



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**“COMPARACIÓN DEL PROCESO DE LA DISOLUCIÓN DE DOS
SUSPENSIONES INYECTABLES DE BENCILPENICILINA BENZATÍNICA
COMERCIALES A TRAVÉS DE PERFILES DE DISOLUCIÓN REALIZADOS EN
EL APARATO II USP”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A N:
GIOVANNA ALEJANDRA LÓPEZ NORIEGA
GLORIA MUÑOZ SOTO**

**Asesores:
DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO
Q.F.B. JOSÉ ANTONIO GARDUÑO ROSAS**

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2013



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Comparación del proceso de la disolución de dos suspensiones inyectables de Bencilpenicilina Benzatínica comerciales a través de perfiles de disolución realizados en el Aparato II USP

Que presenta la pasante: Giovanna Alejandra López Noriega
Con número de cuenta: 305203195 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de octubre de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	DAR. Juan José Díaz Esquivel	
VOCAL	Dra. Raquel López Arellano	
SECRETARIO	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
1er. SUPLENTE	M. en C. Miriam Aidé Castillo Rodríguez	
2do. SUPLENTE	QFB. Gabriela Rodríguez Patiño	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

U. N. A. M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO
SUPERIORES CUAUTITLÁN



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.
EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Comparación del proceso de la disolución de dos suspensiones inyectables de Bencilpenicilina Benzatínica comerciales a través de perfiles de disolución realizados en el Aparato II USP

Que presenta la pasante: Gloria Muñoz Soto

Con número de cuenta: 305336817 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de octubre de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	DAR. Juan José Díaz Esquivel	
VOCAL	Dra. Raquel López Arellano	
SECRETARIO	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
1er. SUPLENTE	M. en C. Miriam Aidé Castillo Rodríguez	
2do. SUPLENTE	QFB. Gabriela Rodríguez Patiño	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HHA/iac

AGRADECIMIENTOS

*Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán*

Laboratorio de Ensayo de Desarrollo Farmacéutico (LEDEFAR)

Calorimetría

*Q.F.B. Damaris Cabrero Palomino
Técnico académico en calorimetría
Instituto de investigaciones en materiales*

Microscopía

*Dr. German Barrido
Técnico académico en microscopía de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán*

Difracción de rayos X

*M. C. Adriana Tejedo Cruz
Técnico académico en difracción de rayos X
Instituto de investigaciones en materiales*

Tamaño de partícula

*Dra. Laura Patricia Martínez Padilla
Responsable del Laboratorio de Propiedades reológicas y funcionales (LAPRYFAL)*

*Q.F.B. Karina Rodríguez Valero
Sandoz S.A de C.V*

AGRADECIMIENTOS DE GIOVANNA

En la trayectoria de mi vida he ido acompañada de un ser maravilloso que no precisamente se ve pero sé que está conmigo, que me ha llevado de la mano, que se alegra de mis alegrías y me alienta en las adversidades, busca algún espacio para hacerme ver que hay decisiones y caminos difíciles, sólo con el objetivo de hacerme más fuerte, a él le debo lo que soy y seguiré siendo y le agradezco infinitamente que me haya prestado una hermosa familia....Gracias Dios

Un especial agradecimiento a mis dos ángeles, mis padres, por su amor, confianza, apoyo incondicional y por creer en mí. Gracias ma, por darme la vida y el amor más puro que existe, por hacer de mí una mujer de bien. Gracias pa, por ser un amigo y un maestro, por ser mi soporte hasta el día de hoy. Los amo!

A mis hermanos, Yesica e Ivan por todo su cariño, por compartir sus vidas conmigo y darme el ejemplo de fortaleza y amor. A mis sobrinas Aleida y Xana por llenar mi vida de felicidad con sus travesuras y ocurrencias.

A mis abuelitos, por todas esas experiencias tan bonitas, momentos inolvidables, los amaré por siempre y los llevaré en mi corazón.

A todos mis tíos, especialmente a mi tía Edith, Rosa, Lulú y tío Gaby por su apoyo y cariño que me han brindado, no tengo palabras para agradecerles, sólo me resta desear que Dios los bendiga y les multiplique lo que su corazón ofrece de forma sincera.

A Gloria, la mejor amiga que pude haber tenido y que ocupa un lugar especial en mi vida. Gracias al destino por poner una persona como tú en mi vida y de ser también la autora de éste excelente trabajo que sabemos que nos hizo crecer como profesionistas....Gracias Glory, jeje

A mis amigos Erika, Alex darks, Omar y Claudia, gracias chavos por su sincera amistad, por los momentos felices, por sus consejos y de su peculiar forma de hacerme sonreír... ¡los quiero muchísimo!

A mis asesores de tesis, la Dra. Raquel López Arellano y el Q.F.B. José Antonio Garduño Rosas, por hacerme ver que la profesión es una pasión y el conocimiento no tiene límites, por todo su tiempo y más que nada por la confianza y brindarme la oportunidad de aprender.

Gracias a todos ellos hoy puedo decir orgullosamente "Soy Química Farmacéutica Bióloga"

AGRADECIMIENTOS DE GLORJA

Le agradezco principalmente a mi Señor Jesús por haberme dado la vida y permitirme vivir este momento tan importante a lado de las personas que más amo, por siempre formar parte de mí y nunca soltar mi mano, por darme fortaleza y todo lo necesario para culminar esta etapa de mi vida y sobre todo por siempre llenarme de todas sus bendiciones, darme la familia que tengo y rodearme de personas maravillosas. Gracias por tu inmensa misericordia Señor.

Le agradezco con mucho amor y cariño a la persona más importante en mi vida a mi Mami Gloria Soto. Gracias Mami por siempre creer en mí, por haberme dado todo y enseñarme a luchar por lo que se quiere, por ser mi apoyo y mi mejor ejemplo, por siempre guiar mi camino y motivarme a seguir adelante, por estar junto a mí en todo momento sobre todo en los momentos más difíciles de mi vida, eres la mejor mamá del mundo y le doy infinitas gracias a Dios por darme el privilegio y la bendición de ser tu hija. Gracias por todo Mami te amo.

A mi hermana Adri, por siempre ser mi amiga y nunca dejarme sola, Adri gracias por todo tu apoyo, compañía y gran paciencia, gracias por ser la mejor hermana y ser mi ejemplo de fortaleza y amor ¡te amo mucho Adri!

Gracias abuelita Lidia, por todo el apoyo que siempre nos has dado, te amo abue.

A mi Lalito, gracias por ser parte de mi vida y permitirme ser parte de la tuya, gracias por todo tu apoyo incondicional sobre todo en esta etapa tan importante en mi vida, gracias por el cariño y amor que siempre me das. Te amo muchísimo mi vida.

A toda mi familia, gracias por todo su apoyo y buenos deseos. ¡los amo muchísimo!

A mi amiga Giovanna, gracias Gio por todo, obviamente fuiste parte fundamental de este trabajo pero sobre todo gracias por tu irremplazable amistad y apoyo de siempre, ¡te quiero muchísimo amiga!

A todos mis amigos, gracias por su apoyo incondicional por su amistad y compañía y de forma muy especial a Erika, Omar, Pol, Alex, Clau y Eric, gracias por todos los momentos compartidos y por formar parte de mi vida. ¡Los quiero!

A mis asesores de tesis, la Dra. Raquel López Arellano y el Q.F.B. José Antonio Garduño Rosas, gracias por la confianza, tiempo, conocimiento compartidos y por todo su apoyo para la realización de este trabajo.

