



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIOS DE PERFILES DE DISOLUCIÓN
INTRÍNSECA DE CASIOPEINA[®] III-ia EN SOLUCIÓN
AMORTIGUADORA DE FOSFATOS
A pH 7.4**

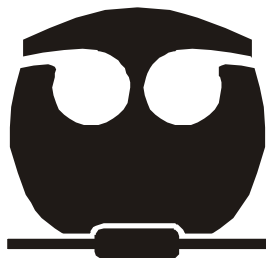
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

LUIS TREJO CORTEZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: INÉS FUENTES NORIEGA

VOCAL: SOFÍA MARGARITA RODRÍGUEZ ALVARADO

SECRETARIO: LAURO MISAEL DEL RIVERO RAMÍREZ

1er. SUPLENTE: JUAN MANUEL RODRÍGUEZ

2° SUPLENTE: MARÍA DE LOURDES BEATRIZ MAYET CRUZ

Sitio donde se desarrolló el tema:

Lab. 112 y 113, Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor del tema

Dra. Inés Fuentes Noriega

Supervisor técnico

M. en C. Kenneth Rubio Carrasco

Sustentante

Luis Trejo Cortez

ÍNDICE GENERAL

	Página
INTRODUCCIÓN	1
GENERALIDADES	4
• Casiopeina [®] III-ia	5
• Monografía Casiopeina [®] III-ia	6
○ Solubilidad	6
○ Estabilidad	7
• Disolución	7
• Ley de difusión de Fick	8
• Teorías de Disolución	8
○ Teoría de Noyes y Whitney	8
○ Teoría de Nerst y Brüner	9
• Métodos para la determinación de la disolución intrínseca	12
○ Método de la tableta suspendida	12
○ Método del disco rotatorio	12
○ Método del disco rotatorio modificado	13
○ Método del disco estático	13
○ Método del disco estático modificado	13
○ Método de Wood	15
• Método oficial de la USP 30	16
○ Aparato	16
○ Preparación del compacto	17
○ Procedimiento	17
OBJETIVOS	19
DESARROLLO EXPERIMENTAL	21
• Equipos	22
• Materiales	22

• Reactivos	23
• Preparación de soluciones	23
○ Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH 7.7 ± 0.05	23
○ Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH 7.4 ± 0.05	24
○ Solución Stock de Casiopeina [®] III-ia	24
• Preparación de la Curva de Calibración	24
• Metodología analítica para la determinación de Casiopeina [®] III-ia por HPLC en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4	25
• Validación del método analítico para la determinación de Casiopeina [®] III-ia por HPLC en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4	26
• Validación del Sistema	26
○ Linealidad	26
○ Precisión (Repetibilidad)	27
• Validación del Método	27
○ Linealidad	27
○ Precisión	27
▪ Repetibilidad	27
▪ Reproducibilidad	28
○ Exactitud	28
• Estabilidad	28
• Influencia del Filtro	29
• Perfil de Disolución Intrínseca	30
○ Preparación de las tabletas	30
○ Ecuaciones para el cálculo de la constante de velocidad de disolución intrínseca	30
○ Secuencia de análisis en HPLC para el Perfil de Disolución de Casiopeina [®] III-ia	32

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	33
• Validación del Sistema	34
○ Linealidad	34
○ Precisión (Repetibilidad)	36
• Validación del Método	37
○ Linealidad	37
○ Precisión	39
▪ Repetibilidad	39
▪ Reproducibilidad	40
○ Exactitud	41
• Estabilidad	42
• Influencia del Filtro	45
• Perfil de Disolución Intrínseca	46
CONCLUSIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1 Curva de calibración de Casiopeina® III-ia en medio de disolución	24
2 Linealidad del sistema	34
3 Precisión del sistema	36
4 Linealidad del método Día 1	37
5 Linealidad del método Día 2	38
6 Repetibilidad del método Día 1	39
7 Repetibilidad del método Día 2	40
8 Reproducibilidad del método Día 1 y Día 2	40
9 Exactitud del método en el Día 1	41
10 Exactitud del método en el Día 2	41
11 Exactitud del método Día 1 y Día 2	42
12 Estabilidad de las muestras a Temperatura Ambiente (2, 4 y 6 h)	42
13 Estabilidad de las muestras a Temperatura Ambiente (24 h)	43
14 Estabilidad de las muestras en Refrigeración 4°C (2, 4 y 6 h)	43
15 Estabilidad de las muestras en Refrigeración 4°C (24 h)	44
16 Estabilidad de las muestras en Baño a 37°C (2 h)	44
17 Evaluación de la Influencia del filtro	45
18 Adecuabilidad	46
19 Perfil de Disolución Intrínseca	46
20 Calculo de constante de velocidad de disolución intrínseca (K_{int})	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura de Casiopeina® III-ia	6
2	Modelo de Nerst y Brūner de la “capa estacionaria”	9
3	Representación grafica de la ecuación	10
4	Sistema de disco estacionario <i>Distek inc.</i>	14
5	Aparato de Wood	16
6	Aparato de disolución intrínseca	18
7	Curva de calibración promedio del sistema	34
8	Cromatograma: Blanco del sistema	35
9	Cromatograma Casiopeina® III-ia 2 µg/mL	35
10	Cromatograma Casiopeina® III-ia 14 µg/mL	36
11	Curva de calibración promedio del método Día 1	38
12	Curva de calibración promedio del método Día 2	39
13	Perfil de Disolución Intrínseca Promedio	48

INTRODUCCIÓN

I N T R O D U C C I O N

Los estudios de perfiles de disolución se pueden utilizar en algunas ocasiones para predecir y estudiar problemas de absorción de fármacos, principalmente en las etapas iniciales del desarrollo de un nuevo medicamento o para fármacos que aún se encuentran en etapa de aprobación⁽¹⁾.

Los estudios de perfil de disolución de fármacos a partir de una forma farmacéutica, permiten la búsqueda de correlación entre los parámetros de disolución in vitro con parámetros in vivo, lo cual ayuda a pronosticar como los cambios en la formulación o el proceso de fabricación pueden afectar la biodisponibilidad del fármaco⁽²⁾. Los estudios de disolución in vitro, son importantes para establecer el perfil de disolución de un fármaco puro (disolución Intrínseca), así como del fármaco en forma farmacéutica (disolución aparente).

La disolución intrínseca de una sustancia o de un fármaco, es de vital importancia en la búsqueda y selección de nuevos candidatos a fármacos⁽³⁾; la medición de la constante de velocidad intrínseca es una herramienta cada vez más importante en el laboratorio de investigación y desarrollo farmacéutico⁽⁴⁾, ya que es uno de los factores para caracterizar fármacos y excipientes, en condiciones tales que el área expuesta permanece constante. La velocidad de disolución intrínseca “es independiente de los efectos de formulación y mide las propiedades intrínsecas en función de los medios de disolución”⁽⁵⁾.

Se sabe que la velocidad de disolución intrínseca del fármaco así como su biodisponibilidad se ven influenciadas por las propiedades del estado sólido tales como: forma cristalina, amorfismo, polimorfismo, área superficial, el grado de hidratación y el tamaño de partícula³. La solubilidad y la velocidad de disolución intrínseca de un fármaco deben ser determinadas en función del pH dentro del rango fisiológico, en medios acuosos. Esta información es esencial para el desarrollo de formas farmacéuticas que estén libres de problemas en cuanto a su biodisponibilidad.

Kaplan, Wood y colaboradores propusieron que la absorción de fármacos con velocidades de disolución intrínseca mayores a 1 mg/(cm²min) generalmente no

presentan problemas de absorción y fármacos con velocidades de disolución intrínseca menores a $1 \text{ mg}/(\text{cm}^2\text{min})$ generalmente presentan problemas de absorción⁽⁶⁾.

El presente trabajo pretende estudiar la velocidad de disolución intrínseca del fármaco Casiopeina[®] III-ia en solución amortiguadora a pH 7.4, el cual simula un pH fisiológico. En primera instancia se optimizó el método analítico cromatográfico diseñado por Huerta Palacios (2008) para la cuantificación de la Casiopeina[®] III-ia, una vez obtenido el método analítico se procedió a realizar la validación de éste, utilizando los criterios de aceptación que se mencionan la NOM-177-SSA1-1998⁽²⁰⁾. Habiendo obtenido resultados dentro de especificaciones en la validación, se realizaron los perfiles de disolución y la cuantificación mediante HPLC y se efectuaron los cálculos necesarios para obtener el valor de la constante de velocidad de disolución intrínseca de Casiopeina[®] III-ia en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4.

GENERALIDADES

GENERALIDADES

CASIOPEINAS^{®(7)}

Con el inicio de la búsqueda de moléculas que compartan características químico-estructurales a las que se les atribuye la actividad biológica parecida a la del cisplatino ($\text{cis}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$, complejo con platino hidrosoluble, inorgánico y divalente), cuya actividad anticancerígena ha sido demostrada en pacientes con cáncer de vejiga, cabeza y cuello, cáncer ovárico avanzado y de endometrio, pero que no produzcan la toxicidad renal, auditiva y sobre sistema nervioso central que acompaña la terapia con este fármaco, se ha abierto un amplio campo de investigación dentro del diseño de moléculas bioinorgánicas con núcleos metálicos.

La búsqueda de compuestos que demuestren una mayor eficacia y seguridad en su aplicación terapéutica ha conducido al diseño, síntesis y posterior evaluación de una familia de compuestos de coordinación llamados Casiopeinas[®], por la doctora Lena Ruiz Azuara y su equipo de trabajo en la Facultad de Química de la UNAM.^(8, 9)

Esta familia se compone de compuestos de coordinación con centro metálico ($\text{Cu}(\text{II})$), que en la esfera de coordinación presentan un ligante bidentado tipo diimina (N-N) y otro aminoacidato (N-O) o donador (O-O) siguiendo una geometría cuadrada plana o pirámide de base cuadrada.

Durante el desarrollo de estas moléculas se tomaron en cuenta tres aspectos fundamentales:

1. La inclusión de un metal, distinto al platino, lo que disminuye su toxicidad, su estado de oxidación y su número de coordinación,
2. La formación de quelatos que favorecen la orientación "cis" alrededor del ion metálico,
3. La asociación de moléculas con capacidad quelante que le confiere diferentes niveles de hidrofobicidad con sustituyentes periféricos que pueden modificar las propiedades de los compuestos.

Estas características se reflejan en las propiedades de los complejos en términos de su solubilidad, potencial electroquímico, capacidad de transporte a través de membranas y estabilidad, de tal manera que se lleve a cabo una interacción de estos compuestos con el ADN, propuesta como mecanismo de acción^(10, 11).

Este compuesto demostró actividad anticancerígena en modelos *in vitro*, al evaluar la inhibición del crecimiento de un cultivo celular empleando las líneas tumorales y murinas.

MONOGRAFÍA DE CASIOPEINA® III-ia⁽¹²⁾

[Cu(4,4'-dimetil -2,2'- bipiridina)(acetilacetona)]NO₃, su fórmula condensada es CuC₁₇N₃O₅ · H₁₉ · 2H₂O, polvo cristalino color azul, con peso molecular de 444.93 g/mol (con dos moléculas de agua) y un pka de 8.25.

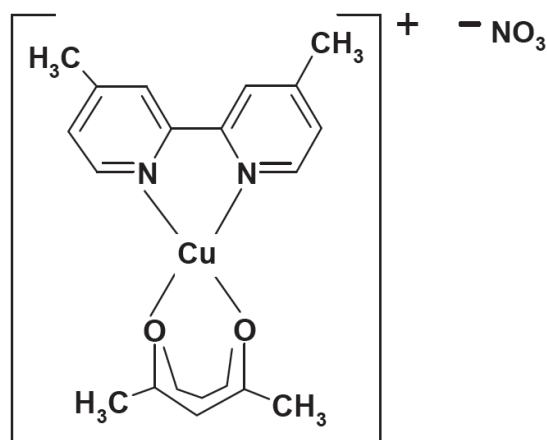


Figura 1. Estructura de Casiopeina® III-ia⁽¹³⁾

Presenta un centro metálico de Cu²⁺, acetilacetonato como ligante bidentado donador de oxígeno y 4-4'-dimetil bipiridina como ligante bidentado donador de nitrógeno con una geometría cuadrado plano.

