independiente de la concentración de un intervalo de 5-50 ng/ml. Tacrolimus se une principalmente a la albumina y a la glicoproteína α -1-ácida, y tiene un nivel alto de asociación con eritrocitos. La distribución de tacrolimus entre sangre total y plasma depende de varios factores, como hematocrito, la temperatura en el momento de la separación del plasma, concentración del fármaco y concentración de proteínas plasmáticas.

3) Metabolismo

El tacrolimus es ampliamente metabolizado por un sistema de oxidasa de función mixta, principalmente el sistema citocromo P-450 (CYP3A4). Se ha propuesto una ruta metabólica que conduce a la formación de 8 posibles metabolitos. Los principales mecanismos de biotransformación que fueron detectados *in vitro* son la desmetilación y la hidroxilación. El principal metabolito identificado en incubación con microsomas de hígado humano es el tacrolimus 13-desmetilado y se ha reportado en un estudio *in vitro* que el metabolito 31-desmetilado tiene la misma actividad que el tacrolimus.

4) Excreción

La vida media de eliminación del fármaco es de 12 horas, siendo la excreción biliar la principal ruta de eliminación, excretándose por la orina menos del 1% de la dosis administrada.

En los pacientes con disfunción hepática, las concentraciones sanguíneas y la vida media de eliminación están aumentadas mientras que la depuración renal está reducida. Los pacientes pediátricos presentan una depuración de tacrolimus más rápida que los adultos y, por tanto, requieren una dosis más elevada para alcanzar niveles sanguíneos terapéuticos.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

No hay monografía oficial de Tacrolimus aplicado a la cuantificación del activo en prueba o perfiles de disolución. Sin embargo, la prueba o perfiles de disolución son herramientas importantes para predecir el comportamiento *in vivo* y como parte esencial de la prueba es necesario contar con el método de cuantificación validado. Ante la necesidad de obtener perfiles de disolución para cápsulas del agente inmunosupresor llamado Tacrolimus, el presente proyecto plantea la implementación y la validación del método de cuantificación en cápsulas para ser aplicado en un estudio de comparación de perfiles de disolución en cuatro marcas comerciales.

IV. OBJETIVO

A. GENERAL

Obtener el método analítico validado por estándar adicionado para un estudio comparativo de perfiles de disolución para cápsulas de Tacrolimus de 5 mg.

B. ESPECÍFICOS

1. Obtención de una metodología sensible para la cuantificación de Tacrolimus, cápsulas de 5 mg, para un estudio de disolución.
2. Validación del método analítico por estándar adicionado para la cuantificación de Tacrolimus en cuatro marcas comerciales.
3. Aplicación del método analítico validado a un estudio de comparación de perfiles de disolución.

V. HIPÓTESIS

La determinación cuantitativa y específica de Tacrolimus contenido en cápsulas de gelatina dura usando la técnica de estándar adicionado en el medio de disolución adecuado, permitirá la cuantificación del activo dentro de un intervalo de trabajo definido idóneo para ser aplicado a un estudio comparativo de disolución de Tacrolimus.

VI. METODOLOGIA

A. MATERIALES Y EQUIPO

1. Equipos e instrumentos
 - a. Disolutor Varian 705 DS
 - b. Cromatógrafo de líquidos HITACHI ELITE LaChom calibrado
 - 1) Detector UV L-2400
 - 2) Bomba L-2130
 - 3) Horno
 - c. Potenciómetro Beckman 32 pH meter
 - d. Equipo de filtración
 - e. Bomba de vacío
 - f. Baño de ultrasonido
 - g. Balanza analítica marca Sartorius, modelo BL2105, calibrada
 - h. Micropipeta 1000 µL
2. Reactivos
 - a. Ácido fosfórico grado reactivo
 - b. Metanol grado HPLC
 - c. Agua grado HPLC
3. Sustancia de referencia
 - a. Tacrolimus sustancia de referencia, 99.9 % de pureza.
4. Productos Farmacéuticos

Los medicamentos de prueba y de referencia que se utilizaron en el ensayo fueron del mismo lote y presentaron al menos un año de vigencia antes de su fecha de caducidad al momento de realizar el estudio.

- a. Prograf[®], lote: 5D502OE. Fecha de caducidad: 03/2011.
- b. Framebin[®], lote: NO49298. Fecha de caducidad: 04/2011.
- c. Limustin[®], lote: LPTISO9E023. Fecha de caducidad: 05/2011.
- d. Tenacrine[®], lote: 81587. Fecha de caducidad: 11/2010.

B. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

1. Agua HPLC pH 4.5 ± 0.05 , medio de disolución

Se ajustaron 12 L de agua HPLC a pH 4.5 ± 0.05 con ácido fórmico concentrado y se filtró por membrana de $0.45 \mu\text{m}$.

2. Fase móvil, metanol: Agua HPLC pH 4.5 ± 0.05 (85:15 v/v)

En un frasco reservorio de 2 L se mezclaron 150 mL de agua HPLC pH 4.5 ± 0.05 con 850 mL de metanol HPLC, previamente filtrado por membrana de $0.45 \mu\text{m}$ y se desgasificó en un baño de ultrasonido durante 5 minutos.

3. Solución A, Tacrolimus 500 $\mu\text{g/mL}$

Se pesaron 5 mg de Tacrolimus, sustancia de referencia, se transfirió a un matraz de 10 mL, se disolvió y llevó a volumen con metanol HPLC.

4. Solución B, Tacrolimus 50 $\mu\text{g/mL}$

Se transfirió 1 mL de la solución A (Tacrolimus 500 $\mu\text{g/mL}$) a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó a volumen con metanol HPLC.

5. Solución I, Tacrolimus 500 $\mu\text{g/mL}$

Se mezcló el polvo de una cantidad igual de cápsulas de Tacrolimus de las diferentes formulaciones a evaluar y se pesó el equivalente a 5 mg de Tacrolimus, de acuerdo a los datos del peso promedio, se transfirió a un matraz de 10 mL, se disolvió con 500 μL de metanol HPLC y se llevó a volumen de aforo con agua HPLC a pH 4.5 ± 0.05 .

6. Solución II, Tacrolimus 50 $\mu\text{g/mL}$

Se transfirió 1 mL de la solución I (Tacrolimus 500 $\mu\text{g/mL}$) a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó a volumen con agua HPLC a pH 4.5 ± 0.05 .

C. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Tabla 1. Condiciones cromatográficas

Detector	UV
Longitud de onda	230 nm
Columna	C ₁₈ ; 150 x 3.9 mm; 4 μm (Waters, Novapak®)
Fase móvil	Metanol: Agua HPLC, pH 4.5 ± 0.05 (85:15 v/v)
Velocidad de flujo	0.5 mL/min
Volumen de inyección	60 μL
Tiempo de retención	5.5 minutos
Tiempo corrida	7 minutos

D. PRUEBAS DE CONTROL DE CALIDAD

1. Friabilidad⁹

a. Procedimiento

Se tomó una muestra de 10 cápsulas quitando el polvo cuidadosamente, antes de comenzar la prueba, se pesó con exactitud la muestra de cápsulas y se colocó en el tambor del friabilizador. Se hizo girar el tambor a 20 rpm por 5 minutos, se quitó el polvo suelto de las cápsulas como se hizo anteriormente y se pesó con exactitud la muestra de cápsulas.

b. Especificaciones.

Generalmente, la prueba se realiza una sola vez. Si se encuentran cápsulas claramente agrietadas o rotas en la muestra de cápsulas después de la prueba la muestra no ha pasado la prueba. Si los datos son difíciles de interpretar o si la pérdida de peso es mayor de lo esperado, debe repetirse la prueba dos veces y determinar la media de las tres pruebas. Para la mayoría de los productos se considera aceptable una pérdida media máxima de peso de las tres pruebas de no más del 1.0%.

2. Desintegración^{9, 24}

a. Procedimiento

En cada uno de los seis tubos de la canastilla del aparato de desintegración, se depositó una cápsula, se puso el aparato en operación, utilizando como líquido de inmersión agua a $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

b. Especificaciones

A los efectos de esta prueba, la desintegración no implica la disolución completa de la unidad ni de su ingrediente activo. Se define como desintegración completa al estado en el cual los residuos de la unidad que permanecen en el tamiz del aparato de prueba o se adhieran a la superficie inferior del disco, constituyan una masa blanda sin núcleo firme y palpable.

3. Valoración por comparación con un estándar.

a. Procedimiento

Se pesaron 10 cápsulas de cada producto y calculó el peso promedio neto. Se vació el contenido de las cápsulas en un mortero y trituro hasta obtener un polvo fino y homogéneo, se pesó en cada caso con exactitud y por triplicado el equivalente a 5 mg de Tacrolimus.

Se transfirió cada pesada a matraces volumétricos de 10mL, se disolvió y llevó a volumen con metanol HPLC. Esta solución tiene una concentración teórica de 500µg/mL.

Se inyectó por sextuplicado la solución A (Tacrolimus 500 µg/mL) y las soluciones preparadas anteriormente bajo las condiciones cromatográficas descritas en la tabla 1.

2) Cálculos

Se determinó el porcentaje de Tacrolimus presente en cada cápsula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Tacrolimus} = \frac{A_{mta}}{A_{ref}} * 100$$

Donde:

% Tacrolimus: Tacrolimus presente en cada capsula expresada en %

A_{Mta}: Altura (mUA) del pico correspondiente a Tacrolimus en la solución de prueba

A_{Ref}: Altura del (mUA) pico correspondiente a Tacrolimus en la solución de referencia

c. Especificaciones.

Contiene no menos del 90.0% y no más del 110.0% de la cantidad de Tacrolimus indicado en el marbete.

4. Uniformidad de Contenido

a. Procedimiento

Se tomaron al azar 10 cápsulas del producto de referencia y 10 cápsulas de cada uno de los productos de prueba, se determinó el peso neto y se calculó el peso promedio.

Se transfirió el contenido de cada cápsula a matraces volumétricos de 10 mL, se disolvió y se llevó a volumen de aforo con metanol HPLC. Esta solución tiene teóricamente 500 µg/mL de Tacrolimus.

Se inyectó por sextuplicado la solución A (Tacrolimus 500 µg/mL) y las soluciones preparadas anteriormente bajo las condiciones cromatográficas descritas en la tabla 1.

b. Cálculos

Se determinó el porcentaje de Tacrolimus presente en cada cápsula con la siguiente fórmula:

$$\text{mg Tacrolimus/Capsula} = \frac{\text{Peso Cápsula} * \text{Valoración}}{\text{Peso promedio cápsula}}$$

c. Especificaciones.

La cantidad de Tacrolimus en cada una de las 10 unidades de dosis debe estar dentro del rango de 90 – 110 % de la cantidad teórica indicada en el marbete y el coeficiente de variación debe ser menor o igual que el 6.0 %.⁸

E. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA PERFIL DE DISOLUCIÓN

Se realizó la validación para el medicamento de prueba y referencia como se describe a continuación:

1. Parámetros de validación del sistema

a. Linealidad

1) Procedimiento

Se transfirió con la micropipeta 1.1, 1.22, 1.66, 1.88, 2.1, 2.32 mL de la solución B (Tacrolimus 50 µg/mL) a matraces volumétricos de 10 mL, se llevó a volumen de aforo con metanol HPLC. Estas soluciones contienen aproximadamente 5.5, 6.1, 8.3, 9.4, 10.5, 11.6 µg/mL de Tacrolimus, respectivamente

Se inyectaron por duplicado las soluciones, bajo las condiciones cromatográficas descritas en la tabla 1.

2) Criterios de aceptación

El coeficiente de regresión debe ser mayor o igual que 0.99

El error relativo debido a la regresión no mayor que el 2%

b. Precisión

1) Procedimiento

Con los datos obtenidos en la linealidad del sistema se calculó el factor de respuesta en base a la siguiente fórmula y a partir de estos datos se calculó el coeficiente de variación:

$$FR = \frac{\text{Altura(mUA)}}{\text{Concentración} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right)}$$

2) Criterio de aceptación

El coeficiente de variación del factor de respuesta debe ser menor o igual al 2 %.

c. Estabilidad de la muestra

1) Procedimiento

En microtubos eppendorf se depositaron 2 mL de la solución B (Tacrolimus 50 µg/mL), una fracción se mantuvo a temperatura ambiente en la mesa de trabajo, mientras que la otra se almacenó en refrigeración a $4 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 24 horas, se inyectaron las muestras al tiempo cero y a las 24 horas bajo las condiciones cromatográficas anteriormente descritas.

2) Cálculos

Se calculó la diferencia absoluta del porcentaje cuantificado de Tacrolimus al tiempo cero y a las 24 horas de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Desviación } t_0 = \frac{| \text{Conc. recuperada } t_0 (\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}) - \text{Conc. recuperada } t_i (\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}) |}{\text{Conc. recuperada } t_0 (\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}})} \times 100$$

Donde:

Conc. Recuperada t_0 : Concentración (µg/mL) al tiempo cero

Conc. Recuperada t_i : Concentración (µg/mL) a la condición de almacenamiento

3) Criterio de aceptación.

La diferencia absoluta del promedio del porcentaje cuantificado en el análisis inicial y final debe ser menor o igual a 3%.

d. Influencia del filtro

1) Procedimiento

Se transfirieron a 12 matraces volumétricos de 10 mL, 1.60 mL de solución II (Tacrolimus, 50 µg/mL) y 0.5 mL de la solución B (Tacrolimus, 50 µg/mL), se llevó a volumen con agua HPLC a pH 4.5 ± 0.05 , esta solución tiene una concentración teórica de 10.5 µg/mL. Se inyectó al equipo cromatográfico, bajo las condiciones establecidas en la tabla 1, la muestra de seis matraces (muestra sin filtrar) y la muestra de seis matraces se filtró a través de membranas de 0.45 µm, desechando los primeros 4 mL.