Gracias a todos los profesores que me han motivado a seguir adelante que han sido un ejemplo y forman parte fundamental de mi formación personal y profesional

ÍNDICE

	PÁGINA
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	15
I. RESUMEN	17
II. INTRODUCCIÓN	18
III. OBJETIVO GENERAL	19
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
V. MARCO TEÓRICO	
1. DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	20
1.1 IMPORTANCIA EN EL CAMPO FARMACÉUTICO	20
2. FASES DEL DESARROLLO ANALÍTICO	20
2.1. MUESTREO	22
2.2. PROCESO DE PREPARACIÓN	22
2.3. PROCESO DE SEPARACIÓN	23
2.4. PROCESO DE DETECCIÓN	23
3. CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS	23
3.1. EN FUNCIÓN DE SU ESTADO REGULATORIO	23
3.2. EN FUNCIÓN DE SU APLICACIÓN (NOM-059-SSA1 Y NOM-073-SSA1)	23
3.3. EN FUNCIÓN DE LA NATURALEZA DE LA RESPUESTA ANALÍTICA	24
3.4. EN FUNCIÓN DE SU PROPÓSITO ANALÍTICO	24
3.5. EN FUNCIÓN DE LA NATURALEZA DEL SISTEMA DE MEDICIÓN	24
4. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	24
5. REVALIDACIÓN	25
6. TIPO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUE PUEDEN SER VALIDADOS	26
7. PARÁMETROS DE DESEMPEÑO PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	26
7.1. MÉTODO DE CONTENIDO/POTENCIA/VALORACIÓN	27
7.1.1. SISTEMA	27
7.1.1.1. PRECISIÓN DEL SISTEMA	28
7.1.1.1. METODOLOGÍA	28
7.1.1.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA	28
7.1.1.2.1. METODOLOGÍA	29
7.1.2. EXACTITUD	29
7.1.2.1. METODOLOGÍA	30
7.1.3. PRECISIÓN	31
7.1.3.1. REPETIBILIDAD	31
7.1.3.1.1. METODOLOGÍA	31
7.1.3.2. PRECISIÓN INTERMEDIA	32
7.1.3.2.1. METODOLOGÍA	32
7.1.4. REPRODUCIBILIDAD	33
7.1.5. LINEALIDAD DEL MÉTODO	33
7.1.5.1. METODOLOGÍA	33

7.1.6.	ESPECIFICIDAD	35
7.1.6.1.	METODOLOGÍA	35
7.2.	MÉTODO PARA CUANTIFICAR MUESTRAS DE PERFILES DE DISOLUCIÓN	36
7.2.1	PARÁMETROS DE VALIDACIÓN CON EL FÁRMACO	36
7.2.1.1.	LINEALIDAD	36
7.2.1.2.	PRECISIÓN	37
7.2.1.3.	ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	37
7.2.1.4.	INFLUENCIA DEL FILTRO	37
7.2.2.	PARÁMETROS DE VALIDACIÓN CON EL MEDICAMENTO	37
7.2.2.1.	LINEALIDAD	37
7.2.2.2.	EXACTITUD	38
7.2.2.3.	PRECISIÓN	38
7.2.2.3.1	REPETIBILIDAD	38
7.2.2.3.2.	REPRODUCIBILIDAD INTRALABORATORIO	38
7.2.2.4.	SELECTIVIDAD	38
8.	MÉTODO DE ADICIONES PATRÓN	39
9.	DISOLUCION	41
9.1.	VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN	41
9.1.1.	INTERCAMBIO SÓLIDO-LÍQUIDO	41
9.1.2	HUMECTACIÓN DE LA PARTÍCULA	43
10.	TEORÍAS DE DISOLUCIÓN	43
10.1.	TEORÍA DE CAPA ESTACIONARIA O DE DIFUSIÓN (NERST Y BRUNNER, 1904)	44
11.	VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN DE UN FÁRMACO CONTENIDO EN UN MEDICAMENTO	46
12.	EFFECTOS DE PARÁMETROS DE PRUEBAS SOBRE LA VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN	48
12.1.	FACTORES QUE DEPENDEN DEL SISTEMA	48
12.1.1.	AGITACIÓN	48
12.1.2.	GASES DISUELTOS EN EL MEDIO	49
12.1.3.	VOLUMEN DEL MEDIO	49
12.1.4.	TEMPERATURA	50
12.2.	COMPOSICIÓN DEL MEDIO	51
12.2.1.	pH DEL MEDIO	51
12.2.2.	VISCOSIDAD	51
12.2.3.	TENSIÓN SUPERFICIAL DE MEDIO	51
12.3.	FACTORES QUE DEPENDEN DEL SÓLIDO A DISOLVER	52
12.3.1.	SOLUBILIDAD	52
12.3.2.	FACTORES DE FORMULACIÓN QUE INFLUYEN EN LA SOLUBILIDAD	52
12.3.3.	TAMAÑO DE PARTÍCULA	53
12.3.4.	FORMA GEOMÉTRICA	53
13.	OTROS FACTORES RELACIONADOS CON LA TÉCNICA DE DISOLUCIÓN	53
13.1.	TOMA DE MUESTRA	53
13.2.	ADSORCIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO	53
14.	PRUEBAS DE DISOLUCIÓN	54
14.1.	OBJETIVOS DE LAS PRUEBAS DE DISOLUCIÓN	54
14.2.	DESARROLLO DE LA PRUEBA	54

14.2.1.	RECOPIACIÓN DE PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS	54
14.2.2.	PARÁMETROS A INVESTIGAR Y SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DE LA PRUEBA	55
14.2.2.1.	APARATO DE DISOLUCIÓN Y VELOCIDAD DE ROTACIÓN	55
14.2.2.2	MEDIO DE DISOLUCIÓN	55
14.2.2.3.	TEMPERATURA	55
14.2.2.4.	MUESTREO	56
15.	VALIDACIÓN DEL MÉTODO CUANTITATIVO	56
15.1.	EVALUACIÓN DEL FILTRO	56
15.2.	ESTUDIOS DE VALIDACIÓN PRELIMINAR	57
16.	APARATOS DE DISOLUCIÓN	57
16.1.	APARATO I USP	58
16.2.	APARATO II USP	59
16.3.	APARATO DE DISOLUCIÓN IV USP	60
16.4	VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS APARATOS DE DISOLUCIÓN I, II Y IV	61
17.	UTILIDAD Y APLICACIONES DE LAS PRUEBAS DE DISOLUCIÓN	61
17.1.	COMO PRUEBA FÍSICOQUÍMICA RUTINARIA DE CONTROL DE CALIDAD	62
17.2.	DESARROLLO DE PRODUCTOS Y EL CONTROL DE CALIDAD	62
17.3.	COMO INDICADOR DE BIODISPONIBILIDAD	62
17.4.	COMO TEMA DE INVESTIGACIÓN O POSIBLE INCLUSIÓN EN FARMACOPEA	62
18.	GENERALIDADES DE LA BENCILPENICILINA BENZATÍNICA	63
18.1.	MONOGRAFÍA	63
18.2.	ESTRUCTURA QUÍMICA	64
18.3.	SOLUBILIDAD	64
18.4.	ESTABILIDAD	64
18.5.	INDICACIONES TERAPÉUTICAS	65
18.6.	FARMACOCINÉTICA	65
18.7.	FARMACODINAMIA	65
18.8.	CRITERIO DE ACEPTACIÓN DE LA SUSPENSIÓN INYECTABLE DE BPB	66
VI.	MATERIAL Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	
1.	DIAGRAMA DE FLUJO	67
2.	EQUIPOS, INSTRUMENTOS, REACTIVOS O EXCIPIENTES Y SOLUCIONES	68
3.	DESARROLLO EXPERIMENTAL	69
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	84
VIII.	CONCLUSIONES	145
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147
X.	ANEXOS	151