Solubilidad

A temperatura ambiente (19-22°C) tiene una buena solubilidad en los siguientes disolventes (en listados de mayor a menor):

Agua, metanol, etanol, solución salina al 9%, soluciones fisiológicas pH=7.4.

Estabilidad

Inestable en presencia prolongada a la luz. Se descompone a pH muy ácido (pH<2) o a pH muy básico (pH>8).

Bajo condiciones de congelación y protegida de la luz es estable en plasma humano y en sangre por 72 horas, en orina por 24 horas, en metanol por 96 horas y en solución amortiguadora de fosfatos 64mM a pH= 7.4 es estable por un lapso de 10 días.

Disuelta en metanol, a temperatura ambiente y protegida de la luz, es estable por 24 horas.

En solución acuosa y en refrigeración durante 16 días, solo tuvo un 3.8% de degradación⁽¹³⁾.

DISOLUCIÓN

La disolución puede ser definida como, el paso de las moléculas o iones del estado sólido a una solución. En una disolución sólido-líquido el soluto pasa al disolvente para dar origen a una solución, existiendo una transferencia de masa, generalmente a través de un proceso de difusión^(3,5). De manera simple la disolución es el proceso durante el cual una sustancia sólida se disuelve.

El proceso de disolución conlleva en primera instancia la difusión del soluto, seguido de la mezcla del soluto con el disolvente, después las moléculas del soluto vencen las fuerzas cohesivas, que las mantiene unidas en el estado líquido y las moléculas de disolvente se separan lo suficiente para crear cavidades donde se acomodan las moléculas de soluto. Por último las moléculas de soluto se insertan en las cavidades y se produce la solvatación del soluto⁽⁴⁾.

La “velocidad de disolución” se define como la cantidad de fármaco que se disuelve por unidad de tiempo bajo condiciones estandarizadas, es un parámetro

que expresa la mayor o menor rapidez con la que un soluto se disuelve en un disolvente bajo determinadas condiciones de agitación, temperatura y pH del medio entre otros factores⁽¹⁵⁾. Es decir que la velocidad de disolución es un proceso, que evalúa los cambios de concentración del soluto en la solución con respecto al tiempo^(2, 16).

LEY DE DIFUSIÓN DE FICK

La velocidad de disolución cumple la **primera Ley de difusión de Fick**: la velocidad del cambio en la concentración del material disuelto a lo largo del tiempo es directamente proporcional a la diferencia de concentración entre ambos lados de la capa de difusión^(3,5):

$$\frac{dw}{dt} = -DS \frac{dC}{dx}_{[1]}$$

Dónde:

$\frac{dw}{dt}$ = Cantidad de soluto que difunde a través de un área en un tiempo

S = Superficie

dC = Cambio de concentración

dx = Distancia

D = Constante de difusión

TEORÍAS DE DISOLUCIÓN

Teoría de Noyes y Whitney

En 1897 Noyes y Whitney establecieron a partir de la primera Ley de Fick, la ecuación fundamental que permite estudiar la velocidad de disolución de un sólido en el seno de un líquido^(17, 15, 31).

$$\frac{dC}{dt} = K(C_s - C_t)_{[2]}$$

Dónde:

$$\frac{dC}{dt} = \text{Velocidad de disolución}$$

K = Constante de disolución que depende de las condiciones experimentales

C_s = Concentración de saturación del soluto en el disolvente (solubilidad)

C_t = Concentración del soluto en la disolución a un tiempo t

Noyes-Whitney, al presentar su teoría, sugirieron que la velocidad de disolución estaba condicionada por la difusión de las moléculas del soluto que pasan desde un estado sólido a la disolución⁽¹⁵⁾.

Teoría de Nerst y Brünner

Nerst y Brünner (1904) en su teoría de la capa estacionaria, plantean que cuando una partícula sólida se introduce en un líquido y no intervienen fuerzas químicas, se producen dos procesos^(3, 15):

- Se forma una capa estacionaria delgada de disolvente alrededor de la partícula, cuya concentración es máxima o de saturación.
- A continuación se produce la difusión del soluto disuelto desde esta capa hacia el seno del disolvente, el gradiente de concentración existe entre ambas.

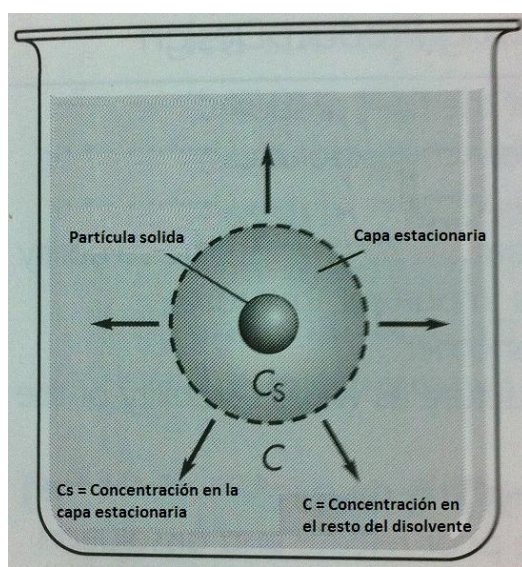


Fig. 2. Modelo de Nerst y Brünner de la "capa estacionaria"⁽³⁰⁾

Si se considera que la disolución del soluto se mide por el aumento de su concentración en la solución, la ecuación [1] se transforma en la siguiente:

$$\frac{dw}{dt} = -\frac{DS}{Vh}(C_s - C)_{[3]}$$

Se observa que sí, k = cociente del coeficiente de difusión, volumen de disolvente y grosor de la capa estacionaria (condiciones constantes para un sistema dado). La ecuación [3] es idéntica a la propuesta por Noyes-Whitney [2].

En condiciones **sink** (cuando la concentración del soluto en el medio de disolución, una vez disuelta la totalidad del mismo, corresponde a no más del 10% de la concentración de saturación), un volumen y un área superficial constantes, la ecuación de Noyes-Whitney se reduce a^(3,15):

$$\frac{dC}{dt} = K_{[3]}$$

Esta ecuación indica que en condiciones de dilución infinita, el proceso de disolución estará caracterizado por una constante de velocidad K de orden cero, es decir, el proceso es independiente de la concentración de soluto⁽³⁾.

En base a la ecuación [3], se puede observar que al graficar cantidad disuelta del fármaco contra tiempo, se obtendrá una línea recta, cuya pendiente dividida entre el área superficial constante será la **Constante de velocidad de disolución intrínseca (Fig. 3)**.

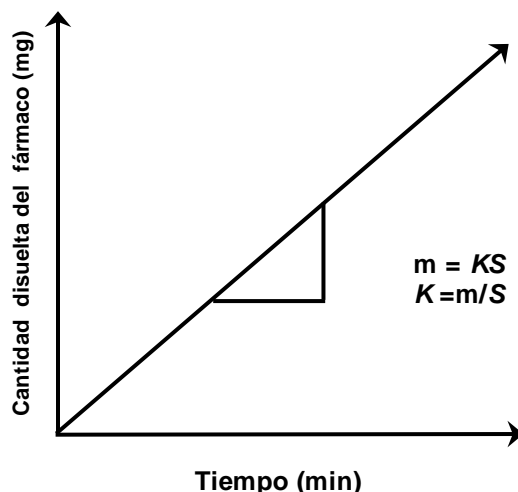


Fig. 3.
Representación
gráfica de la
ecuación [3]

Dónde:

K = Constante de velocidad de disolución intrínseca.

S = Área constante del fármaco comprimido.

m = Pendiente de la recta.

En 1972 Kaplan aseguró que si:

$K > 1 \text{ mg}/(\text{cm}^2\text{min})$: en general los fármacos con este valor no presentarán una velocidad de disolución limitante para su absorción, no deberían presentar problemas con la biodisponibilidad o la disolución^(3,5).

$K < 1 \text{ mg}/(\text{cm}^2\text{min})$: los fármacos que presentan valores inferiores a uno, tienen una velocidad de disolución lenta, que es limitante para su absorción. Es decir tienen probabilidad de presentar problemas con la biodisponibilidad y con la disolución^(3,5).

Para los fármacos con valores dentro de los límites, deberán considerarse otros factores, para establecer si potencialmente presentarán problemas de disolución⁽³⁾.

En general, la velocidad de disolución intrínseca puede ser definida como “la velocidad de disolución de sustancias puras bajo la condición de área superficial constante”^(3, 16), es decir, mide las propiedades intrínsecas del fármaco en función de los medios de disolución⁽⁵⁾.

Sin embargo la velocidad de disolución intrínseca de un fármaco se ve afectado por las propiedades en estado sólido (cristalinidad, amorfismo, polimorfismo, hidratación, solvatación, tamaño de partícula y superficie de partícula) y por factores extrínsecos como son: hidrodinámica (velocidad de rotación, aparato de prueba) y condiciones de la prueba (temperatura, viscosidad del líquido y pH)⁽¹⁶⁾.

Por lo que manteniendo un medio de disolución apropiado, temperatura constante, velocidad de agitación y pH se puede determinar la velocidad de disolución intrínseca.

MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA DISOLUCIÓN INTRÍNSECA

Para la determinación de la velocidad de disolución intrínseca, en la literatura^(3,5) se reportan diversos métodos donde se asume que se mantiene constante la superficie a partir de la cual se puede producir la disolución⁽⁵⁾, entre los más empleados se encuentran los siguientes:

Método de la tableta suspendida

Nelson E. J., diseñó una técnica conocida con el nombre de “método de la tableta suspendida”, éste fue empleado para estudiar la velocidad de disolución de ciertos compuestos sin cuantificar la cantidad disuelta. El fármaco se comprime utilizando una presión de 1000 Kg/cm². El comprimido obtenido se monta sobre una placa de aluminio que forma parte del brazo de una balanza, la cuál registra la pérdida del peso del comprimido. Para montar el comprimido sobre la placa se emplea cera de tal manera que los bordes y una cara queden cubiertos y solamente una cara esté expuesta al líquido⁽²¹⁾.

Método del disco rotatorio

Éste método fue diseñado por Eino Nelson y descrito por Levy y Sahlí⁽²²⁾, en el cual el fármaco se comprime utilizando una prensa hidráulica modificada, aplicando una fuerza de compresión de 50 000 Lb/in² y se fija a un soporte de acrílico con ayuda de parafina de tal manera que solamente una cara del comprimido queda expuesta al medio de disolución. El soporte se une a una barra de metal conectada a un motor de agitación. La tableta fijada al soporte, se sumerge en un matraz de tres bocas, conteniendo el medio de disolución a 37 °C. Dicho sistema fue modificado por Levy y Tanski⁽²³⁾ para proporcionar una mejor precisión en el control de rotación en un intervalo de 3 a 200 rpm, esta modificación es útil para determinar velocidades de disolución a bajas velocidades de agitación.

Método del disco rotatorio modificado

Dicho método modificado por Singh⁽²⁸⁾ y colaboradores se basa en el reportado por Wood⁽¹⁸⁾, fue utilizado para el desarrollo de nuevas formulaciones en el estudio de la disolución de ibuprofeno y ketoprofeno mezclado con N-metilglucamina. Las variantes al aparato de Wood fueron las dimensiones de la matriz y por lo tanto del comprimido, así como las condiciones de trabajo. El trabajo de Sing P. y sus colaboradores fue hacer un estudio de la influencia de la solubilización de micelas y factores hidrodinámicos en la disolución de fármacos usando diferentes velocidades de agitación y concentración de polisorbato 80.