2) Criterio de aceptación

La diferencia absoluta entre el promedio de por lo menos 6 datos de solución filtrada y sin filtrar debe ser igual o menor al 2%.

2. Parámetros de validación del método

a. Linealidad

1) Curva de calibración

Se transfirieron por triplicado a matraces volumétricos de 10 mL, 0.6, 0.72, 1.16, 1.38, 1.6, 1.82 mL de la solución II (Tacrolimus, 50 µg/mL) y se adicionaron 0.5 mL de la solución B (Tacrolimus, 50 µg/mL), se llevó a volumen con agua a pH 4.5 ± 0.05 . Estas soluciones contienen aproximadamente 5.5, 6.1, 8.3, 9.4, 10.5, 11.6 µg/mL de Tacrolimus, respectivamente y se Inyectaron bajo las condiciones cromatográficas anteriormente descritas.

2) Criterios de aceptación

Coefficiente de regresión mayor o igual que 0.99.

Error relativo debido a la regresión no mayor que el 2%.

b. Exactitud

1) Procedimiento

Se calculó el promedio del porcentaje de recuperación de Tacrolimus a partir de los datos obtenidos en la linealidad del método.

2) Criterio de aceptación

El promedio del % recuperado en cada punto debe ser menor a 3% con respecto a la cantidad nominal.

c. Precisión

1) Repetibilidad

a) Procedimiento

Se calculó el coeficiente de variación del porcentaje de recuperación de Tacrolimus a partir de los datos de linealidad del método.

b) Criterio de aceptación

El coeficiente de variación del porcentaje de recobro debe ser menor o igual al 3%.

2) Reproducibilidad

a) Procedimiento

Se evaluó el efecto de dos analistas en dos días diferentes analizando una muestra homogénea (10.5 µg/mL) por triplicado y se calculó el porcentaje recuperado.

b) Criterio de aceptación

El coeficiente de variación global del porcentaje recuperado debe ser menor o igual a 3%.

d. Selectividad

El método es selectivo si cumple con los criterios de linealidad, exactitud y precisión.

F. APLICACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Tabla 2. Condiciones de disolución*

Condición	Parámetros
Aparato de disolución	Aparato No. 2 (Paletas)
Medio de disolución	Agua pH 4.5 ± 0.05
Volumen	900 mL
Velocidad de agitación	50 rpm
Temperatura	37 ± 0.5 °C
Tiempos de muestreo	15, 30, 60, 90, 120 minutos
Volumen de muestra	10 mL
Reposición de volumen	No
Unidades de dosis empleadas	12

*Condiciones modificadas de las condiciones de disolución propuestas por la FDA²⁵

1. Perfiles de disolución

a. Procedimiento

- 1) Se programó el equipo de disolución con los parámetros del ensayo del perfil de disolución.
- 2) Se midieron con una probeta exactamente 900 mL de medio de disolución, previamente desgasificado.
- 3) Se dejó equilibrar la temperatura de los vasos con el baño de agua del disolutor a 37 ± 0.5°C.
- 4) Se depositaron las cápsulas con su respectivo sinker en los vasos del disolutor, con una diferencia de 20 segundos entre sí.
- 5) Se tomaron 10 mL de muestra, la cual fue filtrada usando membrana de 0.45 µm, a los tiempos establecidos para el perfil de disolución (Tabla 2).
- 6) En matraces volumétricos de 10 mL, se adicionaron 0.5 mL de solución II (Tacrolimus, 50 µg/mL) y se llevó a volumen de aforo con la muestra de disolución.

b. Cálculos

Se calculó el porcentaje disuelto a cada tiempo de muestreo de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Disuelto} = \hat{C} - \text{Cadicionada} * \frac{\text{Alicuota}}{\text{Vol final}} * \text{Vol medio dln} * \frac{\% \text{ Pureza}}{\text{Cantidad nominal}}$$

Donde:

Vol final: 10 mL

Vol medio dln: Volumen de medio de disolución restante a cada tiempo del perfil de disolución (mL)

% Pureza: Pureza del estándar (%)

Cantidad nominal: Cantidad de Tacrolimus declarada en el marbete (μg)

\hat{C} : Concentración real de la muestra ($\mu\text{g/mL}$)

$$\hat{C} = \frac{y - b}{m}$$

Donde:

y: Respuesta (ABC o altura en μA)

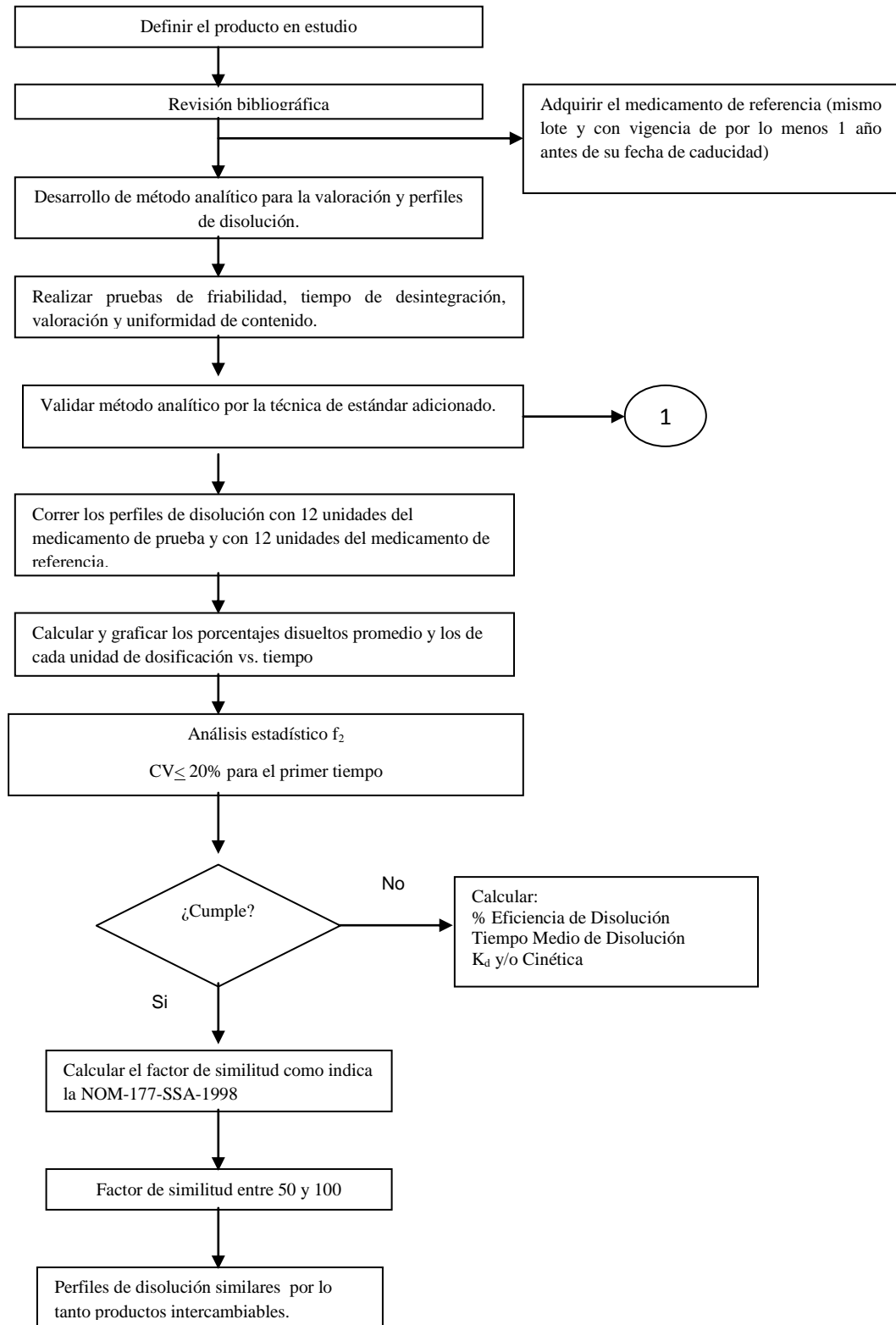
b: Ordenada al origen

m: Pendiente

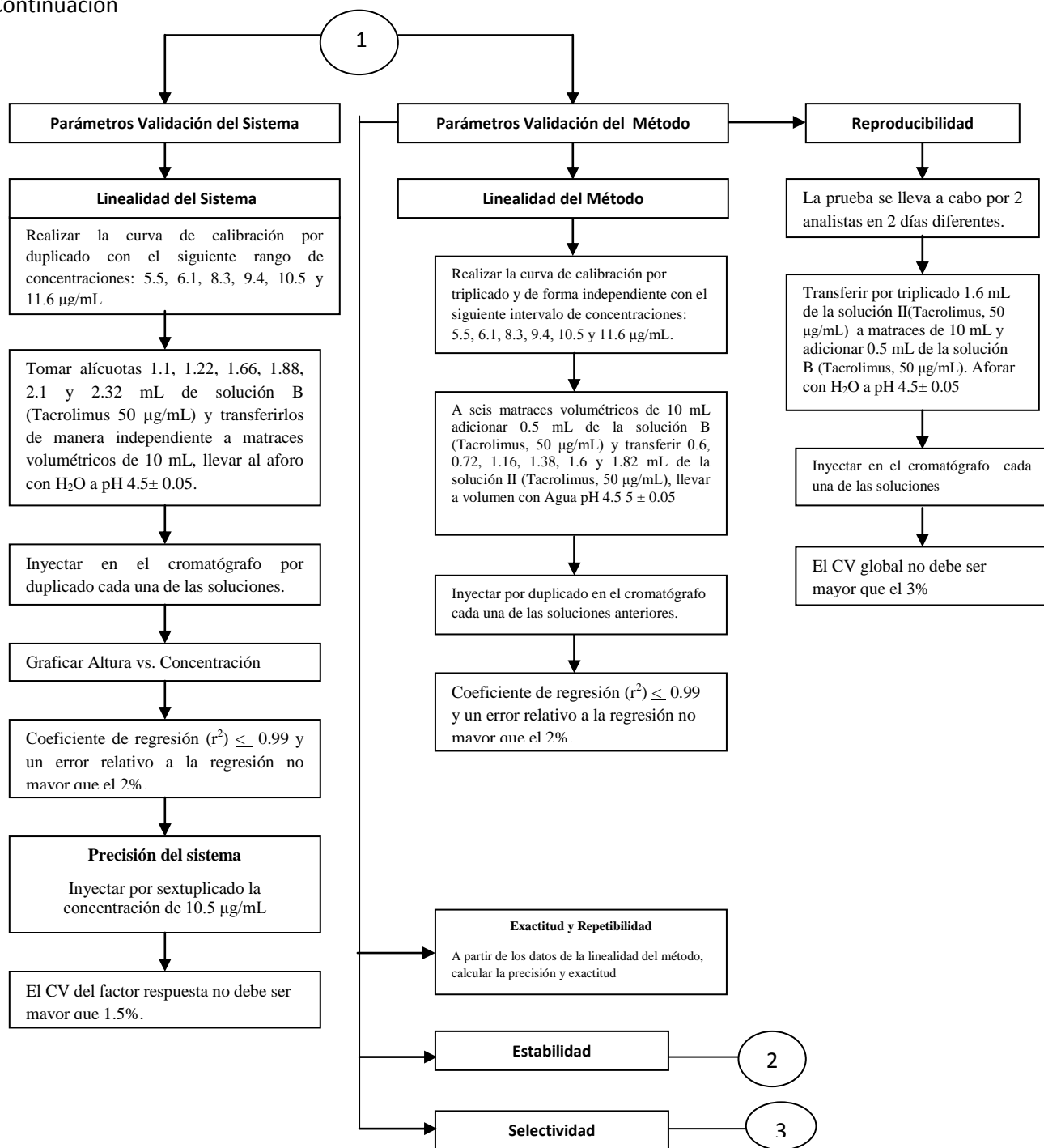
c. Selección de tiempos de muestreo

Para seleccionar los tiempos de muestreo del perfil de disolución se montó un perfil de disolución con dos cápsulas del producto de referencia (Prograf®) una cápsula pertenecía al lote al cual se le hizo el perfil de disolución, mientras que la otra cápsula había pasado su fecha de caducidad. Se tomaron muestras a los 5, 10, 15, 30, 60, 90 y 120 min; los tiempos seleccionados para realizar la prueba fueron: 15, 30, 60, 90, 120 minutos.