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	NOMBRE
Abs	Absorbancia
HCl	Ácido clorhídrico
ANADEVA	Análisis de Varianza
Prod ref	producto de referencia (Bencetazil 1, 200, 000 UI®(Sandoz) Lote C87532)
Prod pba	Producto de prueba (Bencelin 1, 200, 000 UI®(AMSA) Lote 106219)
BPB	Bencilpenicilina Benzatínica
cm	Centímetro
ϵ	Coefficiente de absorptividad
r	Coefficiente de correlación
r^2	Coefficiente de determinación
CV	Coefficiente de variación
$CV_{y/x}$	Coefficiente de variación de regresión
Ce	Concentración estimada
Cr	Concentración real
K	Constante de disolución aparente
S	Desviación estándar
Dil	Dilución
STD	Estándar
F	F de Fisher
f_2	Factor de similitud
FDA	Food and Drug Administration
KH_2PO_4	Fosfato de potasio monobásico
°C	Grado centígrado
Gl	Grados de libertad
g	Gramo
NaOH	Hidróxido de sodio
H_0	Hipótesis nula
H_A	Hipótesis alterna
HR	Humedad relativa
ICH	International Conference on Harmonisation
IC (μ)	Intervalo de confianza para la media
IC (β_1)	Intervalo de confianza para la pendiente
IC (β_0)	Intervalo de confianza para la ordenada al origen
\bar{x}	Media aritmética de x
\bar{y}	Media aritmética de y
CH_3OH	Metanol
μg	Microgramo
μm	Micrómetro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
min	Minuto
M	Molar
mtra	Muestra
nm	Nanómetro
No	Número

β_0, b	Ordenada al origen
β_1, m	Pendiente
PVP	Polivinilpirrolidona
%	Porcentaje
pH	Potencial Hidrogeno
Sol	Solución
Solns	Soluciones
SR1	Sustancia de referencia primaria de BPB
SR2	Sustancia de referencia secundaria de BPB
t	t de Student
UI	Unidad Internacional
USP	United States Pharmacopea

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	PÁGINA
5.1	Criterios y parámetros a revalidar	25
5.2	Parámetros de desempeño a evaluar para un método de contenido/potencia/valoración	27
5.3	Intervalos para el estudio de linealidad	34
5.4	Parámetros de las pruebas de disolución y los intervalos típicos	56
5.5	Ventajas y desventajas de los aparatos de disolución I, II y IV	61
5.6	Sales actualmente disponibles de Penicilina G	65
5.7	Especificaciones y criterios de aceptación de la suspensión inyectable de BPB establecidos en algunos compendios farmacopéicos	66
6.2.1	Equipos utilizados en el presente trabajo	68
6.2.2	Reactivos utilizados en el presente trabajo	68
6.2.3	Soluciones utilizadas en el presente trabajo	68
6.3.1	Cantidades (g) pesadas para la elaboración de matriz de Prod ref	70
6.3.2	Preparación de soluciones para evaluar los espectros de absorción de BPB con y sin matriz	71
6.3.3	Composición de los placebos cargados para evaluación de la linealidad del método	75
6.3.4	Condiciones óptimas para la elaboración de perfiles de disolución de una suspensión inyectable de BPB en el aparato II USP	83
7.1	Resultados de la evaluación espectrofotométrica de estabilidad de BPB a 40, 24-25 y 4°C en soluciones de 20 y 40 µg/mL de la SR1	85
7.2	Prueba t para la evaluación de interferencias e interacciones de la matriz del Prod ref	87
7.3	% de recuperación de BPB para la selección del tiempo de agitación óptimo	89
7.4	Prueba t para las medias de dos tiempos de agitación (15 y 30 min) con varianzas iguales	90
7.5	Evaluación de linealidad del sistema de BPB con Sol amortiguadora de fosfatos pH=6.8	91
7.6	ANADEVA de la linealidad del sistema	92
7.7	Evaluación de la precisión del sistema de BPB con Sol amortiguadora de fosfatos pH=6.8	95
7.8	Evaluación de la degradación de BPB en HCl 1M (Sol A)	95
7.9	Resultados de la determinación de la especificidad del método analítico para la determinación de contenido químico de BPB en Prod ref y Prod pba	96
7.10	Prueba t para evaluar la especificidad del método para determinar contenido químico de BPB en Prod ref y Prod pba suponiendo varianzas iguales	96
7.11	Cantidades adicionada y recuperada de la SR2 de BPB obtenidos en la evaluación de la linealidad del método analítico de contenido químico de BPB en placebos cargados	97
7.12	% de recobro de la SR2 obtenidos en la evaluación de la linealidad del método analítico de contenido químico de BPB en placebos cargados	98
7.13	ANADEVA de la evaluación de la linealidad del método analítico de contenido químico de BPB por adiciones patrón	99
7.14	% recuperados de SR2 obtenidos en la evaluación de la exactitud y repetibilidad del método analítico de contenido químico de BPB en placebos cargados	101
7.15	Evaluación de la precisión intermedia método analítico para determinar contenido químico de BPB (Prod ref)	102
7.16	ANADEVA para % de BPB para la evaluación de la precisión intermedia del método de contenido químico de BPB (Prod ref)	102

7.17	Contenido químico de BPB en Prod ref y Prod pba	103
7.18	ANADEVA de la elección de la dilución en perfiles de disolución en el aparato II USP del Prod ref	104
7.19	Parámetros estadísticos de tres muestras de Prod ref a diferentes tiempos de muestreo en el aparato II con una dilución 2/10 mL y 5/25 mL	105
7.20	Diferencia absoluta del promedio de % recuperados de BPB en la evaluación de papel filtro Whatman 542 (2.7 μm)	107
7.21	Diferencia absoluta del promedio de la concentración de BPB ($\mu\text{g/mL}$) cuantificado en la muestra (Prod ref y Prod pba) en la evaluación de la estabilidad	107
7.22	Concentraciones adicionada y recuperada de SR2 de BPB obtenidos en la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod ref)	108
7.23	% recuperados de SR2 obtenidos en la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod ref)	110
7.24	ANADEVA de la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod ref)	111
7.25	Valores de regresión lineal obtenidos en la evaluación de la linealidad del sistema y la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB (Prod ref)	111
7.26	ANADEVA para la comparación de las pendientes de la regresión lineal en la evaluación de la linealidad del sistema y linealidad del método para determinar cantidad disuelta de BPB (Prod ref)	111
7.27	Concentraciones adicionada y recuperada de SR2 de BPB obtenidos en la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod pba)	112
7.28	% recuperados de SR2 obtenidos en la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod pba)	114
7.29	ANADEVA de la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod pba)	115
7.30	Valores de regresión lineal obtenidos en la evaluación de la linealidad del sistema y la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB (Prod pba)	115
7.31	ANADEVA para la comparación de las pendientes de la regresión lineal en la evaluación de la linealidad del sistema y linealidad del método para determinar cantidad disuelta de BPB (Prod pba)	115
7.32	Resultados de la evaluación de reproducibilidad intralaboratorio	116
7.33	ANADEVA para la evaluación de la reproducibilidad intermedia del método de cantidad disuelta de BPB (Prod ref y Prod pba)	116
7.34	Resumen de las características de validación de dos métodos analíticos (uno para la determinación de contenido químico de BPB y otro para la determinación de % disuelto de BPB) para Prod ref y Prod pba.	117
7.35	% de BPB disuelto promedio de seis muestras de Prod ref a diferentes tiempos en el aparato II USP	118
7.36	% disuelto de BPB individual de doce muestras de Prod ref en el aparato II USP	120