Otro método muy similar empleado por Lowter N. y colaboradores⁽²⁹⁾ consistió en que se empleó el aparato número I de la USP. Se comprimó el fármaco y se pegó a la superficie inferior de este aparato dejando expuesta una sola superficie de la tableta ya que el resto se recubrió con parafina wax BP.

Método del disco estático

Este método fue descrito por Levy en 1963, es una modificación del método del disco rotatorio, en el que al igual que en el anterior, el fármaco comprimido se fija a un soporte de acrílico y se introduce en un recipiente que contiene el medio de disolución a una temperatura de 37°C, las alícuotas son retiradas a tiempos diferentes para el análisis de la cantidad disuelta. En este método no hay agitación del sistema⁽²⁴⁾.

Método del disco estático modificado^(25, 26)

Este método fue empleado para la caracterización de polimorfos y clorhidratos de algunos fármacos. Para el caso de GK-128⁽²⁶⁾, fue empleado este método, en el cual se utilizó una fuerza de compresión de 300 kg/cm² durante 3 minutos a 1 g de cada forma cristalina utilizando un punzón de 20 mm de diámetro, después de obtener la tableta, esta se recubrió con resina epóxica de forma que solo se tuviera una cara expuesta al medio de disolución. El disco fue colocado en el fondo del vaso con 500 mL de solución amortiguadora de acetatos pH 4.0 a 20,

25, 30 y 37°C. El medio de disolución se agitó a 50 rpm con paletas, a una distancia de 3 cm del fondo del vaso. Se retiraron alícuotas a diferentes intervalos de tiempo con una bomba peristáltica y se determinó la concentración por medio de un espectrofotómetro.

En el caso de la caracterización de polimorfos y clorhidratos de carbamazepina⁽²⁵⁾, el método solo varió en la velocidad de agitación que fue de 150 rpm.

Otro método empleado fue el que utilizó Viegas⁽²⁷⁾ T. y Brinker G. en el que fue empleado el sistema de disco estacionario *Distek* (Figura 4).

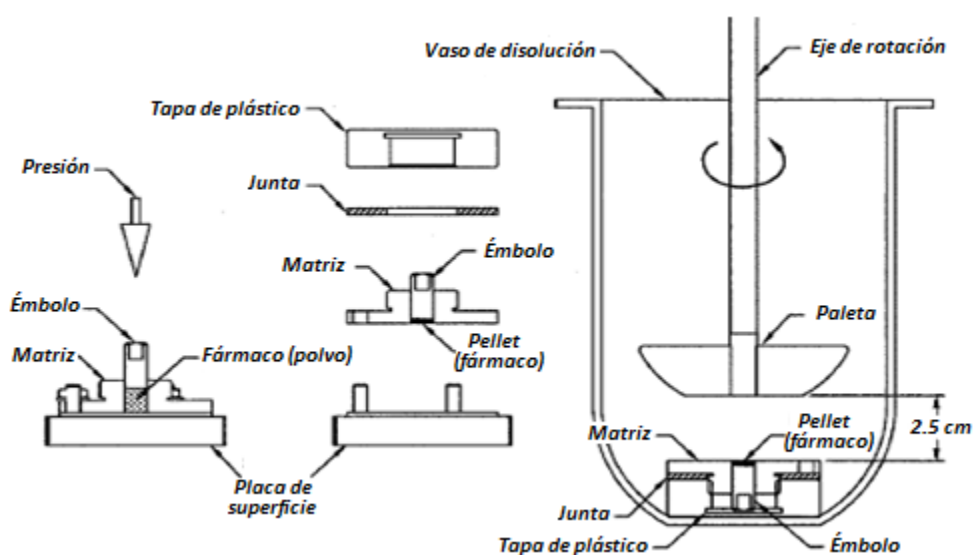


Fig. 4 Sistema de disco estacionario, *Distek inc.*

El estudio consistió en una comparación de las constantes de velocidad de disolución intrínseca de lotes de diclofenaco sódico, isoniacida, dibucaina, peldesina, ibuprofeno y acetaminofen obtenidas mediante el método anteriormente descrito y el de sistema de disco rotante de Wood, a una velocidad de rotación de 50 rpm a 37 °C en 900 mL de medio de disolución, las alícuotas fueron tomadas a diversos intervalos de tiempo y analizadas por espectrofotometría de ultravioleta visible, las conclusiones fueron que el diseño de los dos equipos permite obtener resultados que no presentan diferencias significativas unos de los otros, pero los autores refieren que las ventajas que tiene el sistema estacionario *Distek* sobre el sistema de disco rotante de Wood son que no se forman burbujas de aire en la

matriz que puedan interferir en los resultados, y que no hay cambio en la temperatura del medio de disolución porque la matriz en el sistema *Distek* se sumerge desde el principio de la prueba y con el aparato de Wood, primero el medio se equilibra a la temperatura deseada y después se baja el dispositivo provocando una mínima disminución de temperatura del medio de disolución.

Los métodos de disolución de disco rotatorio y disco estacionario son lo versátiles para permitir el estudio de las características de los compuestos de interés farmacéutico bajo una gran variedad de condiciones de prueba. Las características comunes a ambos aparatos incluyen⁽¹⁹⁾:

- 1) Adaptables al uso de aparatos de disolución estándar y ambos utilizan una matriz para contener el compacto durante la prueba.
- 2) Dependen de la comprensión del compuesto.
- 3) Una superficie única de geometría y dimensiones físicas conocidas.
- 4) Matriz en posición fija, lo cual disminuye variación de condiciones hidrodinámicas.

Dentro de estos métodos el del disco rotatorio es el más utilizado, el cual está basado en el método de Wood.

Método de Wood

En 1963 el Doctor John Wood, diseñó una técnica para la prueba de disolución intrínseca⁽⁴⁾. El llamado método de Wood, consiste en compactar con alta presión, una cantidad dada del fármaco puro, la cual se coloca en una matriz que gira a través de una flecha a determinado número de revoluciones por minuto en el medio de disolución.

Durante la prueba, el comprimido debe conservarse siempre íntegro y presentar una superficie constante de contacto con el disolvente. Dicho método ha sido altamente difundido por sus características para realizar estudios de disolución intrínseca. En la Fig. 5 se observa el diseño del aparato de Wood⁽¹⁸⁾.

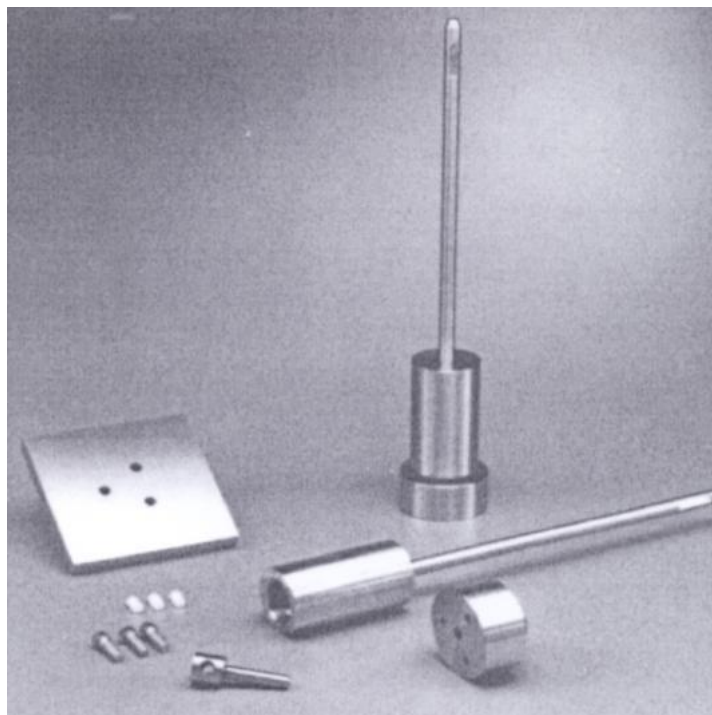


Fig. 5. Aparato de Wood⁽¹⁸⁾.

MÉTODO OFICIAL DE LA USP 30⁽¹⁹⁾

Este método para determinar la velocidad de disolución intrínseca se encuentra descrito en el Capítulo General <1087>. Este consiste como se observa en la Fig. 5 de material de acero inoxidable. Este aparato fue el empleado para el presente estudio.

Aparato

La base es una placa de acero inoxidable que tiene tres orificios con rosca, en esta placa es donde se coloca la matriz para comprimir el fármaco la cual tiene un diámetro que puede ser hasta de 1.0 cm, para este caso es de 0.8 cm de diámetro, dicho dato es importante ya que con el determinamos el área superficial del fármaco para determinar la constante de velocidad de disolución intrínseca. El punzón es introducido en la matriz y de esta manera se puede comprimir el fármaco contenido en ésta, formando una tableta en el fondo de la matriz con una sola cara expuesta al medio de disolución. Entonces la parte inferior de la matriz con la tableta formada se enrosca en otra pieza que a su vez se sujeta en la flecha

del disolutor. Al final de colocar las demás matrices con las tabletas formadas se sumergen en posición vertical las flechas con el motor de agitación encendido.

Preparación del compacto

Conectar la placa de superficie lisa a la cara inferior de la matriz. Pesar la cantidad del fármaco a ensayar, y vaciarlo dentro de la matriz, colocar el punzón dentro de la matriz y comprimir el polvo con la ayuda de una prensa hidráulica durante 1 minuto con una fuerza de compresión necesaria para formar tabletas no desintegrantes. Separar la placa de acero inoxidable y atornillar la matriz con la boquilla superior. Retirar el polvo restante con aire o nitrógeno comprimido.

Procedimiento

Colocar la matriz con la boquilla y atornillar a la flecha del disolutor. Posteriormente iniciar la prueba. La superficie inferior de la matriz debe de encontrarse a una distancia de 3.8 cm del fondo del vaso. La superficie inferior de la matriz debe de estar libre de burbujas de aire, debido a que esto influye en la disolución del fármaco al no permitir el contacto con el medio de disolución. (Se puede utilizar un disco construido en forma vertical para evitar la formación de burbujas de aire). Si es posible se deben de mantener las condiciones “sink” durante la prueba.