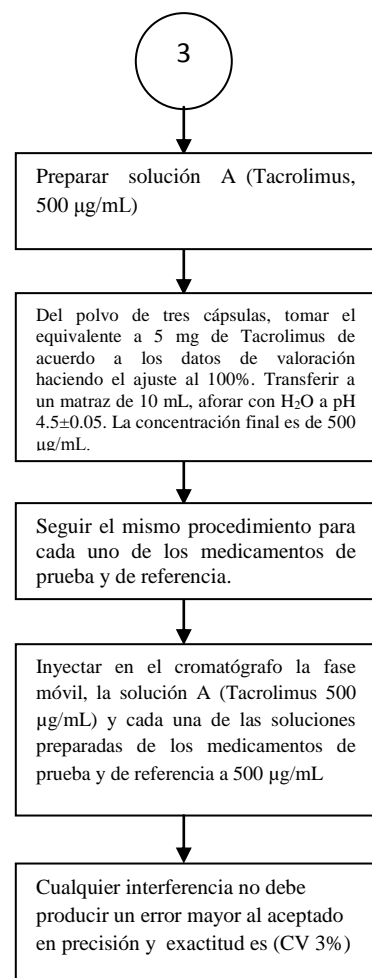
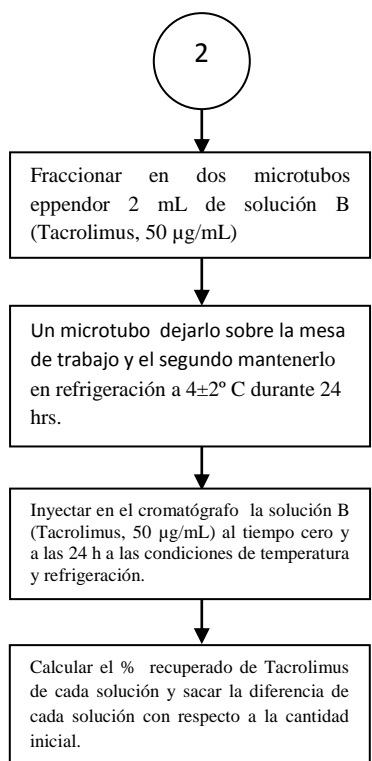
VII. DIAGRAMA DE FLUJO



Continuación



Continuación



VIII. RESULTADOS

A. PRUEBAS DE CONTROL DE CALIDAD.

1. Friabilidad y tiempo de desintegración.

Los resultados de friabilidad, tiempo de desintegración se muestran en las siguientes tablas.

Tabla 3. Friabilidad

	% Friabilidad	Especificación
Prograf	0.0224	
Framebin	0.0674	Una pérdida máxima de peso de no más del 1.0%. ⁹
Limustin	0.0337	
Tenacrine	0.0345	

Tabla 4. Tiempo de desintegración

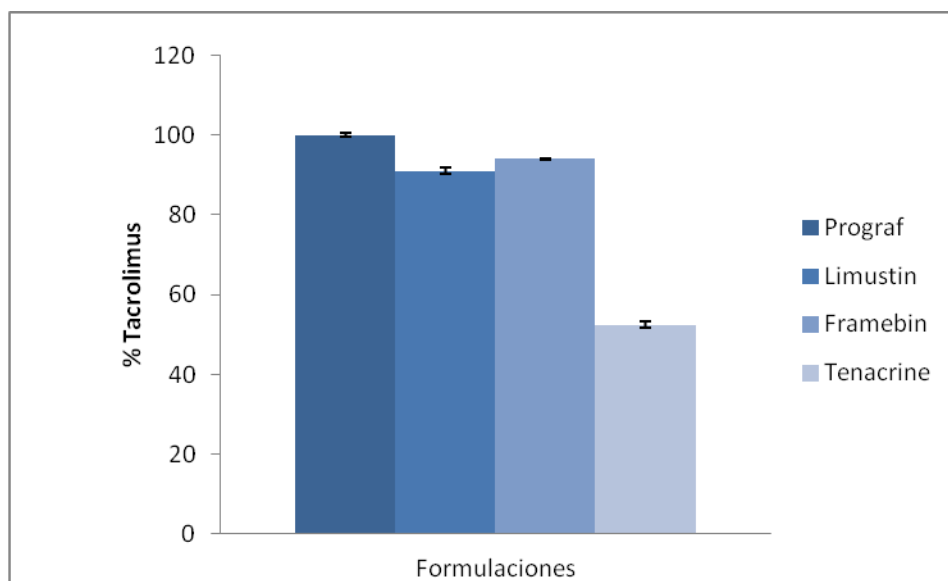
	Tiempo de desintegración	Especificación
Prograf	00:04:20	
Framebin	00:02:57	Tiempo al que se constituya una masa blanda sin núcleo firme y palpable. ^{9,24}
Limustin	00:02:04	
Tenacrine	00:05:10	

2. Valoración y uniformidad de contenido.

Los resultados de valoración y uniformidad de contenido se muestran en las tablas 5 a 7 y en la gráfica 1, donde se presentan los valores promedio de tres determinaciones con sus respectivos CV.

Tabla 5. Valoración de los medicamentos de prueba y de referencia

Tacrolimus (500µg/mL)					
	Prograf	Limustin	Framebin	Tenacrine	Especificación
1	100.3506	90.4056	94.1114	52.7754	Contiene no menos del 90.0% y no más del 110.0% de Tacrolimus indicado en el marbete.
2	99.3702	90.6992	93.7816	52.4627	
3	100.2824	91.8880	94.1525	51.9277	
Promedio	100.0010	90.9976	94.0152	52.3886	
% CV	0.5474	0.8626	0.2162	0.8183	



Gráfica 1. Promedio de la valoración de Tacrolimus en las diferentes formulaciones.

Tabla 6. Uniformidad de contenido Prograf y Framebin

Cápsula	Prograf	%	Framebin	%	Especificación
	Peso neto (g)	Tacrolimus	Peso neto (g)	Tacrolimus	
1	0.1419	100.6822	0.1916	94.2710	La cantidad de Tacrolimus en cada unidad de dosis debe estar en el rango de 90.0% a 110.0% de la cantidad teórica indicada en el marbete. CV _≤ 6.0%
2	0.1410	100.0436	0.1889	92.9426	
3	0.1421	100.8241	0.1878	92.4013	
4	0.1416	100.4693	0.1909	93.9266	
5	0.1417	100.5403	0.2005	98.6500	
6	0.1403	99.5470	0.1811	89.1048	
7	0.1402	99.4760	0.1972	97.0263	
8	0.1400	99.3341	0.1954	96.1407	
9	0.1416	100.4693	0.1907	93.8282	
10	0.1390	98.6246	0.1867	91.8601	
Promedio	0.14094	100.0010	0.19108	94.0152	Conforme
% CV		0.7222		0.0292	

Tabla 7. Uniformidad de contenido Limustin y Tenacrine

Cápsula	Limustin	%	Tenacrine	%	Especificación
	Peso neto (g)	Tacrolimus	Peso neto (g)	Tacrolimus	
1	0.1045	89.4147	0.1052	52.8407	La cantidad de Tacrolimus en cada unidad de dosis debe estar en el rango de 90.0% a 110.0% de la cantidad teórica indicada en el marbete. CV _≤ 6.0%
2	0.1071	91.6393	0.1062	53.3430	
3	0.1023	87.5322	0.1019	51.1831	
4	0.1091	93.3506	0.1025	51.4845	
5	0.1043	89.2435	0.1047	52.5895	
6	0.1086	92.9228	0.1051	52.7905	
7	0.1033	88.3878	0.1032	51.8361	
8	0.1033	88.3879	0.105	52.7402	
9	0.1121	95.9175	0.1061	53.2927	
10	0.1089	93.1795	0.1031	51.7859	
Promedio	0.10635	90.9976	0.1043	52.3889	Limustin: Conforme Tenacrine: No conforme
% CV		3.0611		1.4505	

B. VALIDACION DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA PERFIL DE DISOLUCIÓN

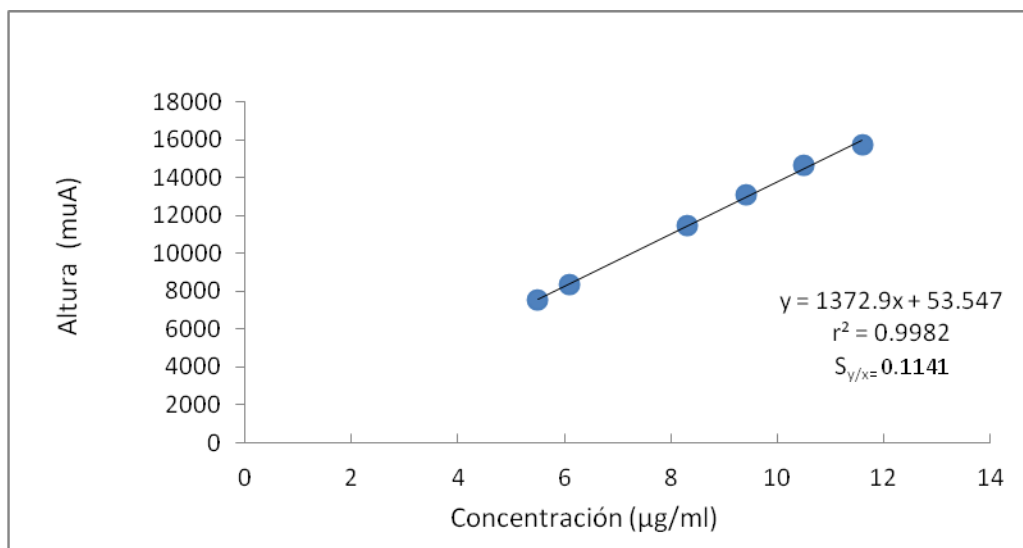
1. Parámetros de validación del sistema

a. Linealidad del sistema

En la tabla 8, se muestran las Alturas (mUA) obtenidas en el intervalo de concentración de 5.5 a 11.6 $\mu\text{g/mL}$, el coeficiente de determinación (r^2), el error debido a la regresión ($S_{y/x}$). En la gráfica 2 se muestra la linealidad del Sistema para la cuantificación de tacrolimus.

Tabla 8. Linealidad del sistema

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Altura (mUA)
5.5	7658
	7490
6.1	8507
	8215
8.3	11614
	11334
9.4	13121
	13066
10.5	14663
	14593
11.6	15974
	15541
m	1372.8879
b	53.5938
r^2	0.9982
$S_{y/x}$	0.1141



Gráfica 2. Linealidad del Sistema para Tacrolimus.

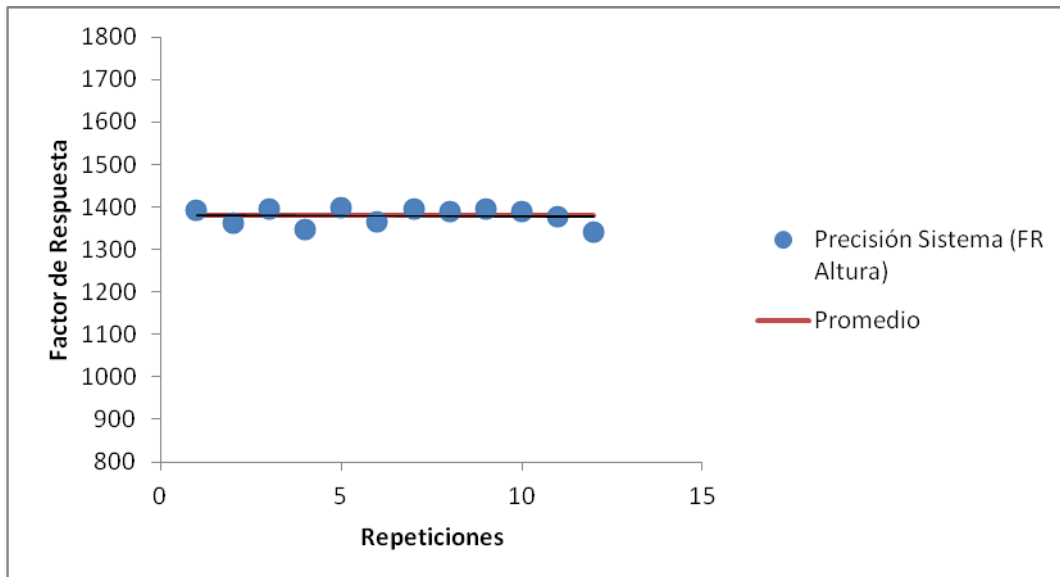
b. Precisión del sistema

Con los datos obtenidos en la linealidad del sistema se calculó el coeficiente de variación del factor respuesta en todos los niveles de concentración.

Tabla 9. Precisión del Sistema

Concentración (µg/mL)	Altura (mUA)	Factor de Respuesta	Especificación
5.5	7658	1392.36364	% CV del Factor de Respuesta menor al 2%
	7490	1361.81818	
6.1	8507	1394.59016	
	8215	1346.72131	
8.3	11614	1399.27711	
	11334	1365.54217	
9.4	13121	1395.85106	
	13066	1390	
10.5	14663	1396.47619	
	14593	1389.80952	
11.6	15974	1377.06897	
	15541	1339.74138	
	Promedio	1379.10497	Conforme
	% CV	1.50251881	

En la Gráfica 3 se muestra la precisión del sistema para la cuantificación de tacrolimus



Gráfica 3. Precisión del sistema

c. Estabilidad de la solución estándar.

En la Tabla 10 se muestra el por ciento de Tacrolimus obtenido en el estudio de estabilidad de la solución estándar a una concentración de 50 µg/mL, a las 0 y 24 horas, a temperatura ambiente y en refrigeración (4±2°C).

Tabla 10. Estabilidad de la solución estándar

	Tiempo cero		24 horas		Especificación
	%		% Recobro		
	Recobro	Tem. Amb.	4 ± 2°C		
	100.22	89.29	93.20		La diferencia absoluta del promedio del porcentaje cuantificado en el análisis inicial y final debe ser menor o igual a 2%.
	99.30	88.21	98.28		
	101.09	91.50	92.57		
	100.25	92.54	97.28		
Promedio	100.22	90.38	95.33		
					No conforme
%Dif. Absoluta		9.81	4.87		

d. Influencia del filtro.

Los resultados de la influencia del filtro de acetato de celulosa de 0.45 μm , se muestra en la siguiente tabla.