7.37	% disuelto de BPB individual de doce muestras de Prod pba en el aparato II USP	120
7.38	Factor de similitud (f_2) de los perfiles de disolución de Prod ref y Prod pba	122
7.39	Cantidad (mg) disuelta de BPB individual de doce muestras de Prod ref en el aparato II USP	125
7.40	Cantidad (mg) disuelta de BPB individual de doce muestras de Prod pba en el aparato II USP	125
7.41	Parámetros de regresión para la determinación de la cinética de disolución del Prod ref y el Prod pba	128
7.42	Comparación de las constantes de velocidad de disolución del Prod ref y el Prod pba	128
7.43	Diámetro medio, al 10% , 50 % y 90 % del Prod ref y Prod pba	129
7.44	Resultados de la difracción de rayos X del Prod ref y Prod pba	138
7.45	Microfotografías del Prod ref y Prod pba en diferentes disolventes	141-144
10.1	Resultados de la evaluación espectrofotométrica de estabilidad de BPB a temperatura ambiente (24 y 25 °C) en Solns de 20 y 40 µg/mL de STD 1	151
10.2	Resultados de la evaluación espectrofotométrica de estabilidad de BPB a 40 °C en soluciones de 20 y 40 µg/mL de STD 1	152
10.3	Resultados de la evaluación espectrofotométrica de estabilidad de BPB a 4 °C en soluciones de 20, 40 y 100 µg/mL de STD 1	153
10.4	Datos obtenidos de la balanza METTLER TOLEDO AB204-S para la determinación de polvo contenido en una unidad de dosis de Prod ref	154
10.5	Datos obtenidos de la balanza OHAUS para la determinación de polvo contenido en una unidad de dosis de Prod ref	154
10.6	Proporción de los componentes de la formulación de una unidad de dosis de Prod ref	154
10.7	Proporción de los excipientes de la formulación de una unidad de dosis de Prod ref	155
10.8	Comparación de curvas de calibración sin y con excipientes en una proporción baja (0.6µg/mL) y alta (3.6µg/mL)	155
10.9	Método analítico de contenido químico de BPB contenida en Prod ref empleando 15 min de agitación magnética	156
10.10	Método analítico de contenido químico de BPB contenida en Prod ref empleando 30 min de agitación magnética	157
10.11	Resultados de la determinación de la especificidad del método analítico para la determinación de contenido químico de BPB en Prod ref y Prod pba	158
10.12	Composición de placebos cargados	159
10.13	Resultados de linealidad al aplicar el ensayo analítico a los placebos cargados (80-110%)	159
10.14	Resultados de exactitud y repetibilidad al aplicar el ensayo analítico al placebo cargado al 100 %	160
10.15	Resultados obtenidos de la evaluación de la precisión intermedia método para determinar contenido químico de BPB (Prod ref), realizada por el Analista 1 el día 1	160
10.16	Resultados obtenidos de la evaluación de la precisión intermedia método para determinar contenido químico de BPB (Prod ref), realizada por el Analista 2 el día 1	161
10.17	Resultados obtenidos de la evaluación de la precisión intermedia método para determinar contenido químico de BPB (Prod ref), realizada por el Analista 1 el día 2	161

10.18	Resultados obtenidos de la evaluación de la precisión intermedia método para determinar contenido químico de BPB (Prod ref), realizada por el Analista 2 el día 2	162
10.19	Resultados de la determinación contenido químico de BPB en Prod ref y Prod pba	163
10.20	Resultados de la determinación de solubilidad de BPB en Sol amortiguadora de fosfatos pH=6.8 a 37 °C	164
10.21	Abs de las muestras del perfil de disolución del Prod ref con una dilución 2/10 mL	164
10.22	Abs de las muestras del perfil de disolución del Prod ref con una dilución 5/25 mL	165
10.23	Concentración de BPB (µg/mL) disueltos de tres muestras de suspensión inyectable de BPB (Prod ref) a diferentes tiempos de muestreo en el aparato II USP con una dilución 2/10 mL	165
10.24	Concentración de BPB (µg/mL) disueltos de tres muestras de suspensión inyectable de BPB (Prod ref) a diferentes tiempos de muestreo en el aparato II USP con una dilución 5/25 mL	165
10.25	Concentración de BPB (µg/mL) durante la evaluación de dos filtros Whatman No. 542 (2.7µm)	166
10.26	Evaluación de la estabilidad de la muestra (Prod ref y Prod pba)	167
10.27	Concentraciones de los niveles para la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod ref)	167
10.28	Curva de Calibración de STD 2 BPB empleada para la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod ref)	168
10.29	Determinación de la concentraciones de las Solns (A, B y C) utilizadas para la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod ref)	169
10.30	Resultados obtenidos de la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod ref)	170
10.31	Concentraciones de los niveles para la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod pba)	171
10.32	Concentraciones de los niveles para la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod pba)	171
10.33	Determinación de la concentraciones de las Solns (A, B y C) utilizadas para la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod pba)	172
10.34	Resultados obtenidos de la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod pba)	173
10.35	Resultados de reproducibilidad intralaboratorio	174
10.36	Abs de las Solns obtenidas del perfil de disolución del Prod ref con una agitación de 50 rpm	175
10.37	Abs de las Solns obtenidas del perfil de disolución del Prod ref con una agitación de 100 rpm	175
10.38	% de BPB disuelto de seis muestras de Prod ref a diferentes tiempos de muestreo en el aparato II a 50 rpm	176

10.39	% de BPB disuelto de seis muestras de Prod ref a diferentes tiempos de muestreo en el aparato II a 100 rpm	176
10.40	Cantidad de polvo (mg) de Prod ref pesados para la elaboración de perfiles de disolución en el aparato II USP	177
10.41	Cantidad de polvo (mg) de Prod pba pesados para la elaboración de perfiles de disolución en el aparato II USP	177
10.42	Abs de las doce muestras de Prod ref muestreadas durante el perfil de disolución realizado en el aparato II USP	178
10.43	Abs de las doce muestras de Prod pba muestreadas durante el perfil de disolución realizado en el aparato II USP	178
10.44	Curva de calibración utilizada para la estimación de las concentraciones de los perfiles de disolución de BPB Prod ref y Prod pba	179
10.45	Cinética de disolución de orden cero de Prod ref	180
10.46	Cinética de disolución de orden uno de Prod ref	180
10.47	Cinética de disolución de orden cero de Prod pba	181
10.48	Cinética de disolución de orden uno de Prod pba	181