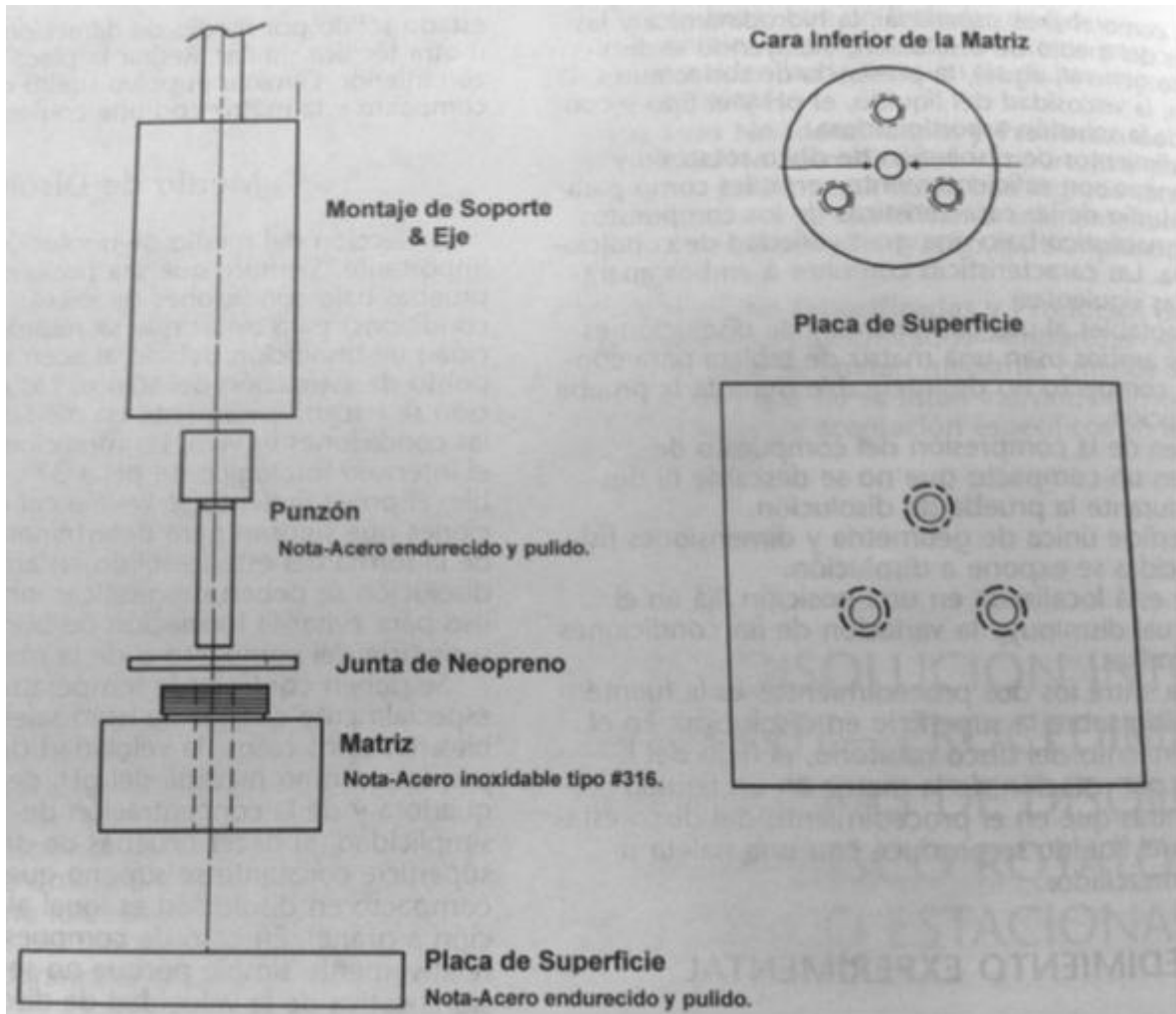


Fig. 6. Aparato para disolución intrínseca⁽¹⁹⁾.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- ❖ Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de Casiopeina® III-ia en solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.4, el cual simula un pH fisiológico, por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

- ❖ Realizar el perfil de disolución de la Casiopeina® III-ia para obtener el valor de la constante de velocidad de disolución intrínseca (K_{int}) y en base a esta definir si presentara problemas de absorción.

D E S A R R O L L O
D E S A R R O L L O

E X P E R I M E N T A L
E X P E R I M E N T A L

EQUIPOS

- Cromatógrafo de líquidos marca Shimadzu
- Bomba Shimadzu, modelo LC-10ADVP
- Detector UV-Vis Shimadzu- modelo SPD-10AVP
- Autoinyector Shimadzu- modelo SIL-10ADVP
- Integrador Shimadzu modelo SCL-10AVP
- Computadora, Compaq-presario, modelo 4102
- Software Shimadzu, Class-vp 500
- Aparato de disolución de la USP 30 (aparato de Wood)
- Disolutor Hanson Research
- Sonicador Fisher-scientific FS60
- Vortex Thermolyne modelo m37615
- Balanza analítica Sartorius A210P
- Potenciómetro Orion 410 A Plus
- Equipo de purificación de agua Milli-Q
- Sistema de filtración para disolventes (Equipo de filtración Millipore, membrana Millipore tipo HVLP 0.45 μm para filtrar disolventes orgánicos y tipo HA 0.45 μm para filtrar solventes acuosos)
- Columna XTerra RP₁₈ 5 μm 4.6x150mm Waters[®]. No. serie 186000492, Lote T92704

MATERIALES

- 1 probeta de 1000 mL
- 1 espátula metálica (Cromo-Níquel)
- 1 gradilla
- 6 jeringas de plástico 10 mL provistas de muestreadores de plástico y filtros de teflón 0.35 μm
- 3 mangueras de hule delgadas de 8 cm
- 36 tubos de ensayo de 13x100 cm
- 1 cronómetro

- 1 termómetro
- 1 parrilla de calentamiento
- 2 naves de pesado
- 1 matraz Erlenmeyer de 4000 mL
- 1 matraz volumétrico de 100 mL
- 18 matraz volumétricos de 10 mL
- Micropipetas de 200, 1000 y 5000 μL
- Viales para equipo cromatográfico color ámbar con tapones y capacidad de 1.5 mL

REACTIVOS

- Estándar Casiopeina[®] III-ia (2.0g) Lote: 206MBG290609
- Metanol grado HPLC Tecnolab Lote: MET C-5 06-09-10 4L BT 29
- Agua Desionizada
- Fosfato monobásico de sodio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), J.T. Baker. Lote: K15460
- Fosfato dibásico de sodio anhidro (Na_2HPO_4), J.T. Baker. Lote: H34C14
- Solución reguladora (biftalato) pH 4, grado RA, J.T. Baker. Lote: H39C19
- Solución reguladora (fostatos) pH 7, grado RA, J.T. Baker. Lote: H43C08
- Solución reguladora (boratos) pH 10, grado RA, J.T. Baker. Lote: H44C20
- Ácido fosfórico J.T. Baker. Lote: 38362
- Hidróxido de sodio (escamas) J.T. Baker. Lote: B13C54

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH 7.7 \pm 0.05

Pesar por separado, en naves de pesado, 1.2543 g de Fosfato dibásico de sodio anhidro (Na_2HPO_4) y 0.1607 g de Fosfato monobásico de sodio monohidratado

($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), transferir a un matraz volumétrico de 1000 mL. Disolver con agua desionizada hasta un volumen aproximado de 900 mL, ajustar el pH utilizando NaOH 0.01 M o ácido fosfórico 0.01 M, una vez ajustado llevar a volumen con agua desionizada.

Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH 7.4 \pm 0.05

Pesar por separado, en naves de pesado, 0.7581 g de Fosfato dibásico de sodio anhidro (Na_2HPO_4) y 0.2037 g Fosfato monobásico de sodio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), transferir a un matraz volumétrico de 1000 mL. Disolver con agua desionizada hasta un volumen aproximado de 900 mL, ajustar el pH utilizando NaOH 0.01 M o ácido fosfórico 0.01 M, una vez ajustado llevar a volumen con agua desionizada. Desgasificar por medio de un sistema de vacío.

Solución Stock de Casiopeina[®] III-ia

Pesar con exactitud 0.010 g de Casiopeina[®] III-ia y colocar en un matraz volumétrico de 100 mL y aforar con agua desionizada. Concentración (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

En la tabla 1 se muestran las alícuotas empleadas para la preparación de la curva de calibración de Casiopeina[®] III-ia en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4.

Tabla 1. Curva de calibración de Casiopeina[®] III-ia en medio de disolución.

Stock:		100 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	
Punto	Concentración [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Cantidad de Stock (μL)	Aforo (mL)
1	2	200	10
2	6	600	10
3	10	1000	10
4	14	1400	10
5	18	1800	10
6	25	2500	10

METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE CASIOPEINA[®] III-ia POR HPLC EN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS PH 7.4

Se toman como base las condiciones cromatográficas reportadas por Huerta Palacios (2008).

Fase móvil: Metanol HPLC: Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH 8.0 (40:60).

Fase estacionaria: Columna Xterra RP 18[®] 5 µm 4.6 x 150 mm Waters[®]

Velocidad de flujo: 1 mL/min.

Longitud de onda: 296 nm

Volumen de inyección: 20 µL

Tiempo de corrida: 4.5 minutos

Se probaron distintas condiciones, variando velocidad de flujo, la proporción y pH de la solución amortiguadora de fosfatos con el fin de optimizarlo. Obteniéndose como condiciones óptimas las siguientes:

Fase móvil: Metanol HPLC: Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH 7.7 (40:60). (Sonicado por 30 min)

Fase estacionaria: Columna Xterra RP 18[®] 5 µm 4.6 x 250 mm Waters[®]

Velocidad de flujo: 0.8 mL/min.

Longitud de onda: 296nm

Volumen de inyección: 20 µL

Tiempo de corrida: 4.5 minutos

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE CASIOPEINA® III-ia POR HPLC EN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS PH 7.4

La validación del método analítico se realizó de acuerdo a los criterios que se describen en la NOM-177-SSA1-1998⁽²⁰⁾, 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. Los parámetros se establecen en el apartado correspondiente a la validación de métodos analíticos para perfiles de disolución.

VALIDACIÓN DEL SISTEMA

Para realizar la validación del sistema se realizaron 2 curvas del analito en el medio de disolución, las cuales se preparan y se cuantifican el mismo día de trabajo, en el intervalo de concentraciones establecido anteriormente (Tabla 1). Con estos datos se evalúa:

Linealidad

Se entiende por “linealidad” a la capacidad que tiene un método analítico de obtener una respuesta directamente proporcional a la concentración del analito en una muestra tomada en el intervalo de trabajo. Se calcula pendiente (m), intercepto (b) y coeficiente de correlación (r); error relativo debido a la regresión (EER%). Criterio de aceptación el valor de r debe ser mayor a 0.99 (utilizar no menos de 4 decimales), error relativo no mayor al 2%.

Calcular el EER% mediante la siguiente ecuación:

$$EER\% = \left(\frac{S_{y/x}}{\bar{y}} \right) \times 100$$

En donde:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - (\text{pendiente} \times \sum xy) - (\text{ordenada} \times \sum y)}{n - 2}}$$

$S_{y/x}$ = Desviación estándar de la regresión

\bar{y} = Valor promedio de la respuesta

x = Concentración

y = Respuesta

$n - 2$ = Grados de libertad

Precisión (Repetibilidad)

La “precisión” es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto. Para evaluarla se calcula el factor de respuesta (dividiendo la respuesta obtenida para cada uno de los puntos de la curva entre su concentración correspondiente), promedio (\bar{X}), desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV%). Criterio de aceptación, coeficiente de variación (CV%) del factor de respuesta no es mayor al 2%.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Linealidad

Se realizan 3 curvas de la Casiopeina[®] III-ia en la misma solución de medio de disolución en el intervalo de concentraciones establecido en la Tabla 1, esto se realiza en dos días de trabajo. Con estos datos se calcula coeficiente de correlación (r), pendiente (m), e intercepto (b); error relativo debido a la regresión (EER%). Criterio de aceptación valor de r mayor a 0.99 (utilizar no menos de 4 decimales), EER% no mayor al 3%.

Precisión

Se evalúa como:

Repetibilidad

Expresa la variación de un mismo analista, obtenida de determinaciones independientes y realizadas bajo las mismas condiciones. De la respuesta

obtenida de las 3 curvas de linealidad del método realizadas el mismo día de trabajo se obtiene promedio (\bar{X}), desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV%), para cada una de las concentraciones de la curva. Criterio de aceptación CV% no mayor al 3%.

Reproducibilidad

Expresa la variación de determinaciones independientes realizadas en diferentes condiciones de análisis, ya sean diferentes días de análisis, equipos o analistas. De las respuestas obtenidas de las 6 curvas de linealidad del método en los dos días de trabajo se obtienen promedio (\bar{X}), desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV%), para cada una de las concentraciones. Criterio de aceptación CV% no mayor al 3%.

Exactitud

Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor nominal. Se evalúa por medio del cálculo de la desviación estándar absoluta (DEA%) a partir de los datos obtenidos de 3 curvas de calibración en el mismo día de trabajo. Criterio de aceptación el promedio de los datos de linealidad expresados en concentración no deben variar con respecto a la cantidad nominal en más de 3% en cada punto.