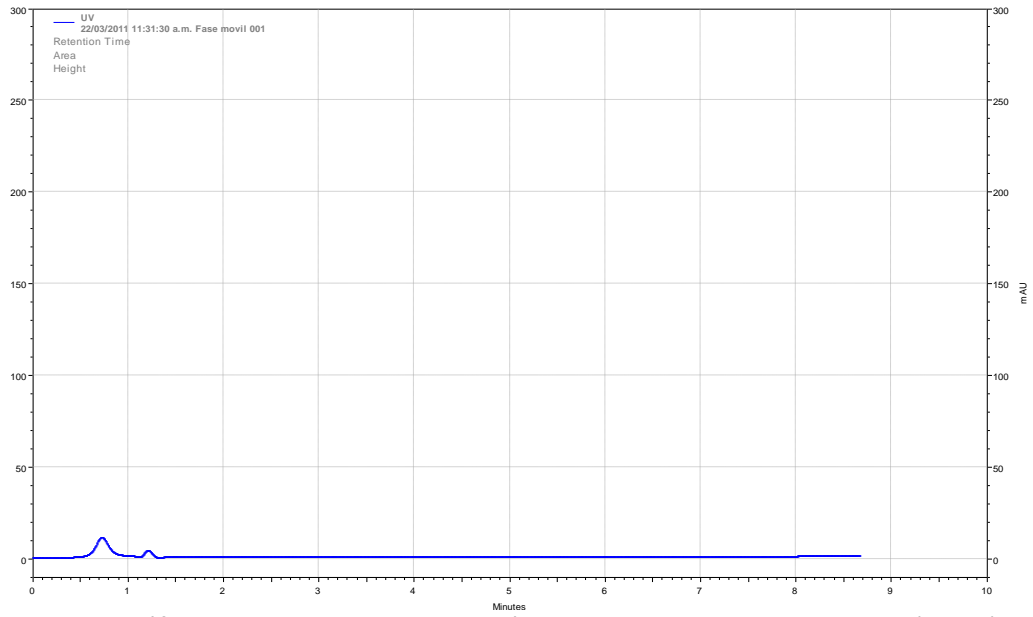
Tabla 11. Influencia del filtro

	Muestra sin filtrar	Muestra filtrada	
Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Conc. Real ($\mu\text{g/ml}$)	Conc. real ($\mu\text{g/ml}$)	Especificación
10.5	10.426	10.404	La diferencia absoluta entre el promedio de por lo menos 6 datos de solución filtrada y sin filtrar debe ser igual o menor al 2%.
	10.651	10.591	
	10.413	10.455	
	10.635	10.556	
	10.520	10.700	
	10.463	10.632	
Promedio	10.518	10.556	Conforme
Dif. Absoluta (%)	0.3644		

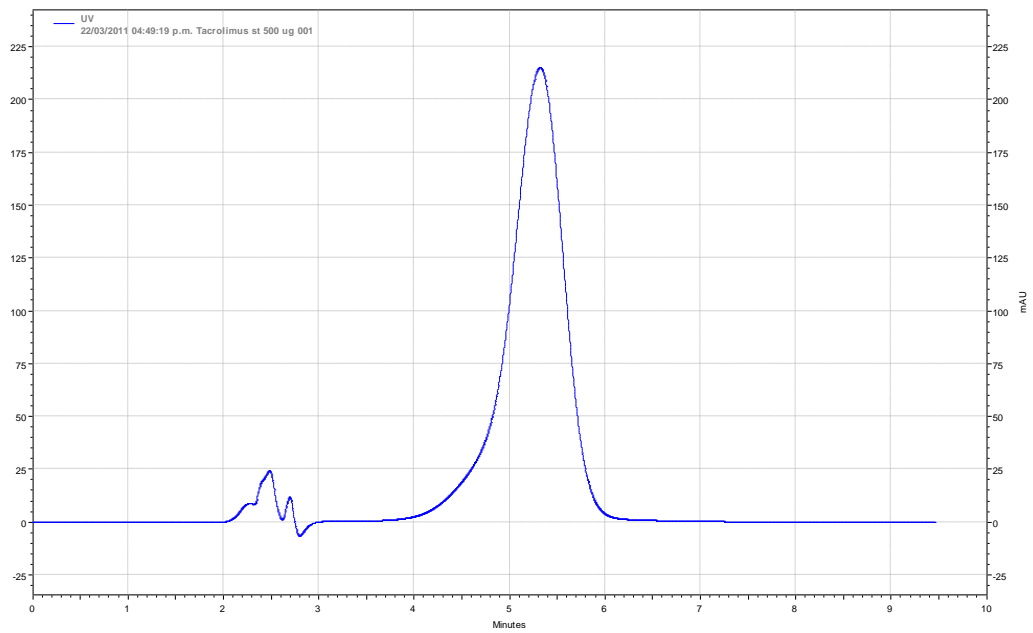
2. Parámetros de validación del método

a. Selectividad (Especificidad) del método

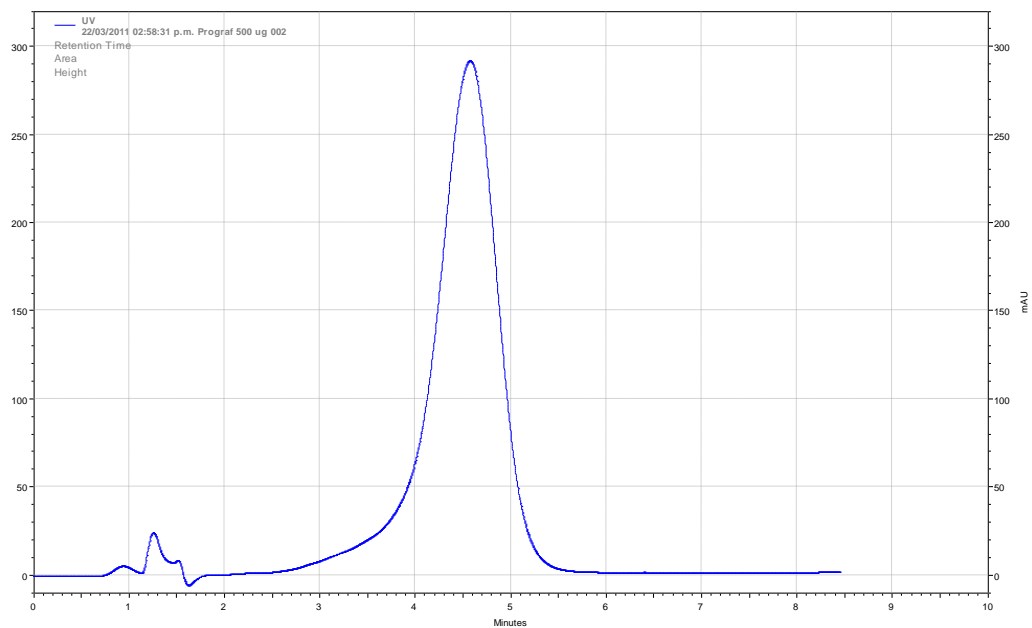
Los siguientes cromatogramas (fase móvil, solución de referencia de Tacrolimus a 500 $\mu\text{g/ml}$, y diferentes soluciones de las formulaciones de tacrolimus a 500 $\mu\text{g/ml}$) fueron obtenidos para demostrar la selectividad del método.



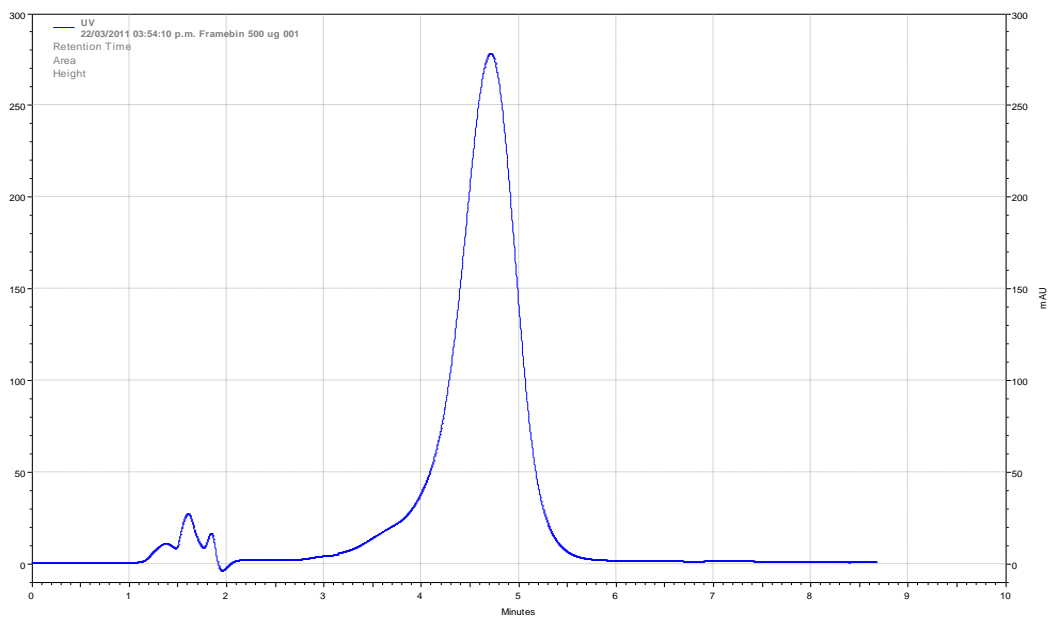
Gráfica 4. Cromatograma Fase móvil Metanol – Agua pH 4.5 ± 0.05 (85:15)



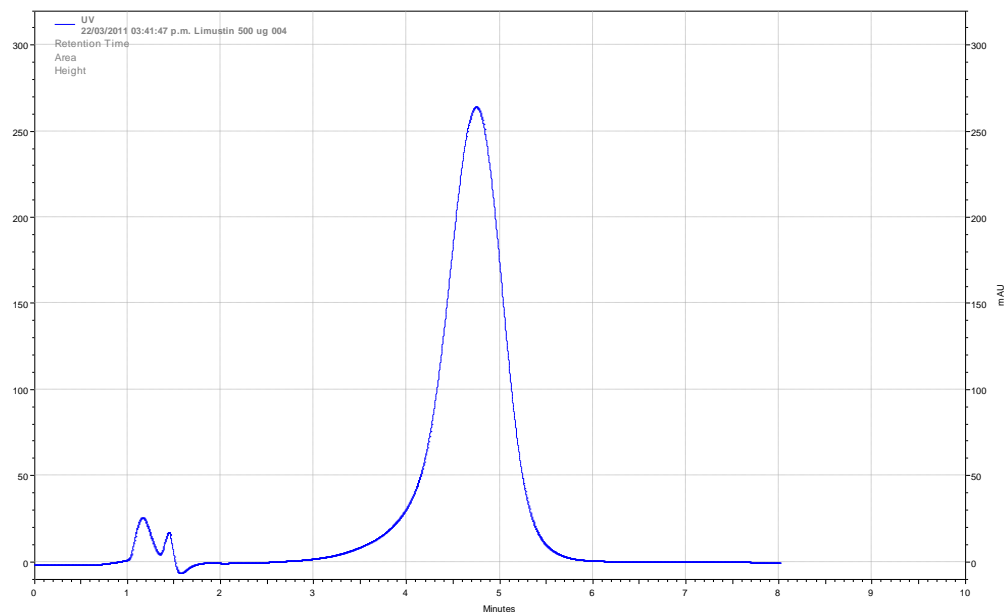
Gráfica 5. Tacrolimus 500 µg/mL (Sustancia de referencia)



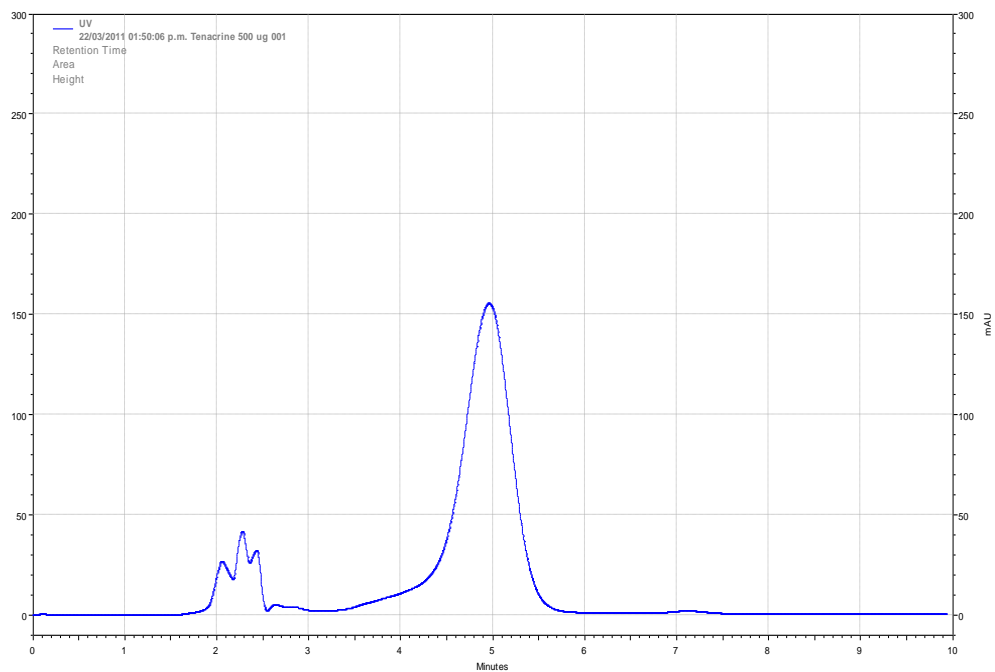
Gráfica 6. Selectividad Prograf



Gráfica 7. Selectividad Framebin



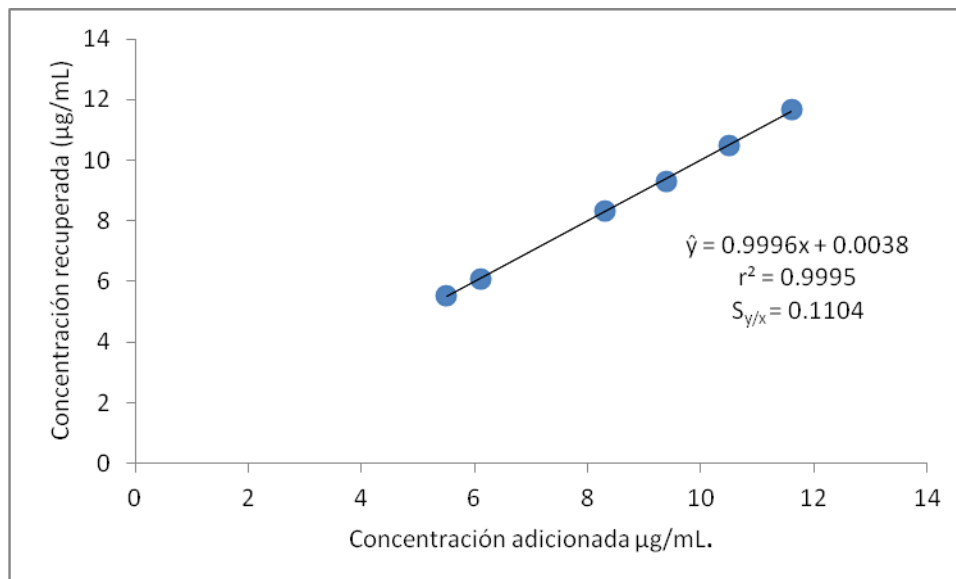
Gráfica 8. Selectividad Limustin



Gráfica 9. Selectividad Tenacrine

b. Linealidad del método.