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
5.1	Fases del desarrollo analítico	21
5.2	Método de adición estándar	40
5.3	Esquema representativo del ángulo de humectación	43
5.4	Modelo de capa de difusión	45
5.5	Esquema del modelo de la capa estacionaria de difusión ($x=0$, $x=h$)	46
5.6	Factores que afectan la velocidad de disolución aparente de un fármaco	48
5.7	Aparatos de disolución I y II USP	58
5.8	Aparato de disolución I	58
5.8.1	Aparato de disolución II	59
5.9	Elemento de agitación de paleta	60
5.10	Estructura de la Bencilpenicilina	64
6.3.1	Ensayo analítico para determinar contenido de BPB en los Prod ref y Prod pba	73
6.3.2	Evaluación de la linealidad del método para determinar contenido químico de BPB	76
6.3.3	Preparación de soluciones STD para la evaluación de la linealidad del método por adiciones patrón	80
6.3.4	Preparación de soluciones mtra para la evaluación de la linealidad del método por adiciones patrón	81
6.3.5	Preparación de los sistemas para la evaluación de la linealidad del método por adiciones patrón	82
7.1	Espectro de absorción de BPB (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de 190 a 350 nm en Sol amortiguadora de fosfatos (pH=6.8)	84
7.2	Espectros de absorción de BPB con y sin adición de matriz de Prod ref	88
7.3	Espectros de absorción de matriz de Prod ref a diferente concentración	88
7.4	Abs vs concentración de BPB ($\mu\text{g}/\text{mL}$) para evaluar la linealidad del sistema	93
7.5	Residuales de la linealidad del sistema	94
7.6	Cantidad adicionada vs cantidad recuperada de BPB	100
7.7	Evaluación de la dilución del método de cantidad disuelta de BPB (Medias e intervalos LSD 95%)	104
7.8	Comparación de dos diluciones realizadas a muestras obtenidas a partir de un perfil del Prod ref	106
7.9	Concentración adicionada ($\mu\text{g}/\text{mL}$) vs concentración recuperada ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de acuerdo al método de adiciones patrón para evaluar la linealidad del método para determinar cantidad disuelta de BPB (Prod ref)	109
7.10	Concentración adicionada ($\mu\text{g}/\text{mL}$) vs concentración recuperada ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de acuerdo al método de adiciones patrón para evaluar la linealidad del método para determinar cantidad disuelta de BPB (Prod pba)	113
7.11	Comparación de los perfiles de disolución de una suspensión inyectable de BPB a diferentes velocidades de agitación en el aparato II USP	119
7.12	Comparación de perfiles de disolución de Prod ref y Prod pba	121
7.13	Relación de la diferencia promedio entre los perfiles de disolución del Prod ref y Prod ref y su factor de similitud	123
7.14	Cinética de disolución de orden cero	126

7.15	Cinética de disolución de orden uno	127
7.16	Curvas unificadas del Prod ref y Prod pba	130
7.17	Comparación final en apariencia después de seis horas de disolución en los productos estudiados	131
7.18	Termograma del Prod ref	133
7.19	Termograma del Prod pba	133
7.20	Difractogramas del Prod pba y Prod ref	137
7.21	Representación de los siete sistemas cristalinos y los tres hábitos cristalinos	139
7.22	Posibles sistemas cristalinos	140

I. RESUMEN

El presente trabajo se desarrolló con la finalidad de comparar el proceso de la disolución de dos suspensiones comerciales de Bencilpenicilina Benzatínica (BPB) las cuales corresponden a un producto de referencia y a un producto de prueba para contar con una herramienta de control de calidad mediante perfiles de disolución para poder diferenciar si algún cambio dentro de la formulación o proceso de producción afecta la liberación y disolución del principio activo presente. Para llevar a cabo perfiles de disolución de los dos productos fue necesario desarrollar y validar dos métodos analíticos, uno para la determinación del contenido químico y otro para la cantidad disuelta de BPB.

Como primera parte se realizó una búsqueda de información para el desarrollo de los métodos analíticos, que van desde características del analito y la muestra así como métodos analíticos reportados en la literatura. Una vez realizada la búsqueda de información necesaria se procedió al desarrollo y la optimización de dichos métodos analíticos.

Así mismo se validaron dichos métodos analíticos por lo que se presentan los criterios necesarios para validar métodos analíticos tanto de valoración como de disolución, siguiendo los criterios de la guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C de México, la NOM-177-SSA1-2013 y las guías ICH (Q2 y Q4).

Una vez desarrollados y validados ambos métodos analíticos y cumpliendo con los criterios y requisitos generales necesarios para realizar perfiles de disolución, se optimizó el proceso de disolución, evaluando parámetros como tipo de aparato, velocidad de agitación, medio de disolución. Posteriormente se realizaron perfiles de disolución comparativos de los dos productos los cuales se evaluaron mediante el factor de similitud, además se caracterizó el proceso de la disolución mediante la estimación de su cinética de disolución. Con la finalidad de tener un mayor contraste con los resultados obtenidos y explicar las diferencias en la disolución de ambos productos se realizaron análisis de las propiedades físicas a través del estudio del tamaño y distribución de partícula, difracción de rayos X, calorimetría diferencial de barrido y microscopía.

En la primera parte del presente trabajo se muestra toda la parte teórica necesaria para llevar a cabo la parte experimental de forma adecuada y con los fundamentos y conocimientos necesarios. La segunda parte contiene toda la información concerniente a la metodología experimental, material, equipos y reactivos usados haciendo uso de diagramas y tablas para su mayor comprensión.

Como parte final se encuentran los resultados obtenidos de cada uno de los parámetros estudiados y antes mencionados haciendo uso de figuras y tablas, así como el análisis respectivo a cada parámetro.

II. INTRODUCCIÓN

Para poder cumplir con el principal objetivo del presente trabajo, previamente se debe desarrollar y validar dos métodos analíticos que permitan la correcta detección y cuantificación de BPB, el primero servirá para determinar el contenido del fármaco para verificar que los productos están dentro de los límites farmacopéicos y no difieren en más del 5% en su contenido químico y el segundo se utilizará para obtener los perfiles de disolución en el aparato II USP.

El desarrollo de un método analítico implica definir condiciones de operación que permitan demostrar la adecuabilidad del método para un fin determinado. Una vez optimizado el método se procede a la validación del mismo, para posteriormente ser utilizado en el control de calidad del producto farmacéutico (Cruz Mendiola M. C., Desarrollo y Validación de un método analítico para cuantificar por espectrofotometría UV, un fármaco para el tratamiento de enfermedades respiratorias., 2010).

La validación puede definirse como un proceso, basado en estudios sistemáticos de laboratorio, mediante el cual se pone de manifiesto que un método analítico determinado posee unas características de funcionamiento adecuadas para la aplicación que se le quiere dar (Compañó & Rios, 2002). Los parámetros evaluados en la validación de un método analítico son establecidos por las diferentes organizaciones o estancias regulatorias, como la FDA o ICH, EMEA, WHO, además en la regulación mexicana la NOM 059-SSA1-2013 y NOM 177-SSA1-2013, la cual establece las características que se deben evaluar para validar métodos analíticos que pueden ser empleados en la evaluación de las pruebas de perfiles de disolución.

De acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013 un perfil de disolución es definido como la determinación experimental de la cantidad de fármaco disuelto a diferentes tiempos en condiciones experimentales controladas, a partir de la forma farmacéutica.

La disolución es una herramienta muy importante en la industria farmacéutica tanto en el desarrollo de un fármaco así como en el control de calidad del proceso de manufactura, si un lote difiere mucho de otros en las características de disolución o si los tiempos de disolución de lotes de producción muestran una tendencia constante, hacia arriba o hacia abajo, representa un aviso seguro de que algún factor en la materia prima, formulación, o proceso está fuera de control, los datos de disolución también son útiles en etapas tempranas del desarrollo de un fármaco o formulación. Encontrar las condiciones experimentales óptimas del proceso de disolución, permite obtener un perfil de disolución discriminatorio y sensible a las variables que afectan la cinética de disolución de un medicamento.