Cálculo DEA%:

$$DEA\% = \left(\frac{(\text{Concentración nominal}) - (\text{Concentración experimental})}{(\text{Concentración nominal})} \right) \times 100$$

ESTABILIDAD

Las concentraciones a elegir para la prueba de estabilidad serán las de 6 µg/mL (concentración baja) y 18 µg/mL (concentración alta), preparadas en medio de disolución, estos valores se consideraran como el valor del 100% en el día cero; Las temperaturas con las que se trabajara será temperatura ambiente y 4° C

(refrigeración) siendo intervalos de muestreo periódicos, para evaluar la estabilidad, a las 2, 4, 6 y 24 h para cada temperatura, también se realizó una determinación a 37°C realizando el muestreo a las 2 h, todas las muestras se analizaron por duplicado. Criterio de aceptación el coeficiente de variación (CV%) y desviación estándar absoluta (DEA%) de las muestras evaluadas bajo las diferentes condiciones establecidas debe ser menor al 2%.

INFLUENCIA DEL FILTRO

Se prepararon 50 mL de una solución de 10 µg/mL y 18 µg/mL, para ello se tomaron, directo de la solución stock de 100 µg/mL, alícuotas de 5 mL y 9 mL respectivamente y se llevaron a un matraz aforado de 50 mL con el medio de disolución correspondiente. Posteriormente cada solución se trató de la siguiente manera: se separaron 3 mL, considerando estos como una alícuota sin filtrar, mediante un muestreador con filtro de teflón de 0.35 µm se filtró la solución 6 veces en porciones de 3 mL cada una. Estas alícuotas (sin filtrar y filtradas) se analizaron mediante HPLC. Se compararon las respuestas obtenidas, y se determina el porcentaje retenido en ambas concentraciones. Criterio de aceptación el filtro no ejerce influencia si el porcentaje retenido no es mayor al 2.0%.

Se calcula el promedio y el porcentaje retenido según la siguiente ecuación:

$$\% \text{Retenido} = 100 \times \left(\frac{100 \times (R_{\text{Promedio}})}{R_{\text{sin filtrar}}} \right)$$

Dónde:

R_{Promedio} : es la respuesta promedio de las muestras filtradas

$R_{\text{sin filtrar}}$: es la respuesta de la solución sin filtrar

PERFIL DE DISOLUCIÓN INTRÍNSECA**Preparación de las tabletas**

Se realizaron pruebas de compactación con el aparato de Wood y la ayuda de una prensa hidráulica para conocer la cantidad mínima de Casiopeina® III-ia con la que se podía trabajar.

Se determinó que la cantidad óptima con la que podía obtenerse una tableta no desintegrante era de 200 mg, usando una presión de 3500 lb/pulg² durante 1 minuto.

Debido a la cantidad de materia prima con que se contaba el perfil se realizó solo con tres vasos del disolutor Hanson Research, bajo las siguientes condiciones:

1. Medio de disolución: solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4
2. Temperatura del medio: 37°C ± 0.5
3. Velocidad de agitación: 75 rpm
4. Volumen de medio de disolución: 900 mL
5. Tiempos de muestreo: 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos.

Se tomaron muestras de forma manual de 3 mL de cada vaso del disolutor, sin reposición del volumen retirado. Dichas muestras se diluyeron 1:5 utilizando el medio de disolución de trabajo, se tomo 1 mL y se deposito en un vial, las muestras se analizaron mediante HPLC (296 nm) contra una curva de calibración preparada en el medio de disolución de trabajo.

Ecuaciones para el cálculo de la constante de velocidad de disolución intrínseca

De los valores de área obtenidos en los cromatogramas presentados por el HPLC para cada tiempo de muestreo y los valores de la curva patrón preparada el mismo día del análisis se realizan los siguientes cálculos:

Para obtener los miligramos de Casiopeina[®] III-ia disueltos en el volumen de la muestra tomada al *i*-ésimo tiempo de muestreo, se utilizó la siguiente ecuación:

$$Ei = (Xi)(Fd)(v)$$

$$Xi = \frac{(Yi - A)}{B}$$

Donde:

Ei = Miligramos disueltos en el volumen de la muestra tomada al *i*-ésimo tiempo de muestreo

Xi = Concentración al *i*-ésimo tiempo de muestreo

Fd = Factor de dilución de la muestra

v = Volumen de muestra tomada

Yi = Respuesta (área) de la muestra al *i*-ésimo tiempo de muestreo

A = Ordenada al origen de la curva patrón

B = Pendiente de la curva patrón

Con los datos obtenidos anteriormente se calcula la cantidad disuelta en miligramos

$$Di = \frac{(Xi)(Fd)(Vi)}{1000} + \sum_{i=0}^{N=1} Ei$$

$$Vi = V_0 - [(N - 1)v]$$

Donde:

Di = Miligramos disueltos al *i*-ésimo tiempo de muestreo

Vi = Volumen del medio de disolución al *i*-ésimo tiempo de muestreo

N = Número de extracciones al *i*-ésimo tiempo de muestreo

V₀ = Volumen inicial del medio de disolución

v = Volumen de muestra tomada

Obtenida la cantidad disuelta en miligramos se graficaron los datos contra el tiempo de los muestreos realizados para obtener la ecuación de la recta. De la

ecuación se toma el valor de la pendiente y se divide entre el área superficial de la tableta, resultando la ecuación:

$$K_{int} = \frac{m}{A_s}$$

K_{int} = Constante de disolución intrínseca

m = Pendiente de la ecuación de la recta

A_s = Área superficial de la tableta

Secuencia de análisis en HPLC para el Perfil de Disolución de Casiopeina®

III-ia

- Blanco del Medio de disolución
- Cinco puntos de adecuabilidad [14 µg/mL]
- Blanco del Medio de disolución
- Seis puntos de curva de calibración
- Blanco del Medio de disolución
- Tres muestras del primer tiempo de muestro (10 min)
- Blanco del Medio de disolución
- Tres muestras del segundo tiempo de muestro (20 min)
- Blanco del Medio de disolución
- Tres muestras del tercer tiempo de muestro (30 min)
- Blanco del Medio de disolución
- Tres muestras del cuarto tiempo de muestro (40 min)
- Blanco del Medio de disolución
- Tres muestras del quinto tiempo de muestro (50 min)
- Blanco del Medio de disolución
- Tres muestras del sexto tiempo de muestro (60 min)

NOTA: Los puntos de adecuabilidad son tomados como criterio de aceptación de la corrida analítica, el día que se realiza el perfil de disolución. De la respuesta obtenida en cada punto se calcula promedio (\bar{X}), desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV%). Criterio de aceptación valor de CV% menor al 2%.

R E S U L T A D O S Y
R E S U L T A D O S Y

A N Á L I S I S D E
A N Á L I S I S D E

R E S U L T A D O S
R E S U L T A D O S

VALIDACIÓN DEL SISTEMA

Linealidad

En la Tabla 2 se presentan los datos obtenidos para linealidad del sistema y en la figura 7 se presenta la relación entre la respuesta promedio (Área) y la concentración nominal.

Tabla 2. Linealidad del sistema.

Conc. [$\mu\text{g/mL}$]	Área Curva 1	Área Curva 2	Promedio
2	32061	32277	32169
6	97519	97756	97638
10	166295	164162	165229
14	229090	230617	229854
18	294218	294430	294324
25	413235	415226	414231
Pendiente	16520.9209	16606.8719	16563.8964
Intercepto	-1108.5108	-1841.2326	-1474.8717
Correlación	0.9999	0.9999	0.9999
EER%	0.85	0.82	0.77

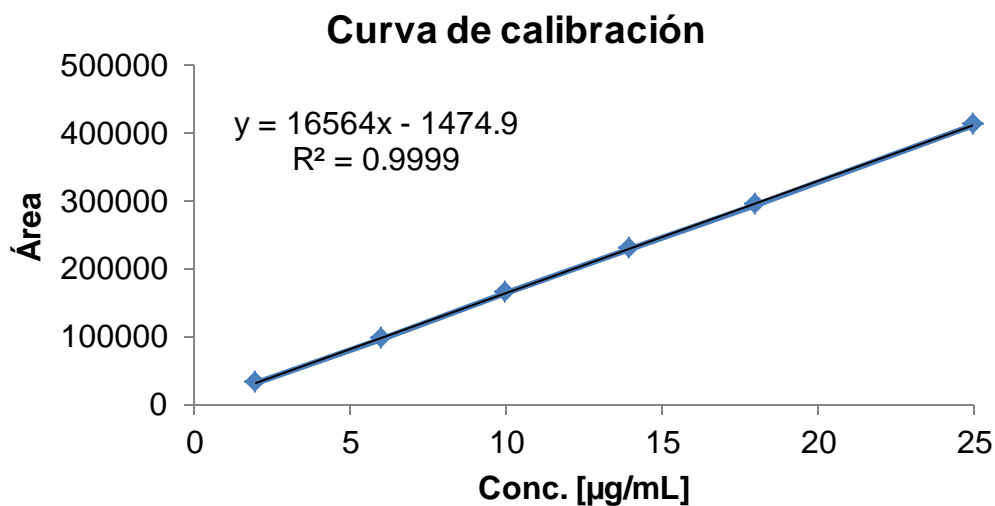


Figura 7. Curva de calibración promedio del sistema.

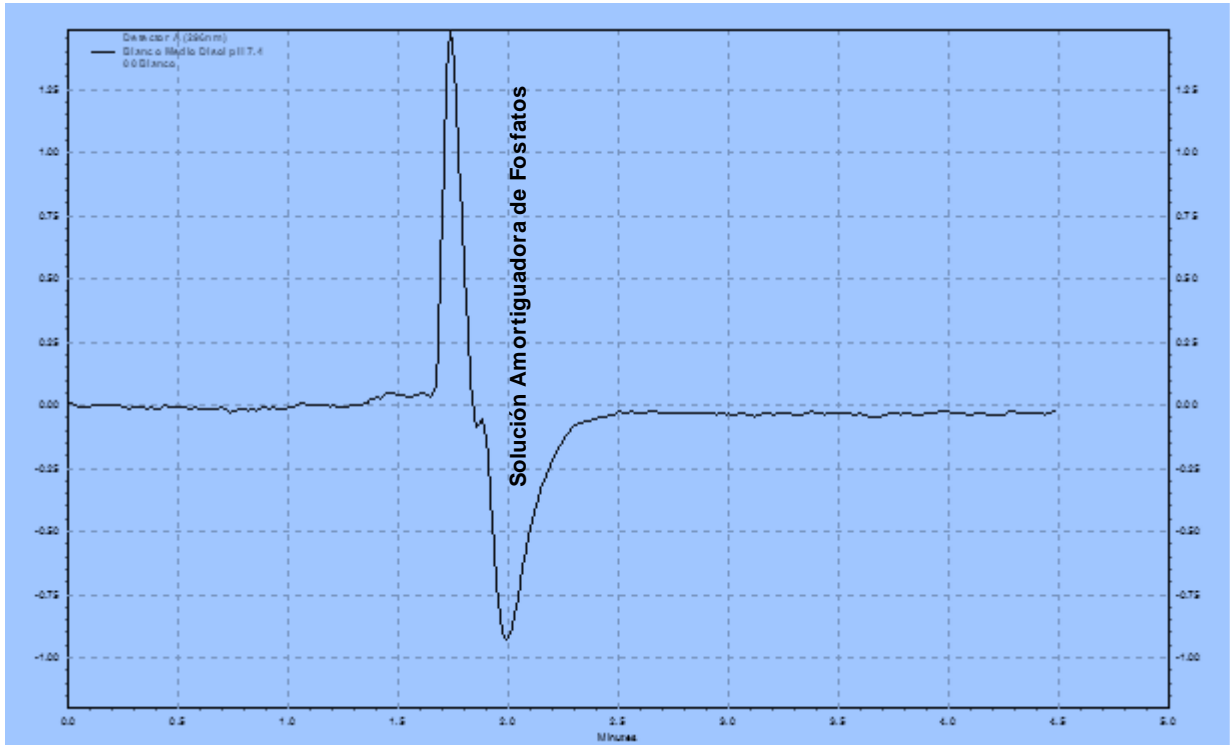


Figura 8. Cromatograma: Blanco del sistema.