La siguiente gráfica presenta la relación proporcional entre la concentración adicionada y la concentración recuperada de Tacrolimus en el rango de concentración de 5.5 a 11.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Gráfica 10. Linealidad del Método

c. Exactitud del método.

En la Tabla 12 se muestran los promedios de los resultados del por ciento de recobro de cada nivel de concentración de las curvas preparadas en la linealidad del método.

Tabla 12. Exactitud del método

Concentración Adicionada (µg/ml)	Concentración Recuperada (µg/ml)	% Recobro	% de diferencia	Especificaciones
5.5	5.57	101.30	1.30	El promedio del % recuperado en cada punto es < 3.0 % con respecto a la cantidad nominal.
	5.55	100.92	0.92	
	5.50	99.94	0.06	
6.1	6.05	99.19	0.81	
	6.00	98.33	1.67	
	6.22	101.99	1.99	
8.3	8.22	99.19	0.81	
	8.42	101.45	1.45	
	8.28	99.78	0.22	
9.4	9.50	101.08	1.08	
	9.30	98.92	1.08	
	9.16	97.44	2.56	
10.5	10.39	98.95	1.05	
	10.57	100.68	0.68	
	10.45	99.51	0.49	
11.6	11.67	100.58	0.58	
	11.56	99.66	0.34	
	11.79	101.66	1.66	

d. Precisión del método

1) Repetibilidad

En la tabla 13 se muestra el coeficiente de variación del por ciento de recobro de los datos obtenidos en la linealidad del método.

Tabla 13. Repetibilidad del método

Concentración adicionada ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración recuperada ($\mu\text{g/ml}$)	% Recobro	Especificaciones	
5.5	5.57	101.30	El CV del porcentaje de recuperación de los datos de linealidad no debe ser mayor que el 3%.	
5.5	5.55	100.92		
5.5	5.50	99.94		
6.1	6.05	99.19		
6.1	6.00	98.33		
6.1	6.22	101.99		
8.3	8.22	99.19		
8.3	8.42	101.45		
8.3	8.28	99.78		
9.4	9.50	101.08		
9.4	9.30	98.92		
9.4	9.16	97.44		
10.5	10.39	98.95		
10.5	10.57	100.68		
10.5	10.45	99.51		
11.6	11.67	100.58		
11.6	11.56	99.66		
11.6	11.79	101.66		
Promedio		100.03		Conforme
%CV		1.2512		

2) Reproducibilidad.

Se evaluaron dos eventos aleatorios (analista, día), analizando un nivel de concentración (10.5 µg/mL) por triplicado para probar cada condición.

Tabla 14. Reproducibilidad

	% Tacrolimus		Especificación
	D1	D2	
A1	99.00	100.88	El coeficiente de variación global no debe ser mayor que el 3%
	101.22	98.92	
	99.60	100.36	
Promedio	99.94	100.05	
A2	101.14	100.01	
	98.61	99.98	
	100.46	100.01	
Promedio	100.07	100.00	
Promedio global	100.02		Conforme
% CV	0.86		

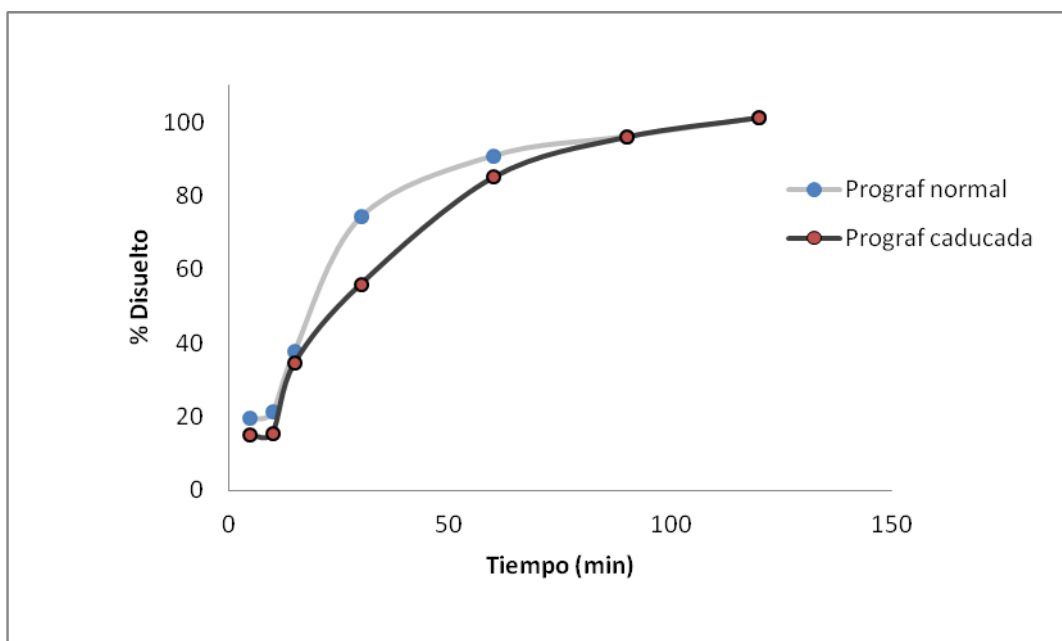
C. PERFILES DE DISOLUCIÓN

1. Selección de tiempos de muestreo

La selección de los tiempos de muestreo se realizó evaluando 7 tiempos para determinar los puntos óptimos que caracterizaran el perfil de disolución.

Tabla 15. Selección de tiempos de muestreo (con cápsulas de Prograf normal y Prograf caducada)

Tiempo (minutos)	% Disuelto	
	Normal	Caducada
5	19.52	15.07
10	21.30	15.57
15	37.68	34.56
30	74.18	56.02
60	90.80	85.02
90	96.650	95.888
120	101.057	101.135



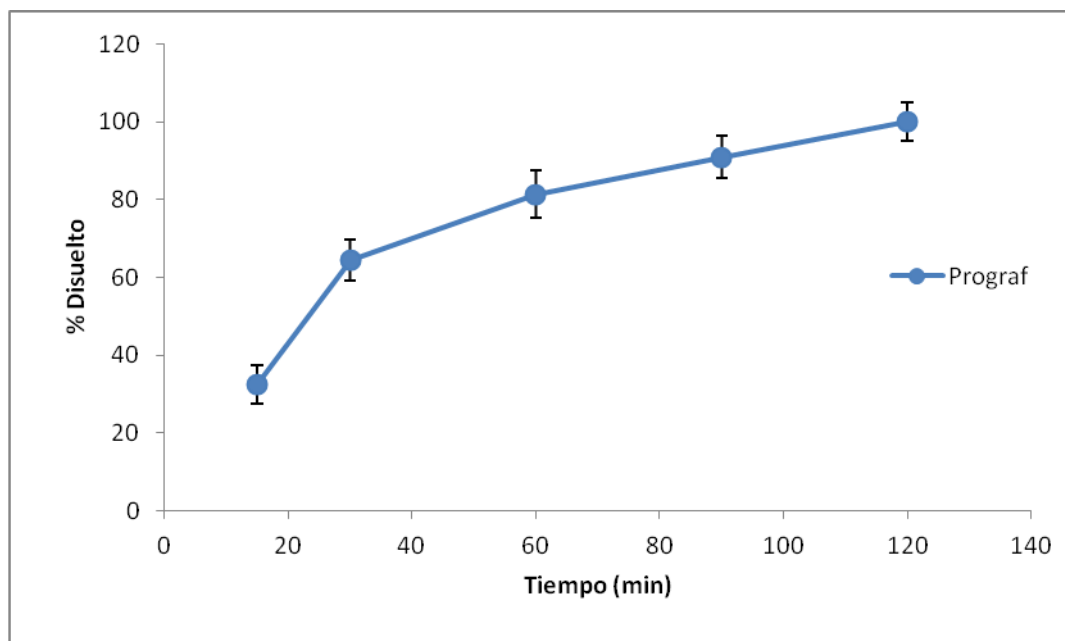
Gráfica 11. Perfil de disolución para selección de tiempos de muestreo

2. Perfiles de disolución

En las tablas 16 a 19 se presenta el promedio del porcentaje disuelto en diferentes tiempos de disolución y el porcentaje del coeficiente de variación en cada punto y la representación gráfica del promedio del porcentaje disuelto contra el tiempo para cada formulación se presenta en las gráficas 12 a 16.

Tabla 16. Promedio de datos de perfil de disolución Prograf®

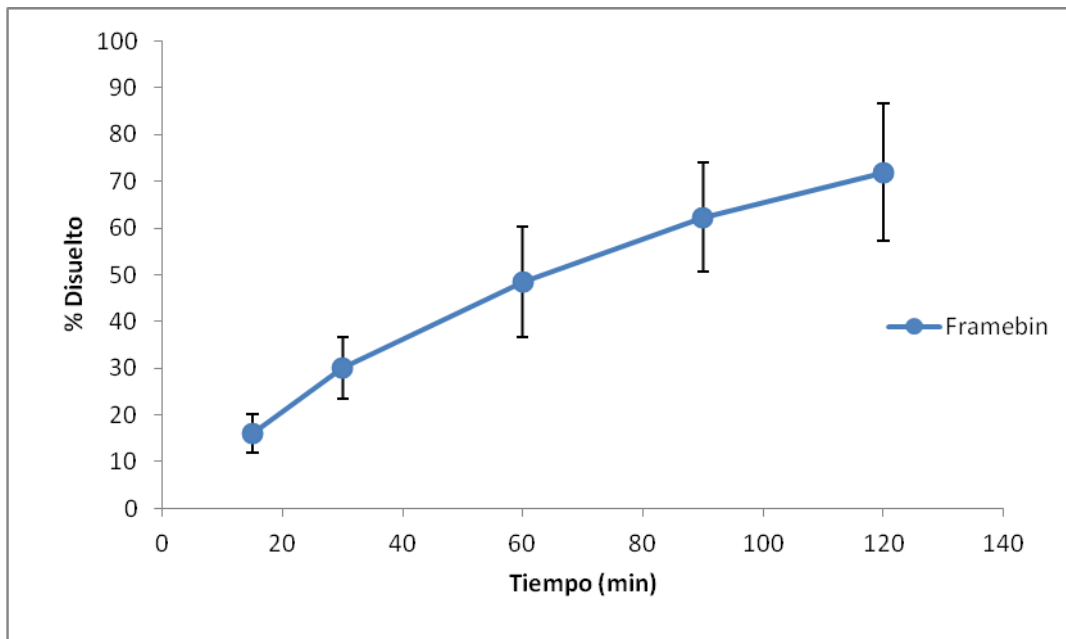
Tiempo	Promedio (n=12)	%CV
15	32.472	15.164
30	64.436	8.163
60	81.386	7.500
90	90.964	6.012
120	100.005	4.818



Gráfica 12. Promedio para la formulación Prograf®, cada punto representa el promedio de 12 determinaciones \pm su desviación estándar.

Tabla 17. Promedio de datos de perfil de disolución Framebin®

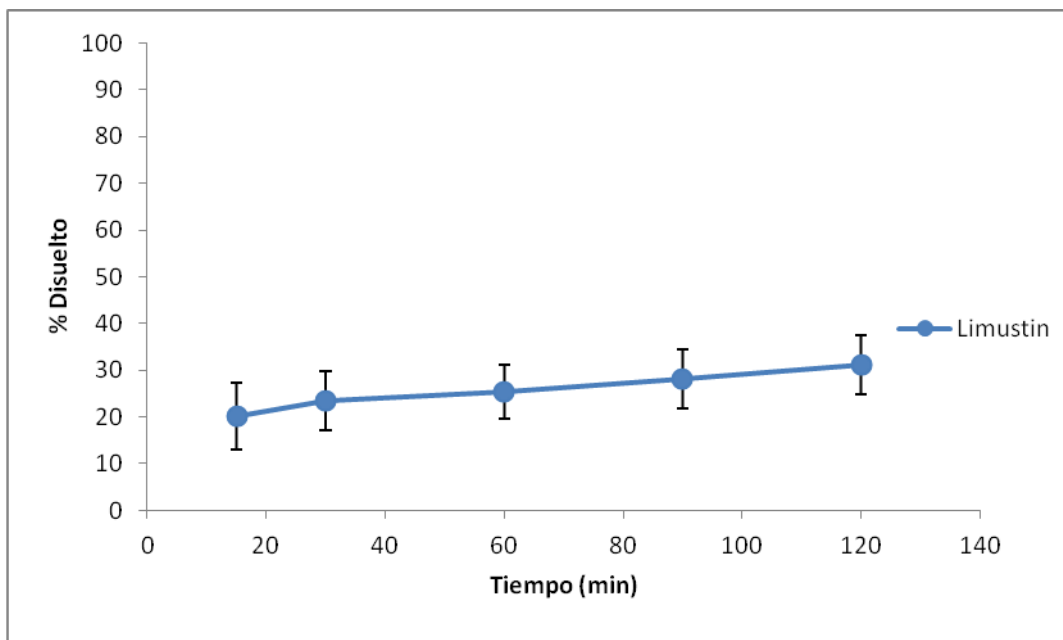
Tiempo	Promedio (n=12)	%CV
15	16.0243	25.935
30	30.1200	21.849
60	48.4539	24.281
90	62.2261	18.797
120	71.9473	20.519



Gráfica 13. Promedio para la formulación Framebin®, cada punto representa el promedio de 12 determinaciones \pm su desviación estándar.