Establecer especificaciones de disolución permite la liberación de nuevos lotes dentro del mercado de venta. Las especificaciones de disolución *in vitro* se establecen para asegurar la constancia de lote a lote y para indicar posibles problemas con la biodisponibilidad *in vivo* (Hernández & Solís, 2011).

III. OBJETIVO GENERAL

Contar con una herramienta de control de calidad para comparar el proceso de la disolución de dos suspensiones inyectables de Bencilpenicilina Benzatínica comerciales a través de perfiles de disolución realizados en el aparato II USP para determinar si existen diferencias y contrastarlas con las propiedades físicas de ambos polvos.

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar una búsqueda de información para conocer las características fisicoquímicas de BPB y los métodos analíticos reportados para determinar contenido químico y cantidad disuelta.
2. Desarrollar y validar un método analítico para determinar el contenido químico de BPB en un polvo de suspensión inyectable, evaluando las características de desempeño para la valoración del activo en la formulación.
3. Revalidar el método analítico para determinar contenido químico de BPB para un polvo de suspensión inyectable de diferente fabricante mediante la evaluación de la especificidad para demostrar que dicho método mantiene su desempeño.
4. Determinar el contenido químico de BPB en dos suspensiones inyectables de BPB comerciales aplicando el método previo para conocer si cumplen con dicha especificación y establecer la diferencia entre los dos productos.
5. Desarrollar y validar un método analítico para determinar la cantidad disuelta de BPB evaluando las características de desempeño para la evaluación de los perfiles de disolución en el aparato II USP.
6. Establecer las condiciones experimentales óptimas del proceso de disolución de una suspensión inyectable de BPB en el aparato II USP mediante la evaluación de factores que afectan el proceso de disolución para la obtención de perfiles de disolución que proporcionen información útil, confiable y reproducible.
7. Evaluar las propiedades físicas de los polvos de los productos en estudio mediante las pruebas de la caracterización de tamaño de partícula, microscopía, calorimetría y difracción de rayos X para determinar su impacto en el proceso de disolución.

V. MARCO TEÓRICO

1. DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Un método analítico es 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 (analito) de una muestra (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. (CNQFB), 2002).

El desarrollo de un método analítico puede tomar varias formas, desde adaptar un método existente realizando cambios menores de tal manera que sea adecuado para su nueva aplicación o bien proponerlo y desarrollarlo para un nuevo analito. Requiere seleccionar las condiciones de operación que permitan cuantificar con confiabilidad el analito en una muestra. Siempre que se inicia el desarrollo de un método analítico es necesario justificar el por qué y para qué del método de análisis (Guerrero Barrera, 2005); (Vázquez Miranda, 2002).

1.1 IMPORTANCIA EN EL CAMPO FARMACÉUTICO

El desarrollo de métodos analíticos en el campo farmacéutico recae principalmente en la necesidad de cuantificar de un analito de forma confiable y exacta, con la finalidad de evaluar que los productos farmacéuticos cumplan con los criterios de calidad establecidos, ya que para que sean aceptados en el mercado se necesita garantizar su calidad y funcionalidad, relativa al contenido químico, disolución, uniformidad de contenido, etc. (Barrera, 2005); (Cruz Mendiola M. C., 2010)

2. FASES DEL DESARROLLO ANALÍTICO

No existe una guía oficial que indique la óptima secuencia de experimentos analíticos necesarios para el desarrollo de un método, ya que esto depende del método en sí mismo. No obstante, el desarrollo lógico de un método analítico transcurre en diferentes fases (Asociación Española de Farmacéuticos de la industria (AEFI), 2001).

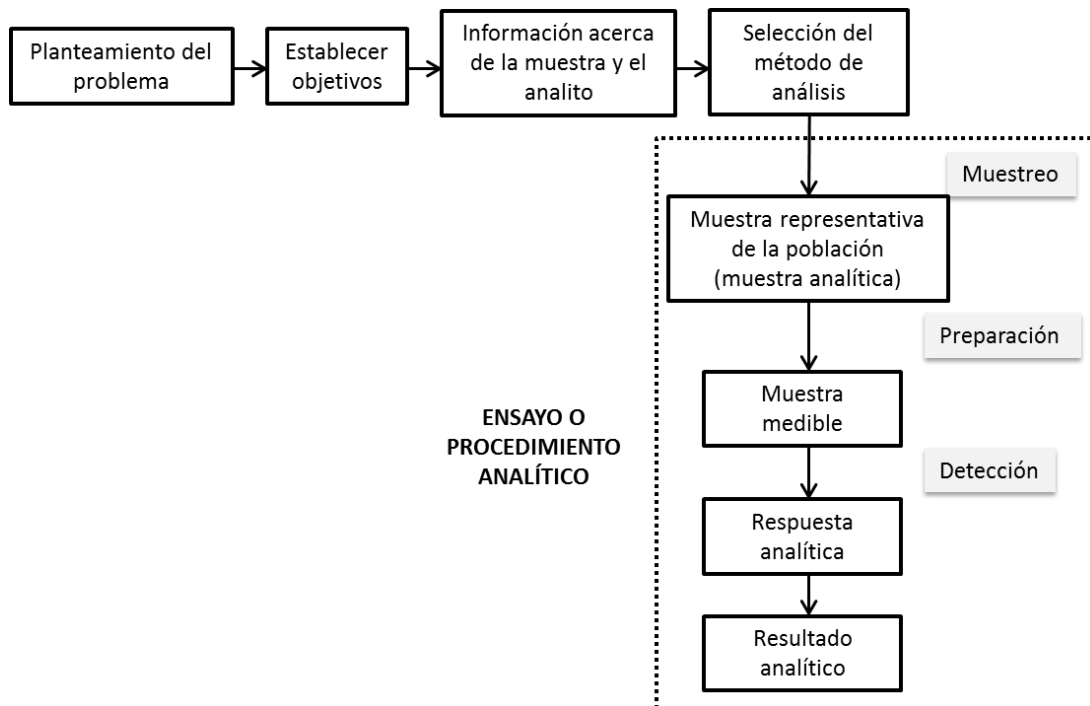


Figura No. 5.1. Fases del desarrollo analítico

Para elegir el método analítico se debe definir con claridad el problema analítico y para ello es necesario saber el número de analitos que se desea identificar o cuantificar, el número y tamaño de las muestras que serán analizadas bajo este método, la composición de la matriz y la concentración del analito en la muestra (Quattrocchi, 1992); (Barrera, 2005); (Llamas Borrajo, S/A). Para un óptimo desarrollo del método analítico es esencial determinar las propiedades del o los analito(s) de interés. Será necesario establecer el rango de posibles resultados a obtener, hacer una búsqueda bibliográfica de constantes termodinámicas, propiedades físicas y químicas; también revisar si existen estándares, si se ha reportado algún método para ese analito en especial. Por último, hacer el diseño de modelos químicos a partir de las constantes encontradas y establecer condiciones óptimas del método (Vázquez Miranda, 2002).

Así mismo, han de evaluarse parámetros de desempeño del método: precisión exigible, sensibilidad deseable, grado de selectividad, tiempo, coste, calificación del personal, tipo de equipo e instrumentación, condiciones de seguridad, entre otras. Una vez que se conozca lo anterior, el analista será capaz de seleccionar un método analítico que garantice la solución óptima, rápida y económica al problema analítico que debe resolver (Asociación Española de Farmacéuticos de la industria (AEFI), 2001); (Quattrocchi, 1992); (Guerrero Barrera, 2005); (Llamas Borrajo, S/A).