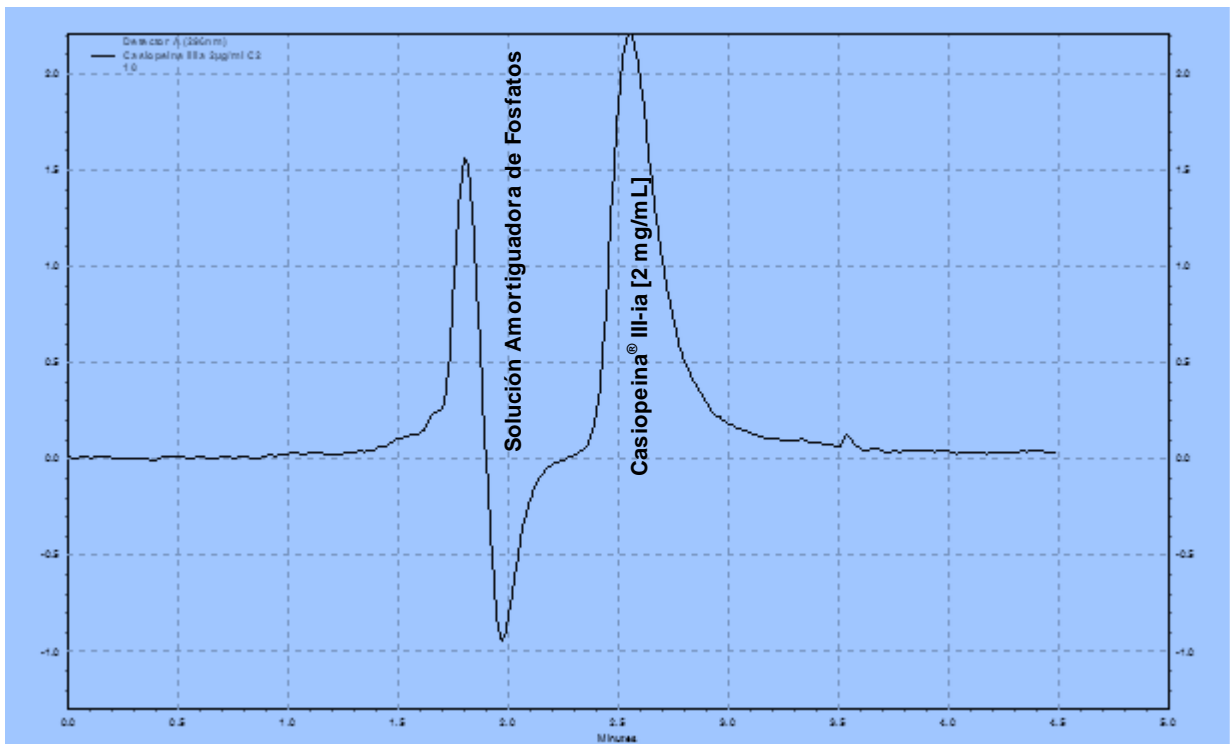


Figura 9. Cromatograma: Casiopeina® III-ia 2 µg/mL.

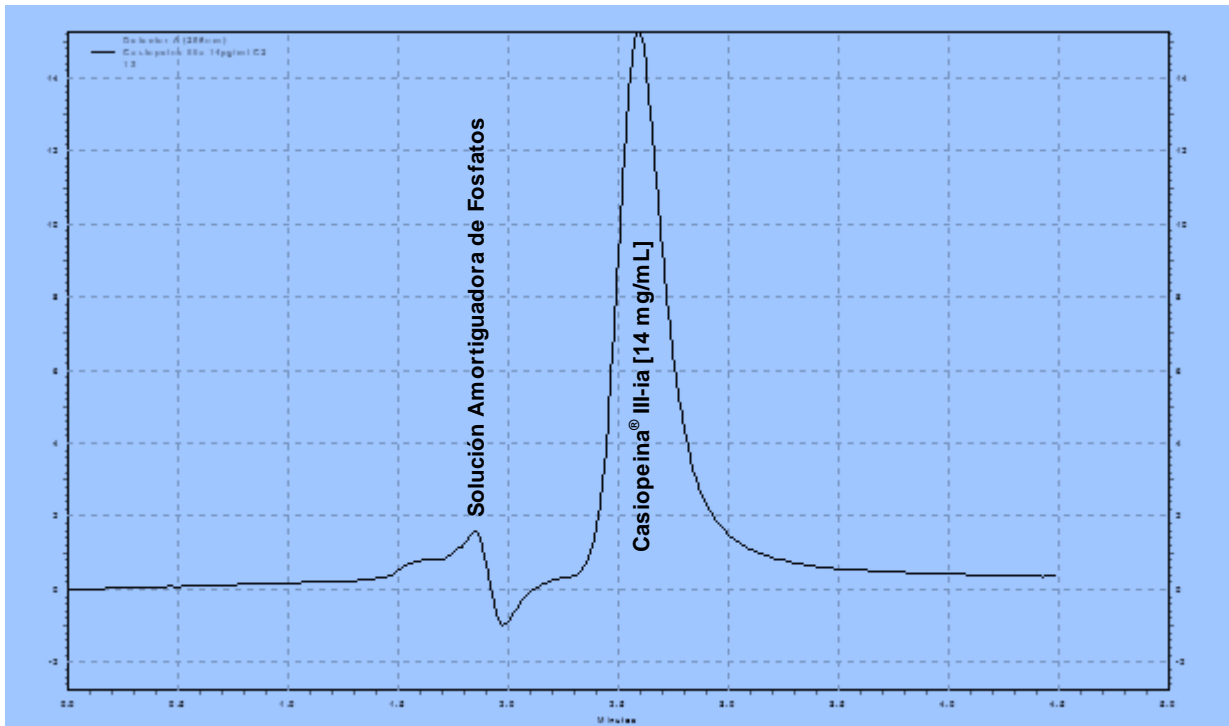


Figura 10. Cromatograma: Casiopeina® III-ia 14 µg/mL.

Precisión (Repetibilidad)

En la tabla 3 se presentan los datos obtenidos del factor respuesta para evaluar la precisión del sistema.

Tabla 3. Precisión del sistema.

Conc. [µg/mL]	Área		Factor Respuesta	
	Curva 1	Curva 2	Curva 1	Curva 2
2	32061	32277	16030.50	16138.50
6	97519	97756	16253.17	16292.67
10	166295	164162	16629.50	16416.20
14	229090	230617	16363.57	16472.64
18	294218	294430	16345.44	16357.22
25	413235	415226	16529.40	16609.04
			PROMEDIO	16369.82
			DE	178.8470
			%CV	1.09

Como se puede observar en la tabla 2 y 3, y la figura 7 el sistema es lineal y preciso en el rango de concentraciones utilizadas, ya que el valor obtenido para el coeficiente de correlación es mayor a 0.99, un valor de error relativo menor al 2% y un valor de CV% menor al 2%. Por lo que el sistema cumple con los criterios planteados en la NOM-177-SSA1-1998⁽²⁰⁾.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Linealidad

En la tabla 4 se presentan los datos obtenidos para linealidad del método del Día 1 y en la figura 11 se muestra la relación entre la respuesta promedio (Área) y la concentración nominal.

Tabla 4. Linealidad del método Día 1.

Conc. [µg/mL]	Área Curva 1	Área Curva 2	Área Curva 3	Promedio
2	32154	32061	32213	32143
6	97876	97519	97457	97617
10	166409	166295	166447	166384
14	229747	229090	228585	229141
18	295514	294218	293235	294322
25	412490	413235	412358	412694
PENDIENTE	16507.1626	16520.9209	16467.1094	16498.3976
INTERCEPTO	-641.1990	-1108.5108	-789.7002	-846.4700
CORRELACION	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999
EER%	0.59	0.85	0.98	0.80

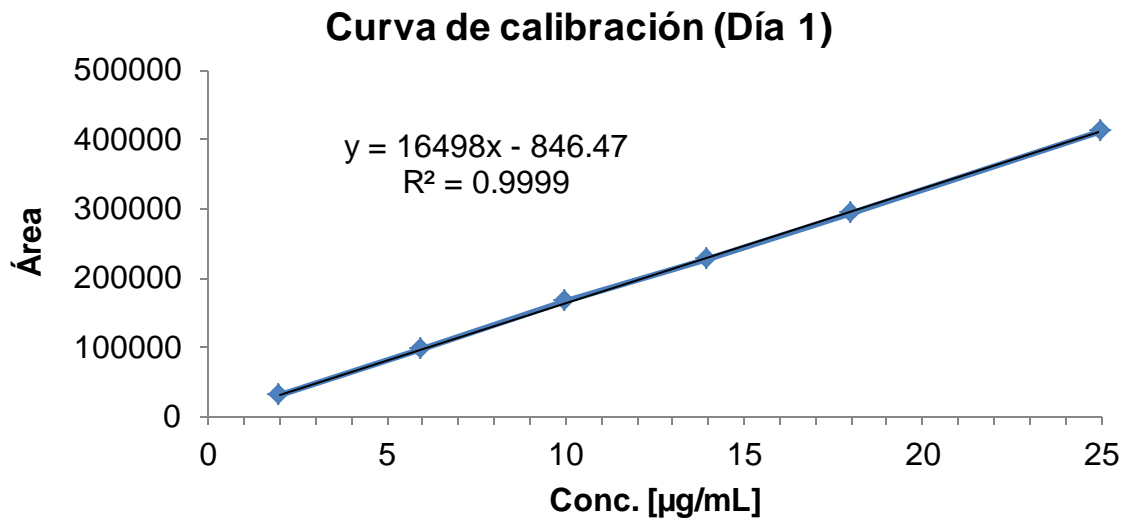


Figura 11. Curva de calibración promedio del método Día 1.

En la tabla 5 se presentan los datos obtenidos para linealidad del método del Día 2 y en la figura 12 se muestra la relación entre la respuesta promedio (Área) y la concentración nominal.

Tabla 5. Linealidad del método Día 2.

Conc. [µg/mL]	Área Curva 1	Área Curva 2	Área Curva 3	Promedio
2	32277	32226	32239	32247
6	97756	96728	97036	97173
10	164162	163120	165613	164298
14	230617	230826	230190	230544
18	294430	293505	294223	294053
25	415226	413450	415073	414583
PENDIENTE	16606.8719	16557.5151	16600.4259	16588.2710
INTERCEPTO	-1841.2326	-1993.1055	-1776.3237	-1870.2206
CORRELACION	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999
EER%	0.82	0.83	0.93	0.82

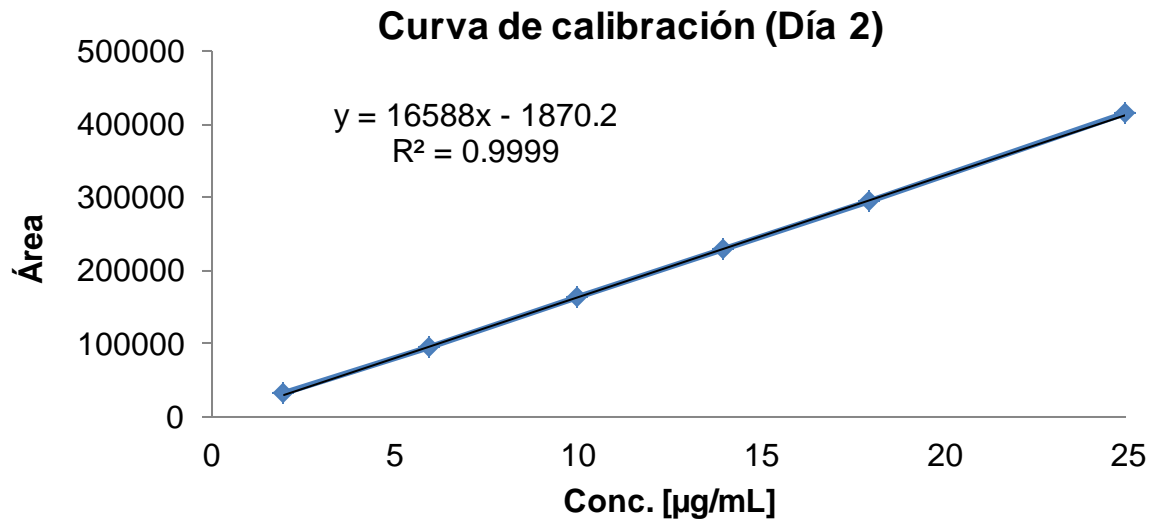


Figura 12. Curva de calibración promedio del método Día 2.