Tabla 18. Promedio de datos de perfil de disolución Limustin®

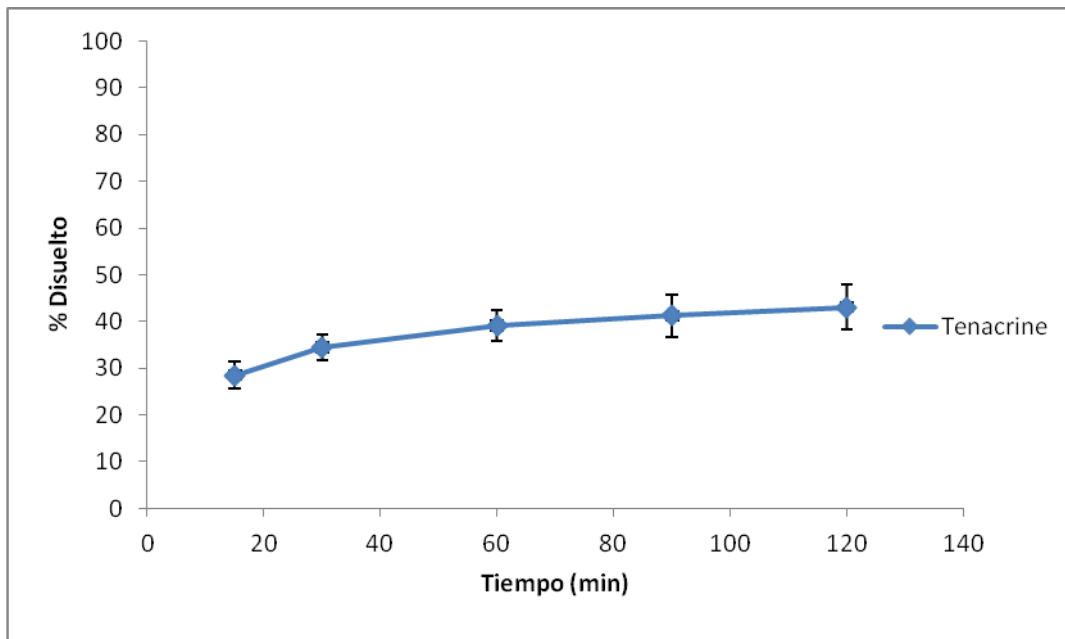
Tiempo	Promedio (n=12)	%CV
15	20.077	35.331
30	23.364	26.981
60	25.377	23.163
90	28.217	22.513
120	31.077	20.411



Gráfica 14. Promedio para la formulación Limustin®, cada punto representa el promedio de 12 determinaciones \pm su desviación estándar.

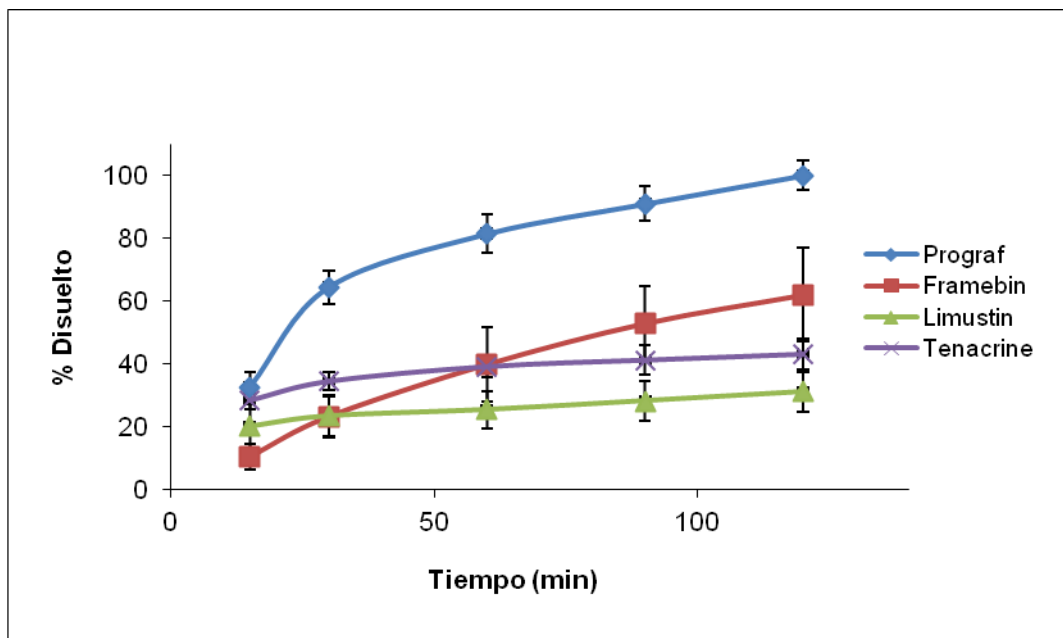
Tabla 19. Promedio de datos de perfil de disolución Tenacrine®

Tiempo	Promedio (n=12)	%CV
15	28.473	10.077
30	34.491	7.879
60	39.171	8.438
90	41.235	11.037
120	43.094	11.126



Gráfica 15. Promedio para la formulación Tenacrine®, cada punto representa el promedio de 12 determinaciones \pm su desviación estándar.

Las diferencias en el porcentaje disuelto entre las formulaciones genéricas de Tacrolimus y el producto de referencia se observan claramente en el siguiente gráfico.



Gráfica 16. Perfiles de disolución promedio de formulaciones de Tacrolimus, cápsulas de 5 mg

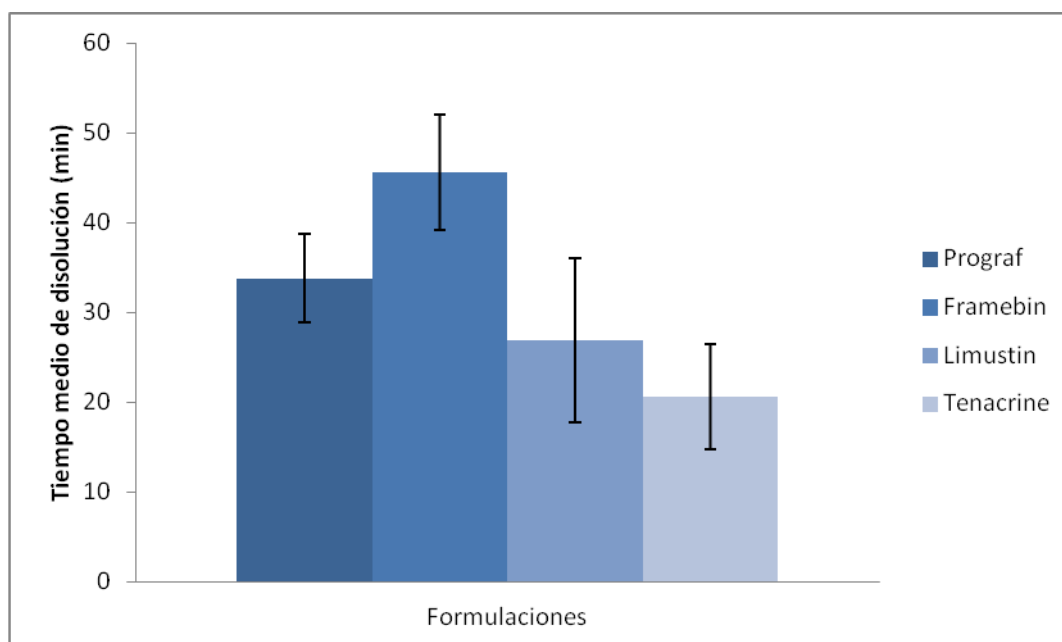
3. Comparación de perfiles de disolución

a. Modelos Independientes

1) Tiempo Medio de disolución

Tabla 20. Tiempo Medio de Disolución (min)

	Prograf	Framebin	Limustin	Tenacrine
	35.3091	46.0904	46.7412	17.2620
	36.1585	47.3791	36.2856	27.2746
	31.5055	55.5275	27.6826	32.0788
	45.5533	47.3216	35.0705	20.8113
	35.7869	55.5894	22.4017	23.8294
	36.8572	50.7210	23.2508	26.3459
	31.9736	40.8396	21.7651	18.8130
	27.0622	36.2044	15.3109	11.5890
	29.1000	46.0279	16.7103	20.2229
	28.2820	42.6172	21.0704	16.0909
	34.2057	42.7104	31.6669	17.9797
	33.5178	35.7376	24.6030	14.9312
Promedio (min, n=12)	33.7760	45.5638	26.8799	20.6024
% CV	14.5605	14.1394	33.8219	28.3330

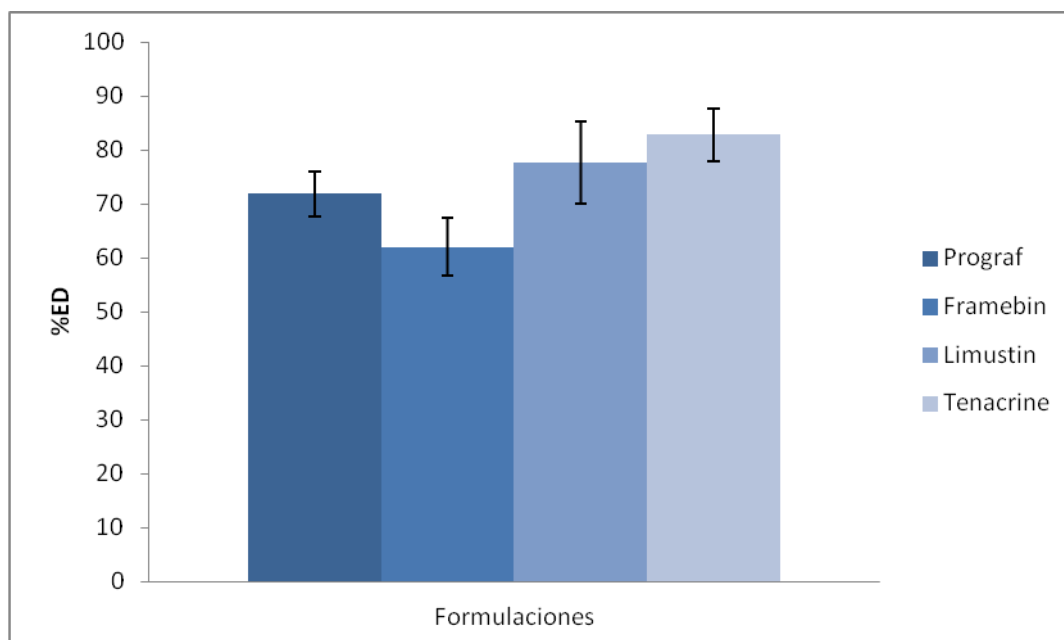


Gráfica 17. Tiempo Medio de Disolución promedio de 12 determinaciones \pm su desviación estándar.