2.1. MUESTREO

En la mayoría de los casos un análisis químico se realiza solo en una pequeña fracción del material cuya composición es de interés. Para que los resultados sean válidos, es evidente que la composición de la fracción debe reflejar lo mejor posible la composición media de todo el material. El proceso mediante el que se toma una fracción representativa se denomina muestreo. Con frecuencia el muestreo es el paso más difícil de todo el proceso analítico, y es el factor limitante tanto de la exactitud como de la precisión del procedimiento (Skoog, 2005).

Los dos objetivos del muestreo son asegurar que las muestras sean representativas del material que se analiza y que las muestras analizadas en el laboratorio sean homogéneas. El término muestra representativa tiene el mismo significado en este contexto que en el lenguaje común: que el contenido total de la muestra sea el mismo que el del material del cual se toma. La palabra homogénea significa que la muestra sea la misma en todas partes (Rubinson, 2000).

En términos estadísticos, los objetivos son:

1. Obtener el valor medio que sea una estimación sin sesgo de la media poblacional. Este objetivo se logra solo si todos los miembros de la población tienen la misma probabilidad de estar incluidos en la muestra.
2. Obtener una varianza que sea una estimación sin sesgo de la varianza poblacional de manera que se pueden encontrar límites de confianza válidos para la media, y se puedan aplicar varias pruebas de hipótesis. Este objetivo se logra solo si cada muestra posible tiene la misma probabilidad de ser extraída (Skoog, 2005).

La selección de una muestra introduce un error sistemático que no puede corregirse durante el análisis. Si la muestra no representa con exactitud la población de la que procede, un análisis que, por lo demás, se efectúa con cuidado, dará resultados inexactos. Los errores de muestreo se introducen siempre que se extrapola desde la muestra a la población de la que forma parte. Para reducir al mínimo los errores de muestreo debemos obtener una muestra adecuada (Harvey, 2002).

2.2. PROCESO DE PREPARACIÓN

El concepto básico de la preparación de la muestra es transformar a la muestra representativa en una muestra que sea adecuada para el análisis, lo que normalmente significa disolver la muestra, así que se debe buscar el disolvente más adecuado para tener al analito en solución.

Durante este proceso de preparación de la muestra se busca que los componentes sufran cambio en las interacciones que tienen con el medio en el que se encuentran. Estas interacciones están determinadas por las propiedades físicas y químicas tanto del analito como de la matriz.

La preparación de la muestra se puede lograr mediante diversas técnicas, pero todas con el mismo objetivo:

- Eliminar las posibles interferencias
- Si es necesario, transformar un analito a una forma más adecuada que permita su análisis
- Proporcionar un método robusto, reproducible e independiente de las posibles variaciones que puedan existir en la matriz (Mutavdzic, D., S., & J.A., 2007) (Chen, 2008).

2.3. PROCESO DE SEPARACIÓN

Un método analítico se basa en ciertas propiedades que posee el analito para poder conocer la composición de la muestra. Sin embargo en la muestra pueden existir componentes a parte del analito que se manifiesten de la misma forma, por lo que se requiere llevar a cabo un proceso de separación, para así poder asegurar que la señal y la respuesta analítica que se obtengan corresponden al analito y no a otras sustancias.

La separación puede realizarse por precipitación, oxidación, complejación, extracción con un solvente adecuado, por cromatografía, diálisis, destilación, etc. El método que se elija dependerá de la composición de la muestra, de las características del analito y del método analítico a emplear para su determinación (Idabe & Aramendia, 2006).

2.4. PROCESO DE DETECCIÓN

En el proceso de detección el objetivo del método analítico es encontrar las condiciones bajo las cuales la respuesta obtenida se deba únicamente al analito; estas condiciones son, en el caso de la espectrofotometría UV, la(s) longitud(es) de onda donde se observe la máxima o mínima absorción así como los puntos de inflexión y hombros que caracterizan al espectro de absorción de una sustancia, ya que es en estos puntos donde existe una mayor certeza en la lectura. Dichas condiciones se pueden determinar por medio de la investigación del coeficiente de absorción o el coeficiente de extinción de la sustancia además de realizar un barrido espectral de una solución estándar de concentración conocida (Díaz Rodríguez, 2011).

3. CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Los métodos se clasifican bajo los siguientes criterios:

3.1. EN FUNCIÓN DE SU ESTADO REGULATORIO:

- a) Métodos farmacopéicos
- b) Métodos no farmacopéicos

3.2. EN FUNCIÓN DE SU APLICACIÓN (NOM-059-SSA1 Y NOM-073-SSA1):

- a) Métodos para producto a granel,

- b) Métodos para producto terminado,
- c) Métodos para muestra primaria, y
- d) Métodos indicadores de estabilidad.

3.3. EN FUNCIÓN DE LA NATURALEZA DE LA RESPUESTA ANALÍTICA:

- a) Métodos físico-químicos. Cuando la respuesta es de carácter físico (absorción de luz, emisión de luz, voltaje, etc.) o químico (consumo de iones $-OH$, consumo de un acomplejante, etc.)
- b) Métodos biológicos. Cuando la respuesta es de carácter biológico (crecimiento de microorganismos, protección, muerte, etc.)

3.4. EN FUNCIÓN DE SU PROPÓSITO ANALÍTICO:

- a) Métodos para cuantificar el analito (contenido o potencia)
- b) Métodos para establecer la presencia del analito a un límite
- c) Métodos para identificar el analito

Esta clasificación se utiliza para establecer los parámetros de desempeño a estudiar en la validación del método analítico.

3.5. EN FUNCIÓN DE LA NATURALEZA DEL SISTEMA DE MEDICIÓN:

- a) Métodos en los cuales el instrumento de medición de la respuesta analítica, permite medir una señal de ruido (cromatógrafo de líquidos y de gases, espectrofotómetros, etc.)
- b) Métodos en los cuales el instrumento de medición no permite medir una señal de ruido (buretas, medidor de halos, potenciómetros, etc.) (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. (CNQFB), 2002).

4. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación 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; esta actividad se justifica por los siguientes aspectos:

- Moral y Ética,
- Aseguramiento de calidad,
- Económica, y
- Regulatoria (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. (CNQFB), 2002)

Es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos (Asociación Española de Farmacéuticos de la industria (AEFI), 2001). Implica la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y del error sistemático y al azar de un procedimiento, no solo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales.

Por lo tanto, antes de que un método analítico pueda ser aplicado de forma habitual, en primer lugar, debe ser validado (Rozet, 2007).

5. REVALIDACIÓN

La revalidación es la comprobación de que el método analítico mantiene su desempeño cuando existen cambios en la composición del producto, en el método analítico. (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. (CNQFB), 2002).

Se deben establecer y justificar criterios apropiados para la revalidación de métodos analíticos, así como mantener un control de cambios. Cualquier cambio crítico a un método analítico da lugar a uno nuevo y por lo tanto requiere de una validación como tal.