Como se puede observar en las tablas 4 y 5, y en las figuras 11 y 12 el método es lineal, ya que en ambos días se obtuvieron valores del coeficiente de correlación mayores a 0.99 y valores de error relativo menores al 3%.

Precisión

Repetibilidad

En la tabla 6 se presentan los datos obtenidos para la repetibilidad del método en el Día 1 de trabajo.

Tabla 6. Repetibilidad del método Día 1.

Conc. [µg/mL]	Área Curva 1	Área Curva 2	Área Curva 3	Área Promedio	DE	CV%
2	32154	32061	32213	32143	76.6312	0.24
6	97876	97519	97457	97617	226.1467	0.23
10	166409	166295	166447	166384	79.1033	0.05
14	229747	229090	228585	229141	582.6546	0.25
18	295514	294218	293235	294322	1143.0767	0.39
25	412490	413235	412358	412694	472.8597	0.11

En la tabla 7 se presentan los datos obtenidos para la repetibilidad del método en el Día 2 de trabajo.

Tabla 7. Repetibilidad del método Día 2.

Conc. [µg/mL]	Área Curva 1	Área Curva 2	Área Curva 3	Área Promedio	DE	CV%
2	32277	32226	32239	32247	26.5016	0.08
6	97756	96728	97036	97173	527.5806	0.54
10	164162	163120	165613	164298	1252.0792	0.76
14	230617	230826	230190	230544	324.1671	0.14
18	294430	293505	294223	294053	485.4548	0.17
25	415226	413450	415073	414583	984.1844	0.24

Reproducibilidad

En la tabla 8 se presentan los datos obtenidos para la reproducibilidad del método del Día 1 y Día 2 de trabajo.

Tabla 8. Reproducibilidad del método Día 1 y Día 2.

Conc. [µg/mL]	DÍA 1			DÍA 2			Promedio	DE	CV%
	Curva 1 Área	Curva 2 Área	Curva 3 Área	Curva 1 Área	Curva 2 Área	Curva 3 Área			
2	32154	32061	32213	32277	32226	32239	32195	26.5016	0.08
6	97876	97519	97457	97756	96728	97036	97395	527.5806	0.54
10	166409	166295	166447	164162	163120	165613	165341	1252.0792	0.76
14	229747	229090	228585	230617	230826	230190	229843	324.1671	0.14
18	295514	294218	293235	294430	293505	294223	294188	485.4548	0.17
25	412490	413235	412358	415226	413450	415073	413639	984.1844	0.24

Como se puede observar en las tablas 6, 7 y 8, el método es preciso en el rango de concentraciones evaluado, dado que, los coeficientes de variación obtenidos para la repetibilidad y reproducibilidad son menores al 3%.

Exactitud

En la tabla 9 se presentan los datos obtenidos para la exactitud del método en el Día 1 de trabajo.

Tabla 9. Exactitud del método en el Día 1.

Conc. [µg/mL]	Conc. E. [µg/mL] Curva 1	Conc. E. [µg/mL] Curva 2	Conc. E. [µg/mL] Curva 3	Promedio	DEA%
2	1.9867	2.0077	2.0042	1.9995	0.02
6	5.9681	5.9699	5.9662	5.9681	0.53
10	10.1199	10.1328	10.1558	10.1362	1.36
14	13.9569	13.9338	13.9293	13.9400	0.43
18	17.9410	17.8759	17.8553	17.8907	0.61
25	25.0274	25.0799	25.0893	25.0655	0.26
				Promedio	0.54
				CV	0.85

En la tabla 10 se presentan los datos obtenidos para la exactitud del método en el Día 2 de trabajo.

Tabla 10. Exactitud del método en el Día 2.

Conc. [µg/mL]	Conc. E. [µg/mL] Curva 1	Conc. E. [µg/mL] Curva 2	Conc. E. [µg/mL] Curva 3	Promedio	DEA%
2	2.0545	2.0667	2.0491	2.0567	2.84
6	5.9974	5.9623	5.9524	5.9707	0.49
10	9.9961	9.9721	10.0834	10.0172	0.17
14	13.9977	14.0612	13.9735	14.0108	0.08
18	17.8403	17.8468	17.8308	17.8393	0.89
25	25.1141	25.0909	25.1108	25.1053	0.42
				Promedio	0.81
				CV	1.27

Como se puede observar en las tablas 9, 10 y 11 (pág. 42) los valores obtenidos que corresponden a las concentraciones experimentales son muy cercanos a los valores de concentración nominal y los valores de DEA% se encuentra por debajo del 3%, por lo tanto se demuestra que el método es exacto en el rango de

concentraciones establecido. Por lo que el método cumple con los parámetros planteados en la NOM-177-SSA1-1998⁽²⁰⁾.

Tabla 11. Exactitud del método Día 1 y Día 2

Conc. [µg/mL]	DÍA 1			DÍA 2			Conc. E. Promedio [µg/mL]	DEA%
	Conc. E. CURVA 1 [µg/mL]	Conc. E. CURVA 2 [µg/mL]	Conc. E. CURVA 3 [µg/mL]	Conc. E. CURVA 1 [µg/mL]	Conc. E. CURVA 2 [µg/mL]	Conc. E. CURVA 3 [µg/mL]		
2	1.9867	2.0077	2.0042	2.0545	2.0667	2.0491	2.0281	1.41
6	5.9681	5.9699	5.9662	5.9974	5.9623	5.9524	5.9694	0.51
10	10.1199	10.1328	10.1558	9.9961	9.9721	10.0834	10.0767	0.77
14	13.9569	13.9338	13.9293	13.9977	14.0612	13.9735	13.9754	0.18
18	17.9410	17.8759	17.8553	17.8403	17.8468	17.8308	17.8650	0.75
25	25.0274	25.0799	25.0893	25.1141	25.0909	25.1108	25.0854	0.34
							Promedio	0.66
							CV	0.66

ESTABILIDAD

En las tablas 12 y 13 se presentan las áreas promedio, el porcentaje de recobro y el DEA% obtenidos de la prueba de estabilidad a Temperatura Ambiente.

Tabla 12. Estabilidad de las muestras a Temperatura Ambiente (2, 4 y 6 h).

Temperatura Ambiente						
Tiempo (h)	Promedio de Área		%Recobro		DEA%	
	6 [µg/mL]	18 [µg/mL]	6 [µg/mL]	18 [µg/mL]	6 [µg/mL]	18 [µg/mL]
0	96645	296600	100	100	-	-
2	96452	295730	99.80	99.71	0.20	0.29
4	96010	296839	99.34	100.08	0.66	0.08
6	95959	295242	99.29	99.54	0.71	0.46
Promedio	96266	296103				
DE	335.5164	745.9121				
CV%	0.35	0.25				

Tabla 13. Estabilidad de las muestras a Temperatura Ambiente (24 h).

Temperatura Ambiente						
Tiempo (h)	Promedio de Área		%Recobro		DEA%	
	6 [µg/mL]	18 [µg/mL]	6 [µg/mL]	18 [µg/mL]	6 [µg/mL]	18 [µg/mL]
0	96645	296600	100	100	-	-
24	86188	275446	89.18	92.87	10.82	7.13
Promedio	91416	286023				
DE	7394.2156	14958.1368				
CV%	8.09	5.23				

En las tablas 14 y 15 se presentan las áreas promedio, el porcentaje de recobro y el DEA% obtenidos de la prueba de estabilidad en Refrigeración 4°C.

Tabla 14. Estabilidad de las muestras en Refrigeración 4°C (2, 4 y 6 h).

Refrigeración 4°C						
Tiempo (h)	Promedio de Área		%Recobro		DEA%	
	6 [µg/mL]	18 [µg/mL]	6 [µg/mL]	18 [µg/mL]	6 [µg/mL]	18 [µg/mL]
0	96645	296600	100	100	-	-
2	96223	299355	99.56	100.93	0.44	0.93
4	96625	299504	99.98	100.98	0.18	0.98
6	96506	298879	99.86	100.77	0.52	0.77
Promedio	96499	298584				
DE	194.4349	1349.5464				
CV%	0.20	0.45				

Tabla 15. Estabilidad de las muestras en Refrigeración 4°C (24 h)

Refrigeración 4°C						
Tiempo (h)	Promedio de Área		%Recobro		%DEA	
	6 [µg/mL]	18 [µg/mL]	6 [µg/mL]	18 [µg/mL]	6 [µg/mL]	18 [µg/mL]
0	96645	296600	100	100	-	-
24	96314	296790	99.66	100.06	0.37	0.06
Promedio	96479	296695				
DE	234.0523	134.3503				
CV%	0.24	0.05				

En las tabla 16 se presentan las áreas promedio, el porciento de recobro y el DEA% obtenidos de la prueba de estabilidad en Baño a 37°C.

Tabla 16. Estabilidad de las muestras en Baño a 37°C (2 h).

Baño a 37°C						
Tiempo (h)	Promedio de Área		%Recobro		%DEA	
	6 [µg/mL]	18 [µg/mL]	6 [µg/mL]	18 [µg/mL]	6 [µg/mL]	18 [µg/mL]
0	96645	296600	100	100	-	-
2	93836	292972	97.09	98.78	2.91	1.22
Promedio	95240	294786				
DE	1985.9094	2565.3834				
CV%	2.09	0.87				

Como se puede apreciar en la tabla 12 y 14 la muestra se mantiene estable a temperatura ambiente y en refrigeración durante 6 h, que es el tiempo en que se lleva acabo el análisis desde que se toma la primera muestra en el perfil de disolución hasta la última muestra que se analiza en el cromatografo, ya que se obtuvieron valores de CV% y DEA% menores al 2%.

En la tabla 15 se puede observar que la muestra al ser almacenada en refrigeración durante 24 h permanece estable, al contrario de lo que se puede apreciar en la tabla 13 en donde la muestra a temperatura ambiente presenta un CV% y DEA% mayor al 2%.

Para la determinación en Baño a 37°C se puede observar que la muestra se mantiene estable durante el tiempo que se lleva a cabo el perfil de disolución, ya que comienza a presentar cierto grado de degradación, a concentración baja, hasta las dos horas de permanecer en la solución amortiguadora de fosfatos a 37°C.

INFLUENCIA DEL FILTRO

En la tabla 17 se presentan los datos promedio obtenidos de la determinación de la influencia del filtro.

Tabla 17. Evaluación de la Influencia del filtro.

Muestra	6 [µg/mL]	18 [µg/mL]
Sin Filtrar	103124	297936
Área Promedio Filtrado	102476	293323
DE	254.4442	813.3958
CV%	0.25	0.28
%retenido	0.63	1.55

Como se puede observar en la tabla 17 el uso de un filtro de teflón de 0.35 µm para realizar la toma de la muestra en el perfil de disolución, no afecta la determinación de Casiopeina® III-ia, ya que se presenta, en cada caso, un porcentaje retenido menor al 2.0%.

PERFIL DE DISOLUCIÓN INTRÍNSECA

La tabla 18 muestra las respuestas obtenidas para la adecuabilidad, criterio de aceptación de la corrida analítica, el día en que se realizó el perfil de disolución.

Tabla 18. Adecuabilidad

Adecuabilidad	
Conc.µg/ml	Area
14	229345
14	229467
14	229256
14	229367
14	229188
PROMEDIO	229324.6
DESVEST	107.0715
CV%	0.05

En la tabla 19 se presenta la cantidad disuelta (mg) al término del perfil de disolución de los tres vasos empleados, así como el valor promedio.