2) Eficiencia de Disolución

Tabla 21. Eficiencia de Disolución a los 120 min

	Prograf	Framebin	Limustin	Tenacrine
	70.5758	61.5914	61.0490	85.6150
	69.8679	60.5175	69.7620	77.2712
	73.7454	53.7270	76.9311	73.2676
	62.0389	60.5653	70.7746	82.6573
	70.1776	53.6755	81.3319	80.1422
	69.2856	57.7325	80.6243	78.0451
	73.3553	65.9670	81.8624	84.3225
	77.4481	69.8296	87.2409	90.3425
	75.7500	61.6434	86.0748	83.1476
	76.4317	64.4857	82.4413	86.5909
	71.4953	64.4080	73.6109	85.0169
	72.0685	70.2187	79.4975	87.5574
Promedio (% n=12)	71.8533	62.0301	77.6001	82.8313
% CV	5.7037	8.6550	9.7630	5.8727



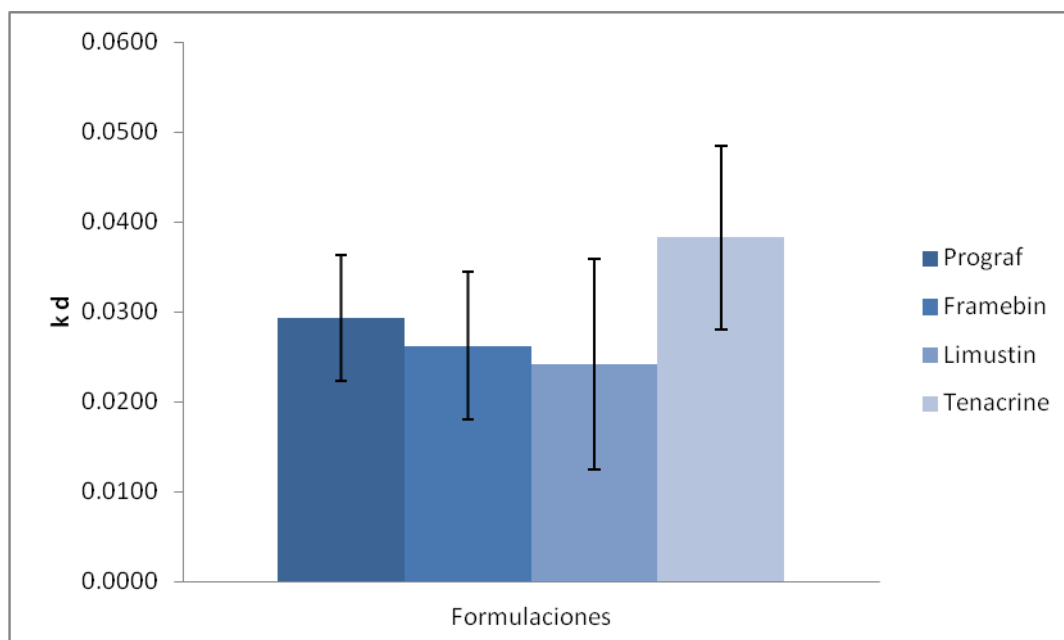
Gráfica 18. Eficiencia de Disolución promedio de 12 determinaciones \pm su desviación estándar.

b. Modelos dependientes (con base fisicoquímica)

1) Cinética de primer orden

Tabla 22. Constantes de disolución (Cinética de Orden Uno)

	Prograf	Framebin	Limustin	Tenacrine
	0,0370	0,0284	0,0272	0,0430
	0,0327	0,0138	0,0279	0,0196
	0,0268	0,0214	0,0274	0,0407
	0,0162	0,0237	0,0170	0,0409
	0,0216	0,0406	0,0400	0,0449
	0,0366	0,0218		0,0512
	0,0352	0,0263		0,0390
	0,0297	0,0336		0,0266
	0,0341			0,0245
	0,0331			
	0,0213			
Promedio	0.0293	0.0262	0.02798	0.0382
% CV	23.8103	31.2026	29.2495	28.9172

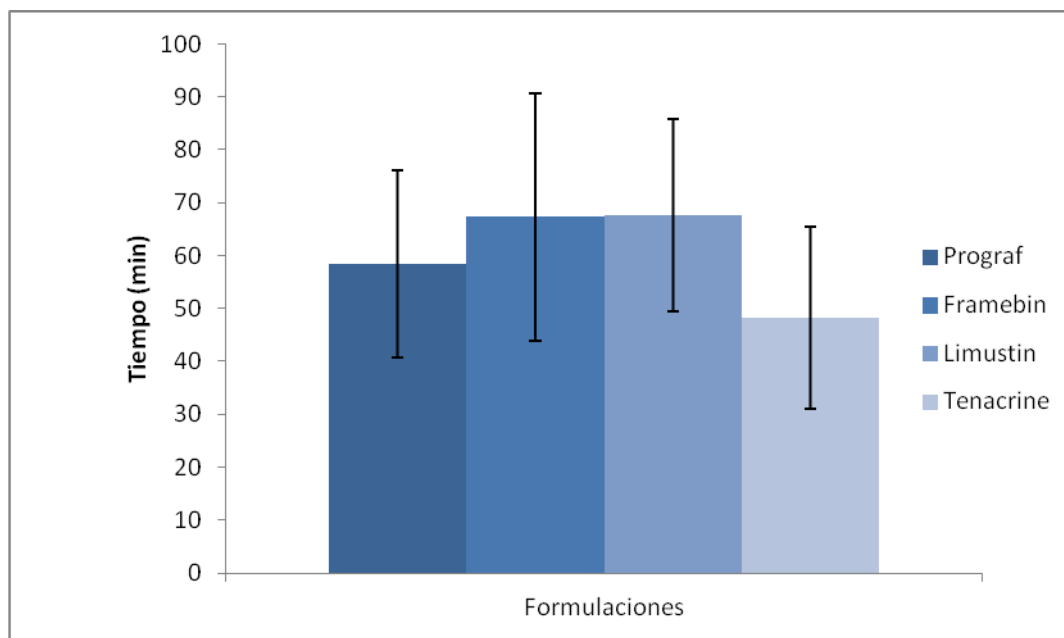


Gráfica 19. Constantes de disolución promedio de 12 determinaciones \pm su desviación estándar.

2) Tiempo al cual se disuelve el 80% de fármaco, siguiendo una cinética de orden uno.

Tabla 23. Tiempo al cual se disuelve el 80%

	Prograf	Framebin	Limustin	Tenacrine
	43.5446	56.6004	59.0741	37.4169
	52.9105	116.4835	57.7008	82.0031
	60.0497	75.0546	58.6415	39.5047
	99.2294	67.7958	94.7588	39.3375
	74.3940	39.6176	40.2623	35.8139
	43.9320	73.7198		31.4454
	45.7499	61.2519		41.2926
	54.2091	47.9486		60.5729
	47.2034			65.7962
	48.5659			
	75.5079			
Promedio (min, n=12)	58.6633	67.3090	67.5922	48.1315
% CV	29.9032	34.6721	26.8102	35.6665



Gráfica 20 Tiempo al cual se disuelve el 80% promedio de 12 determinaciones \pm su desviación estándar.

IX. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La absorción de un fármaco desde una forma de dosificación sólida tras la administración oral depende de la liberación, la disolución del fármaco bajo condiciones fisiológicas y la permeabilidad por el sistema gastrointestinal. Debido a la naturaleza crítica de estos primeros dos pasos, la disolución *in vitro* puede ser relevante para la predicción del rendimiento *in vivo*, si la velocidad de disolución es lenta o incompleta, el nivel sanguíneo alcanzado con este fármaco resultará bajo e insuficiente para lograr un efecto terapéutico adecuado. En base a la solubilidad y permeabilidad de los fármacos, se creó el Sistema de Clasificación de Biofarmacéutica (BCS, por sus siglas en inglés)¹¹ donde el Tacrolimus es considerado como un medicamento de Clase II, (baja solubilidad - alta permeabilidad)³⁰, siendo el factor limitante para la absorción de este fármaco la disolución y por ende puede condicionar su biodisponibilidad. El Tacrolimus es un fármaco inmunosupresor de margen terapéutico estrecho,³¹ farmacocinética variable (después de la administración oral su absorción es poca y variable, su biodisponibilidad oral es baja y exhibe gran variabilidad intra e interindividual de 4 a 89% con una media de ~ 25%)²¹. Dado que la biodisponibilidad depende de una serie de factores tales como: factores de orden fisiológico y factores de orden tecnológico o de la formulación y donde los más importante que los factores fisiológicos, por ser previsible y rectificables, son los factores de orden tecnológico y de la formulación, los cuales pueden afectar profundamente la disponibilidad biológica de los fármacos en una forma farmacéutica.^{1, 32}

La alta variabilidad de la respuesta encontrada para este fármaco ha sido atribuida a la diferencia en disolución encontrada en algunas formulaciones estudiadas²⁶⁻²⁸. Ante estas referencias y conociendo que en nuestro país se encuentran comercialmente al menos cuatro formulaciones que contienen tacrolimus (Prograf®, Framebin®, Limustin® y Tenacrine), en este estudio se planeó estudiar parámetros *in vitro* de control de calidad incluyendo el perfil de disolución en cuatro formulaciones comerciales de cápsulas de Tacrolimus de 5 mg, para mostrar la semejanza o no entre las formulaciones.

Para el desarrollo de este estudio se empleó Tacrolimus monohidratado con 99.9% de pureza como estándar de trabajo y cápsulas de Tacrolimus de 5 mg, indicadas en la metodología.

Dado que no se cuenta con una monografía farmacopéica de Tacrolimus publicada nacional o internacionalmente las pruebas de friabilidad, tiempo de desintegración, valoración y uniformidad de contenido se consideraron como suficientes pruebas de control de calidad.

En la Tabla 3 y 4 se presentan los resultados obtenidos en las pruebas de friabilidad y tiempo de desintegración, respectivamente. En la prueba de friabilidad, todos los lotes analizados presentaron un porcentaje de pérdida menor al 1.0%, indicando que las cápsulas presentaron una buena resistencia al desgaste durante las etapas de manufactura y manipulación.

En la prueba de desintegración se observa que los lotes analizados de Framebin[®], Limustin[®] y Tenacrine[®] presentan un tiempo de desintegración menor al del medicamento de referencia, no obstante todas están conforme a la especificación establecida. Un fármaco incorporado en una cápsula es rápidamente liberado conforme la cápsula se desintegra esta es una etapa crucial para las formas de dosificación inmediata ya que la velocidad de desintegración afecta la disolución y de manera subsecuente la eficacia del medicamento²⁴.

La valoración del principio activo fue realizada empleando cromatografía líquida de alta resolución con detección en la región ultravioleta, considerando las características fisicoquímicas del fármaco y el contenido del mismo en las cápsulas. En la Tabla 5 se presentan los resultados obtenidos de la valoración empleando para la cuantificación la técnica de comparación con un estándar y en las tablas 6 y 7 uniformidad de dosis de cada lote analizado. La valoración mostró que los lotes estudiados de Prograf[®], Framebin[®] y Limustin[®] cumplen con el criterio establecido ($100.00 \pm 0.5474\%$, $94.01 \pm 0.2162\%$ y $90.99 \pm 0.8626\%$, respectivamente) en tanto el lote de Tenacrine salió de especificación al determinarse solo un $52.38 \pm 0.8183\%$ de contenido de principio activo. Considerando que todo medicamento genérico debe contener el mismo principio activo y la misma dosis que el medicamento innovador y/o de referencia aunque con diferentes excipientes, según la definición de medicamento genérico⁸, los resultados obtenidos sugieren que al menos uno de los productos genéricos evaluado no cumple este precepto.

No obstante que hasta el momento del planteamiento y desarrollo de este estudio no se encontraba publicada la monografía farmacopéica de Tacrolimus cápsulas que diera la pauta para realizar las pruebas *in vitro* que llevaran a evaluar la semejanza entre las formulaciones, en la revisión bibliográfica realizada se encontró al menos dos metodologías para realizar la disolución

de cápsulas de Tacrolimus²⁶⁻²⁸, las condiciones elegidas para este estudio de comparación de perfiles de disolución están basadas en la recomendación de la FDA²⁵, una vez establecidas dichas condiciones fue necesario validar el método analítico para la cuantificación de Tacrolimus, por el método de estándar adicionado dado que no se contaban con los placebos de los medicamentos, de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998. Los resultados de la validación para el perfil de disolución mostraron que el sistema analítico (Tabla 8 y 9) presenta una linealidad en el intervalo de concentración de 5.5 a 11.6 µg/mL (Gráfica 2) con un coeficiente de correlación de 0.9982 y un error relativo a la regresión menor al 2%, además de ser preciso con un CV del factor de respuesta <2% (Tabla 9, gráfica 3).

El método mostró ser lineal también en el rango 5.5 a 11.6 µg/mL (Gráfica 10), preciso y exacto (Tabla 12), así mismo, los espectros de absorción no presentaron interferencias con los excipientes contenidos en las cápsulas analizadas a la longitud de onda de análisis (Figura No. 4 – 9), por lo que se decidió hacer una mezcla de las formulaciones para tomarla como estándar de trabajo, obteniéndose un recobro del 100% con un coeficiente de variación menor al 0.6%.

La estabilidad del fármaco en solución se llevó a cabo tras la preparación de una solución a una concentración de 50 µg/mL analizada el día en que se preparó (tiempo cero), se mantuvo en temperatura ambiente y refrigeración, se analizó a las 24 horas y no demostró estabilidad al compararse con las respuestas del tiempo cero, por lo tanto, el método analítico es válido, siempre y cuando las muestras se analicen inmediatamente después de ser tomadas en la prueba de disolución.

Como parte del desarrollo de la metodología del perfil de disolución, una vez que se validó el método analítico para la cuantificación de Tacrolimus se hizo un perfil de disolución con una cápsula caducada y una del lote por analizar del producto de referencia con más de cinco muestreos (como los marcados en el propuesta encontrada) para determinar tiempos de muestreo que permitieran observar la fase ascendente, el punto de inflexión y la fase de meseta del perfil de disolución. Los resultados se muestran en la Tabla 15 y en la Gráfica 11, en la que se observa una lenta liberación del fármaco en los primeros 10 minutos del proceso, para posteriormente presentarse una la fase ascendente rápida con un punto de inflexión entre los 30 y 60 minutos para alcanzar la máxima disolución posterior a los 60 minutos. Con base a estos resultados se

estableció finalmente que los tiempos de muestreo para realizar los perfiles de disolución serían: 15, 30, 60, 90 y 120 min.

A pesar de que el criterio establecido en la NOM-177-SSA1-1998⁸ de presentar una variación menor al 5% respecto al contenido del medicamento innovador, se evaluaron los perfiles de disolución para todos los productos analizados, en las Tablas 16 a 19 se presentan los promedios de los resultados de los perfiles de disolución de los diferentes lotes analizados.