Tabla 19. Perfil de Disolución Intrínseca.

Volumen de medio (mL)	Tiempo (min)	Cantidad disuelta (mg)			
		V₁	V₂	V₃	Promedio
900	10	21.93	21.71	21.84	21.83
897	20	40.19	40.40	39.95	40.18
894	30	58.43	58.87	58.44	58.58
891	40	76.23	76.39	76.05	76.22
888	50	93.96	92.99	91.79	92.91
885	60	109.84	109.28	109.22	109.45

Nota: Vaso 1 (V₁), Vaso 2 (V₂) y Vaso 3 (V₃).

La tabla 20 muestra los datos utilizados y el cálculo de la constante de velocidad de disolución intrínseca y en la figura 13 se presenta el perfil de disolución promedio para determinación de Casiopeina® III-ia en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. El área superficial se calculó teniendo en cuenta que el diámetro interno de la matriz del aparato de Wood es de 0.8 cm y empleando la ecuación para determinar el área de un círculo:

$$\begin{aligned} \text{Área superficial} &= \pi r^2 \\ \text{Área superficial} &= (3.1416)(0.4\text{cm})^2 = 0.5027 \text{ cm}^2 \end{aligned}$$

El cálculo de la constante de velocidad de disolución intrínseca se realizó con la siguiente ecuación (ejemplo de cálculo de datos promedio):

$$K_{int} = \frac{1.7541 \frac{\text{mg}}{\text{min}}}{0.5027 \text{ cm}^2} = 3.49 \frac{\text{mg}}{\text{cm}^2 \text{ min}}$$

Tabla 20. Cálculo de constante de velocidad de disolución intrínseca (K_{int}).

Datos	V ₁	V ₂	V ₃	Promedio
Pendiente	1.7676	1.7519	1.7429	1.7541
Intercepto	4.8958	5.2897	5.2131	5.1329
r²	0.9995	0.9991	0.9994	0.9994
Radio (cm)	0.4	0.4	0.4	0.4
Área superficial (cm²)	0.5027	0.5027	0.5027	0.5027
K_{int} (mg/(cm²min))	3.52	3.49	3.47	3.49

Nota: Vaso 1 (V₁), Vaso 2 (V₂) y Vaso 3 (V₃).

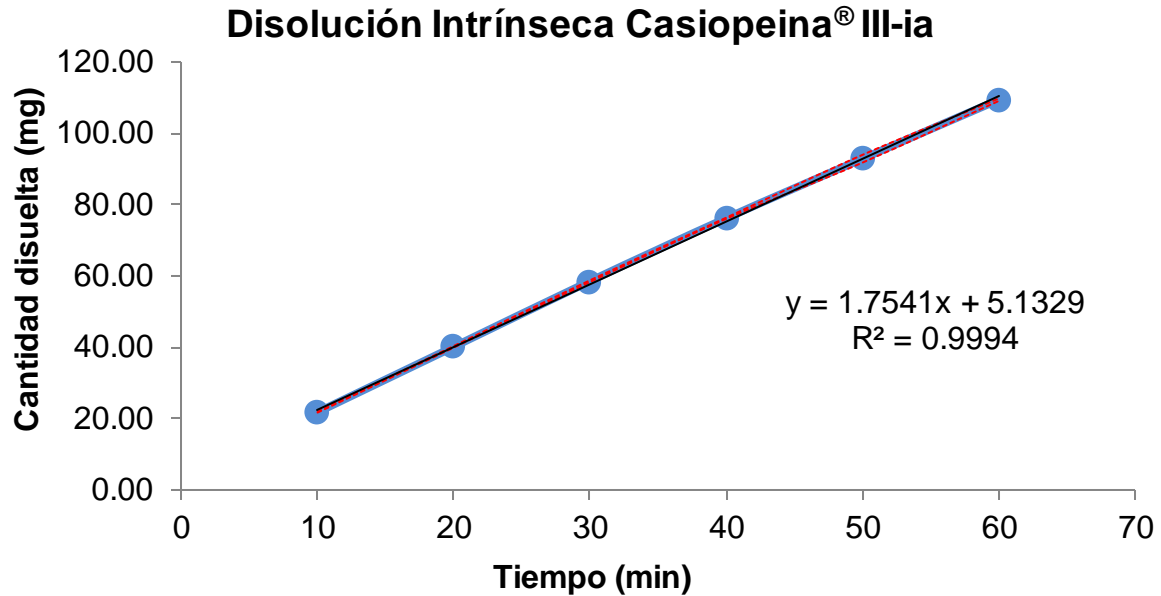


Figura 13. Perfil de Disolución Intrínseca Promedio

Como se puede apreciar en la tabla 18 la adecuabilidad, el perfil puede llevarse a cabo, ya que, el CV% obtenido se encuentra por debajo del 2% requerido.

De acuerdo a la figura 13, la cinética que presenta la disolución es de orden cero y en la tabla 20 se puede observar el valor de la pendiente promedio obtenida que al ser dividida entre el área de la superficie expuesta al medio de disolución, se obtiene el valor de la constante de velocidad de disolución intrínseca el cual es de 3.49 mg/(cm²min). Lo cual indica que es un fármaco que no presenta una velocidad de disolución limitante para su absorción, no debería presentar problemas con la biodisponibilidad o la disolución.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Se desarrollo y valido el método analítico para determinar Casiopeina[®] III-ia en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.4.
- El método analítico fue lineal, preciso y exacto en un intervalo de 2 - 25 µg/mL. El analito permanece estable durante 6 horas en el medio de disolución de trabajo.
- El valor de la constante de velocidad de disolución intrínseca obtenida fue de 3.49 mg/(cm²min).
- El valor de la constante obtenida para la Casiopeina[®] III-ia, de acuerdo a Abdou⁽⁶⁾, indica que la velocidad de disolución no es limitante para su absorción y no presentara problemas en su biodisponibilidad.

BIBLIOGRAFÍA

BIBΓIOΓΡΑΦΙΑ

- 1.- Espinoza, Guadalupe. Desarrollo de un método específico para Estudios de Disolución Intrínseca en México. Facultad de Química, UNAM 1986 pp 2-21; 53-54.

- 2.- FDA, Center for Drug Evaluation and Research, *Guidance for Industry: Immediate Release Solid Oral Dosage Forms*. August 1997. [Fecha de consulta 17 de Julio de 2011] Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070237.pdf>

- 3.- Cárdenas Hilda, Alma Cortés (1996) *Aspectos Biofarmacéuticos de la evaluación de medicamentos*. UAM. México. Pág. 46-48, 52-55

- 4.- Operator's Manual Intrinsic Dissolution Apparatus. Varian (2004) Versión digital.

- 5.- Aulton Michael E., (2004) *Farmacia. La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*. Elsevier. España. Pág. 18-21, 116-117, 124, 273-274

- 6.- Hamed, M. Abdou, *Dissolution, Bioavailability and Bioequivalence*, Pennsylvania, EUA, 1989, Ed. MACK, pp 26-32, 285-287.

- 7.- Mark Title®: CASIOPEINA. Reg. 407543 SECOFI. 1992

- 8.- L. Ruiz-Azuara. *Process to obtain new mixed copper aminoacidate complexes from phenylatephenanthroline to be used as anticancerigenic agent*. U.S. Patent. April 21 (1992) Number 5, 107,005. U.S. Patent Re35, 458, Feb. 18 (1997)

- 9.- L. Ruiz-Azuara. *Process to obtain new mixed copper aminoacidate from methyl phenanthroline complexes to be used as anticancerigenic agent*. U.S. Patent. Pat. No. 5,576,326. November 19, 1996.

- 10.- I. Gracia, M.E.Bravo, L. Ruiz Ramirez, M. Tinoco, M.L. Mayet, L. Huerta. *New antineoplastic in vivo Screening of mixed chelate copper Coordination Compounds (Casiopeinas[®]) in several murine tumoral model*. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2004.
- 11.- L. Gasque, L. Ruiz Ramirez, R. Moreno Esparza, *Stabilities of ternary copper and nickel complexes with 1,10 phenanthroline*. Journal of Inorganic Biochemistry, 48 (2) 121, 1992.
- 12.- Del Castillo García, Sofía. *Desarrollo de estudios de Permeabilidad de Casiopeina[®] III-ia a través de Células MDCK*. Tesis Licenciatura Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Quimca, UNAM 2010.
- 13.- Fuentes Noriega, Inés. *Farmacocinetica preclínica de Casiopeina[®] III-ia y su unión a proteínas plasmáticas*. Tesis Doctorado en Ciencias Químicas. Facultad de Química, UNAM 2005.
- 14.- Lawrence X. Yu. et al.(2004). *Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs* .J. Pharm. Sci. 270 , 221–227
- 15.- Vila Jato J. L. (2001) *Tecnología Farmacéutica Volumen I: Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas*. Síntesis. Madrid, España. Pág. 36-42, 147-148, 183-195
- 16.- Farmacopea de los Estados Unidos de América, *Formulario Nacional*. USP NF (2007). Edición anual en español. Pág. 584-585, 886-887
- 17.- Salazar Juarez, Fernando, *Estudio de disolución intrínseca de dos nuevos antiparasitarios carboxamida i (2-metiltio-5- [(piperidin-1-il)carbonil]-1 h-bencimidazol). Y la carboxamida ii (6-cloro-2-metiltio-5-[(piperidin-1- il)carbonil]-1*

h-bencimidazol. Tesis Licenciatura Químico Farmaceutico Biologo. Facultad de Química, UNAM 2007.

18.- Wood J.H., Syarto J.E., Letterman H. *Improved holder for intrinsic dissolution rate studies*. J. Pharm. Sci. 54, 1068. (1965).

19.- Farmacopea de los Estados Unidos de América 30. Versión en español. Vol. 1. Capítulos Generales: Información General <1087> pp 678-672. 2011.

20.- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a los que deben de sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.

21.- Nelson, E. *Comparative dissolution rates of weak acids and their sodium salts*. J. Am. Pharm. Assoc. Sci. 47, 297-299 (1958).

22.- Levy, G. Sahli, B. A. *Comparison of the gastrointestinal absorption of aluminum acetylsalicylate and acetylsalicylic acid in man*. J. Pharm. Sci. 51, 58-62 (1962).

23.- Levy, G. Tanski, W. *Precision apparatus for dissolution rate determinations*. J. Pharm. Sci. 53, 679 (1964).

24.- Levy, G. *Effect of certain tablet formulation factors on dissolution rate of the active ingredient I*. J. Pharm. Sci. 52, 1039-1046 (1963).

25.- Kobayasi, Y. et al. *Physicochemical properties and bioavailability of carbamazepine polymorphs and dehydrate*. Int. J. Pharm 193 (2000) 137-146.

26.- Ito, S. et.al. *Charaterization of Polymorphs and Hydrates of GK-128, a Serotonin Receptor Antagonist*. Int. J. Pharm 151 (1997) 133-143.

27.- Viegas, T.X.; Brinker, G. *Measurement of intrinsic Drug Dissolution using Two Types of Apparatus*. Pharm. Tech., 25 (6), 44-53 (2001).

28.- Singh, P. et. al. *Mechanistic study of the influence of micelle solubilization and hydrodynamic factors on the dissolution rate of solid drug*. J. Pharm. Sci., 57, 959-965 (1968).

29.- Lowter, et. al. *In Vitro and In Situ Permeability of a 'Second Generation' Hydroxypyridinone Oral Iron Chelator: Correlation with Physico-Chemical Properties and Oral Activity*. Pharm. Research. 16 (3) 434-440 (1999).

30.- Shargel, L.; Wu-Pong, S.; Yu, A. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetic*. Fifth Edition, McGraw-Hill, 2005.

31.- Vila Jato J. L. 2001. *Tecnología Farmacéutica vol I: aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas*. Sntesis. Madrid, España. pp 36-42, 147-148, 183-195.