Las desviaciones estándar encontradas en cada punto determinado del por ciento disuelto de cada lote analizado son homogéneas, lo que indica que la formulación está controlada desde el proceso de fabricación hasta el perfil de disolución. La Gráfica 15 muestra el promedio de los perfiles de disolución de los diferentes lotes analizados con su respectiva desviación estándar, Prograf a los 60 minutos alcanza el 80% disuelto y el 100% a los 120 minutos, Framebin[®] muestra una fase ascendente de disolución al igual que Prograf[®], sin embargo, la máxima disolución encontrada a los 120 min es de 62%, las formulaciones de Limustin[®] y Tenacrine están demostrando una fase ascendente de liberación no tan marcada como el producto innovador ya que la disolución no va más allá del 31 y 43% respectivamente, lo que indica que a pesar de tener controlado el proceso de fabricación no es lo suficientemente bueno como para liberar el fármaco, los datos fueron analizados por un de Análisis de Varianza de un factor al azar tomando en cuenta los resultados de Tiempo Medio de Disolución (Tabla 20), Eficiencia de Disolución (Tabla 21), Constante de disolución (Tabla 22), y Tiempo al cual se disuelve el 80% de principio activo (Tabla 23) con una significancia del 5%, los resultados mostraron que hay elementos suficientes para asegurar que existen diferencias apreciables en los TMD y %ED de las formulaciones evaluadas. Usando una prueba de diferencia de medias (Prueba de Tukey) se pudo establecer cuál o cuáles parejas de medias son diferentes (Ver Anexo).

Los genéricos de Tacrolimus pueden cumplir en términos de friabilidad y desintegración, Framebin[®] y Limustin[®] cumplen el criterio de valoración mientras que Tenacrine no y ninguno de los lotes de medicamentos genéricos analizados bajo las condiciones de prueba propuestas son comparables al medicamento de referencia ya que presentaron marcadas diferencias en el perfil de disolución, este comportamiento no contradice lo presentado en estudio previo realizado bajo diferentes condiciones de disolución al analizar diferentes marcas de cápsulas de Tacrolimus²⁶.

X. CONCLUSIONES

Se desarrolló y validó un método analítico por estándar adicionado para la cuantificación de Tacrolimus, cápsulas de 5 mg, para un estudio comparativo de perfiles de disolución de cuatro marcas comerciales, empleando como medio de disolución Agua a pH 4.5 ± 0.05 a 50 rpm y haciendo un análisis estadístico para comparar los perfiles de disolución.

Las formas farmacéuticas son preparados complejos, constituidos por uno o más principios activos y sustancias inertes (excipientes), que cumplen diversos objetivos dentro de la formulación. Estas combinaciones de excipientes, y fármacos, conjuntamente con las tecnologías empleadas para la obtención de las formas farmacéuticas sólidas, contribuyen a que la liberación de los principios activos o fármacos, a veces no sea tan rápida o completa como se desearía para obtener una buena respuesta farmacológica, esta propiedad ha dado origen a otro concepto: la biodisponibilidad, que es aquella característica relacionada con la velocidad y magnitud de la absorción de un principio activo que alcanza la circulación sistémica. Sin duda, la propiedad más importante de una forma farmacéutica la constituye su capacidad para liberar su principio activo en el organismo, de modo que éste pueda ser absorbido en óptimas condiciones y llegar, por este mecanismo, al sitio de acción.

Realizar estudios de biodisponibilidad para garantizar la calidad de un producto farmacéutico resulta un proceso costoso y largo. Para este objetivo y basado en las características de disolución de los fármacos en las formas farmacéuticas sólidas (cápsulas, comprimidos, etc.) se han desarrollado métodos "in vitro" de control de calidad biofarmacéutico, que correlacionan muy bien con las características de absorción de fármacos en el hombre, bajo condiciones determinadas. Mediante estos métodos, se puede evaluar en forma rápida las características de disolución de los principios activos a través de la velocidad a la cual se disuelven éstos desde una forma farmacéutica sólida, lo cual nos permite predecir, con cierta exactitud, las características de absorción de estos principios, garantizando en forma más o menos rápida, la calidad de cada lote de fabricación en la industria farmacéutica. Si bien, en un comienzo los estudios de disolución fueron concebidos como una herramienta para asegurar la calidad de un producto y la uniformidad de los diferentes lotes de fabricación, hoy día tienen un nuevo significado, el cual es el de ser capaz de demostrar que la velocidad de disolución es una herramienta que nos permite asegurar la bioequivalencia entre medicamentos genéricos.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Troy D. Remington The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition. Lippincott Williams & Wilkins.
2. Hanson A.W., Hand Book of dissolution Testing, 2nd, Aster Publishing Corporation, USA, 1991, pp.69-113
3. Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Form, August 1997.
4. Guidance for Industry: Extended Release Solid Oral Dosage Forms: Development, Evaluation and Application of In Vitro/In Vivo Correlations, September 1997.
5. Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System, August 2000.
6. Shah VP. Dissolution: quality control test vs. Bioequivalence test. Dissolut Technol 2001; 8(4):6-7.
7. Banakar V. Umesh, Pharmaceutical Dissolution Testing. Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol.49, Marcel Dekker, Inc., USA, 1992, pp. 2-4, 133- 163, 251-272.
8. Norma Oficial Mexicana 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.
9. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Comisión Permanente de los Estados Unidos Mexicanos, SSA 8^a Ed. 2005, pp. 2133 – 2135.
10. V.P. Sha, K.K. Midha, S. Dighe, I.J. McGilveray, J.P. Skelly, A.Yacobi, T. Layloff. Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Dissolut Technol 1992; 82: 1-7.
11. G. L- Amidon, H. Lennemas, V.P. Shah and J.R. Crison. A theoretical basis for a biopharmaceutics drug classification: The correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. Phar. Research. 12: 6. 413 – 420 (1995).
12. Costa P, Sousa J. Modeling and comparison of dissolution profiles, European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2001, 13, 123-133
13. Moore J., Flanner H. Mathematical Comparison of Dissolution Profiles. Pharmaceutical Technology. 1996, 20(6):64-74.

14. Shah VP, Tsong Y, Sathe P, Liu JP. In vitro dissolution profile comparison—statistics and analysis of the similarity factor, f₂. *Pharm Res* 1998; 15:889–896.
15. Shah VP, Tsong Y, Sathe P, Williams RL. Dissolution profile comparison using similarity factor, f₂. *Dissolut Technol* 1999; 6(3):15.
16. Anderson N., Bauer M, Boussac N. An evaluation of fit factors and dissolution efficiency for the comparison of in vitro dissolution profiles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 17 (1998) 811–822
17. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons
18. The Merck Index, An Enciclopedia of Chemicals, Drug and Biologicals, 12 th.ed., 1996.
19. Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, et. al. FK 506 A novewl inmunosupressat isolated from a *Streptomyces* 1. Fermentation, isolation and physis – chemical and biological characteristics. *The journal of Antibiotics*. Vol. XL, No. 9, 1249 – 1255, 1987.
20. Mekky Q, Lee C, Aweeka F, et. al. Pharmacokinetics of Tacrolimus (FK 506) in kidney transplant patients. *Clin Pharmacol Ther* 1993; 53: 238.
21. Venkataramanan R, Sweminathan A, Prasad T. Clinical Pharmacokinetics of Tacrolimus. *Clin Pharmacokinetic*. 1995, 29:404 -430.
22. Moller A, Iwasaki k, Kawamura A. The disposition of 14 C – labeled Tacrolimus after intravenous and oral administrations in healthy human subjects. *Drug Metab Dispos*. 1999, 27: 633 – 639.
23. Robinson BV, Boyle GJ, Miller SA, et al. Optimal dosing of intravenous tacrolimus following pediatric heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*1999; 18:786—91.
24. United States Pharmacopeia 32 (USP 32); National Formulary 27 (NF 27). United Status Pharmacopeia Convention, Rockville. MD 2008, pp 302, 416-421, 638- 644, 742.
25. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp Search Results Dissolution.cfm>.
Fecha de consulta: 10 de Junio de 2010.
26. Petan JA, Undre N, First MR, Saito K, Ohara T, Iwabe O, Mimura H, Suzuki M, Kitamura S. Physiochemical Properties of Generic Formulations of Tacrolimus in Mexico. *Transplantation Proceedings*. 40: 1439-1442, 2008.
27. Namiki Y, Fujiwara A, Kihara N, Koda S. Determination of the Inmunosuppressive Drug Tacrolimus in its Dosage Forms by High Performance Liquid Chromatography. *Chromatographia*. 1995, 40: 253 – 258.

28. Moyano MA, Simionato LD, Pizzorno MT. Validation of a Liquid Chromatography Method for Determination of Tacrolimus in Pharmaceutical Dosage Forms. *Journal of AOAC International*. 2006, 89: 1547 – 1551.
29. Böer TM, MARQUES MR, Cardoso SG. Determination of Tacrolimus in Pharmaceutical Formulations by Validated Spectrophotometric Methods. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*. 2008, 29: 137 – 143.
30. Tamura S. Ohike A, Ibuki R, Amidon G. Tacrolimus is a Class II: Low solubility - High permeability drug: The effect of P – glycoprotein efflux on regional permeability of Tacrolimus in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002, 91: 719 – 729.
31. Palylyk – Colwell, Jamali F, Dryden W. Bioequivalence and Interchangeability of narrow therapeutic range drugs: Canadian Society for Pharmaceutical Sciences discussion. *J Pharm Sci*. 1998, :2.
32. Kahan B. Considerations concerning generic formulations of immunosuppressive drugs. *Transplant Proc*. 1999, 31: 1635.
33. Acuerdo por el que se relacionan las especialidades farmacéuticas susceptibles de incorporarse al Catálogo de Medicamentos genéricos intercambiables y se determinan las pruebas que deberán aplicárseles, publicado en el Diario Oficial de la Federación

XII. ANEXO

A. ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR AL AZAR

1. Modelo

$$Y_{ij} = \mu + (\mu_j - \mu) + (y_{ij} - \mu_j)$$

Se tienen dos fuentes de variación: las repeticiones del Tiempo Medio de Disolución (TMD), Eficiencia de disolución (ED), la Constante de Disolución (kd), evaluados independientemente y el error residual.

2. Hipótesis

Ho: No hay efecto de las formulaciones en el promedio de las diferentes evaluaciones hechas o no hay diferencia significativa entre los promedios de las evaluaciones realizadas.

$$Ho: \mu_{\text{Prograf}} = \mu_{\text{Framebin}} = \mu_{\text{Limustin}} = \mu_{\text{Tenacrine}}$$

Ha: Hay efecto de las formulaciones en el promedio de las evaluaciones realizadas o hay diferencia significativa entre los promedios de las evaluaciones realizadas.

Ha: Al menos un par de medias es diferente.

Tabla 24. ANADEV A de un factor al azar para Tiempo Medio de Disolución

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	Estadístico de contraste	
Formulaciones (Tratamientos)	4-1=3	4114,866	1371,622	F_{calc}	30.077
Error	48-4=44	2006,589	45,604	$F_{0.95,3,44}$	2.812
Total	48-1=47	6121,455		Decisión:	
				Como $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$, Ho se rechaza.	

Tabla 25. ANADEV A de un factor al azar para Eficiencia de Disolución

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	Estadístico de contraste	
Formulaciones (Tratamientos)	3	2857,546	952,515	F_{calc}	30.077
Error	44	1393,464	31,67	$F_{0.95,3,44}$	2.812
Total	47	4251,01		Decisión:	
				Como $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$, Ho se rechaza.	

Tabla 26. ANADEVa de un factor al azar para Constantes de Disolución

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Estadístico de contraste
Formulaciones (Tratamientos)	3	0,000539	0,00018	F_{calc} 2.444
Error	29	0,00213	0,0000735	$F_{0.95,3,29}$ 2.934
Total	32	0,00267		Decisión: Como $F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$, Ho se acepta

Tabla 27. ANADEVa de un factor al azar para el Tiempo al cual se disuelve el 80%

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	Estadístico de contraste
Formulaciones (Tratamientos)	3	1650,6440	550,2150	F_{calc} 1.465
Error	29	10893,1050	375,6240	$F_{0.95,3,29}$ 2.934
Total	32	12543,7490		Decisión: Como $F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$, Ho se acepta

3. Conclusión

Con una significancia del 5% hay elementos suficientes para asegurar que existen diferencias apreciables en el Tiempo Medio de Disolución y la Eficiencia de Disolución de las formulaciones evaluadas.

4. Diferencia Honesta Significativa de Tukey

Con base en el resultado de la prueba realizada se define cuál o cuales parejas de medias son diferentes. Usando un nivel de significancia del 5%, se comparan las diferentes parejas de medias de Tiempo Medio de Disolución y Eficiencia de Disolución con la Diferencia Significativa de Tukey, calculada en forma probabilística utilizando un nivel de significancia del 5%, $k=4$ (Formulaciones), grados de libertad del error de 44 y los datos de la tabla de ANADEVa de un factor al azar.

Tabla 28. Diferencia Significativa de Tukey para Tiempo Medio de Disolución

Comparaciones por factor				
Comparación	Diferencia de Medias	k	q	P<0,050
Framebin vs. Tenacrine	24,961	4	12,804	Sí
Framebin vs. Limustin	18,684	4	9,584	Sí
Prograf vs. Framebin	11,788	4	6,047	Sí
Prograf vs. Tenacrine	13,174	4	6,758	Sí
Prograf vs. Limustin	6,896	4	3,537	No
Limustin vs. Tenacrine	6,278	4	3,22	No

Tabla 29. Diferencia Significativa de Tukey para Eficiencia de Disolución

Comparaciones por factor				
Comparación	Diferencia de Medias	k	q	P<0,050
Tenacrine vs. Framebin	20,801	4	12,804	Sí
Prograf vs. Tenacrine	10,978	4	6,758	Sí
Limustin vs. Framebin	15,57	4	9,584	Sí
Prograf vs. Framebin	9,823	4	6,047	Sí
Prograf vs. Limustin	5,747	4	3,537	No
Tenacrine vs. Limustin	5,231	4	3,22	No