La siguiente tabla establece cambios en el método, su impacto y el parámetro de desempeño a revalidar:

Tabla No. 5.1. Criterios y parámetros a revalidar

Cambio	Impacta	Parámetro a revalidar
Dispositivo de medición del instrumento de medición	Variación en sistema de medición	Precisión del sistema Adecuabilidad del sistema
Concentración de la solución de referencia	Exactitud del método	Linealidad del sistema y Exactitud del método
Formulación del producto	Exactitud del método	Exactitud y repetibilidad del método Linealidad del método Especificidad
Equipos	Variación del método	Tolerancia
Proveedor de columnas	Variación del método	Tolerancia

(Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. (CNQFB), 2002)

Revalidación puede ser necesaria con:

- Cambios en la síntesis del fármaco
- Cambios en la composición del producto terminado
- Cambios en el procedimiento analítico (The International Conference on Harmonisation (ICH), 2005)

6. TIPO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUE PUEDEN SER VALIDADOS

Los métodos analíticos para fines de validación se clasifican en cuatro categorías, ya que requieren de diferentes esquemas de estudio:

Categoría I. Métodos analíticos para cuantificar a un componente específico en muestras de producto terminado o en pruebas de estabilidad, ya sea en fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos u otros analitos de interés (conservadores, solventes, etc.).

Categoría II. Métodos analíticos para la determinación de impurezas (productos de degradación, sustancias relacionadas, isómeros ópticos, etc.) en muestras de fármacos, preparados farmacéuticos y aditivos. Estos métodos pueden incluir determinaciones cuantitativas o pruebas límite. En estas últimas, el interés es establecer si el analito, excede o no, un valor límite. Los métodos de pureza quedan incluidos en esta categoría.

Categoría III. Métodos analíticos utilizados en la determinación de un analito en una muestra con el objeto de evaluar una característica de desempeño del preparado farmacéutico (disolución en cápsulas, liberación controlada en tabletas, entre otras).

Categoría IV. Pruebas de identificación de un analito en muestras de fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos, cuyo propósito es establecer la presencia del analito de interés.

Pudieran presentarse casos de métodos no clasificables en alguna de estas categorías, por lo que el usuario debe establecer con claridad el propósito analítico (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (CPFEUM), 2009).

Las pruebas de identificación están destinadas a garantizar la identidad de un analito en una muestra. Esto se logra normalmente mediante la comparación de una característica de la muestra (por ejemplo, el espectro, el comportamiento cromatográfico, reactividad química, etc.) a la de un patrón de referencia; las pruebas para detectar impurezas pueden ser o bien una prueba cuantitativa o una prueba de límite de la impureza en una muestra. Cualquier prueba está destinada a reflejar con precisión las características de pureza de la muestra. Diferentes características de validación son necesarias tanto para una prueba cuantitativa como para una prueba de límite mientras que los procedimientos de ensayo están destinados a medir el analito presente en una muestra dada (The International Conference on Harmonisation (ICH), 2005).

7. PARÁMETROS DE DESEMPEÑO PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Las características de fiabilidad del método son las que demuestran la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo “los criterios fundamentales de validación” (Asociación Española de Farmacéuticos de la industria (AEFI), 2001)

7.1. MÉTODO DE CONTENIDO/POTENCIA/VALORACIÓN

Para un método de contenido/potencia/valoración, se indican los parámetros de desempeño a estudiar a continuación:

Tabla No. 5.2. Parámetros de desempeño a evaluar para un método de contenido/potencia/valoración

PRECISIÓN/ ADECUABILIDAD DEL SISTEMA	SI
LINEALIDAD DEL SISTEMA	SI
ESPECIFICIDAD ^{1,3}	SI
EXACTITUD Y REPETIBILIDAD	SI
LINEALIDAD DEL MÉTODO	SI
PRECISIÓN DEL MÉTODO O PRECISIÓN INTERMEDIA ²	SI
ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA	*
LIMITE DE DETECCIÓN	NO
LIMITE DE CUANTIFICACIÓN	NO
ROBUSTEZ	*
TOLERANCIA	*

*Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método.

1. La falta de especificidad de un método analítico, puede ser compensada por otra alternativa analítica de soporte, como por ejemplo cromatografía de capa fina.
2. También es definido como un estudio de tolerancia.
3. Un método que es exacto y lineal, por definición es específico al placebo analítico o a los otros componentes de la muestra (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. (CNQFB), 2002).

7.1.1. SISTEMA

Las pruebas de verificación del sistema es una parte integral de muchos procedimientos analíticos y se basan en el concepto de que: el equipo e instrumentos de medición, las operaciones analíticas y las muestras que va a ser analizadas constituyen un sistema integral, que puede ser avaluado como tal.

Esta verificación permite establecer la confiabilidad del sistema antes del procesamiento de las muestras durante el uso rutinario del método; también se le conoce como buen o correcto funcionamiento del sistema (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (CPFEUM), 2009).

La prueba de idoneidad de los parámetros del sistema para establecer un procedimiento en particular dependerá del tipo de procedimiento que se está validando (The International Conference on Harmonisation (ICH), 2005).

7.1.1.1. PRECISIÓN DEL SISTEMA

El sistema: analista, equipo e instrumentos de medición, soluciones de referencia, etc., originan una variabilidad inherente asociada a la respuesta analítica, que en general es aditiva a la del método, por lo que, es importante verificar, que su valor no es una fuente importante de la variabilidad. La precisión del sistema es el grado de concordancia relativa de la respuesta analítica de soluciones de referencia de concentración o magnitud conocida (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (CPFEUM), 2009).

7.1.1.1.1. METODOLOGÍA

Preparar por lo menos un sextuplicado de soluciones a la concentración del analito que represente la concentración de la solución de referencia utilizada o en ciertos casos, la concentración que represente el 100% de la muestra procesada para su medición; preparadas por dilución o por pesadas independientes. Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. (CNQFB), 2002) (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (CPFEUM), 2009).

Calcular S y CV de la respuesta analítica.

Criterios de aceptación

$$CV \leq 1.5\%$$

(Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. (CNQFB), 2002)

7.1.1.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA

La linealidad del sistema es la verificación de que la respuesta analítica y la concentración del analito (puede ser de una sustancia de referencia) se ajustan al modelo matemático, en un intervalo de concentraciones pertinentes a la aplicación analítica (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (CPFEUM), 2009).

Cuando dicha relación (o sus transformaciones matemáticas) no es lineal dentro del intervalo de trabajo, dará lugar a inexactitud del método analítico, por lo que, es conveniente verificarlo bajo las condiciones del laboratorio.

Se debe estimar los parámetros del modelo basado en métodos estadísticos (mínimos cuadrados, máxima verosimilitud, etc.). Deben establecerse criterios de aceptación para definir la calidad de ajuste al modelo, que como mínimo consideren un efecto significativo del modelo, una magnitud mínima del coeficiente de determinación o una prueba estadística de falta de ajuste (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (CPFEUM), 2009).

7.1.1.2.1. METODOLOGÍA

Preparar por lo menos por triplicado cinco niveles de concentración (intervalo) de la solución de referencia ya sea por dilución o por pesadas independientes. La concentración central debe ser igual a la que se prepara la solución de referencia en el método o la que represente el 100% en la muestra procesada para su medición.

Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de medición, reportar la relación concentración vs respuesta analítica (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. (CNQFB), 2002) (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (CPFEUM), 2009).

El método de los mínimos cuadrados es la técnica más ampliamente utilizada para ajustar la recta a un conjunto de puntos, recordemos que la representación de la línea recta es la expresión algebraica $Y = \beta_1 X + \beta_0$ donde β_1 es la pendiente de la recta y β_0 es la ordenada al origen, para estimar si los puntos experimentales en una calibración se ajustan bien o no a una línea recta se calcula el coeficiente de correlación r y el coeficiente de determinación r^2 , este último puede interpretarse como la proporción de la variación entre los valores de Y explicada por X , donde un valor de r^2 cercano a uno indica una concordancia plena entre datos experimentales y datos teóricos, pertenecientes a la recta obtenida por mínimos cuadrados es decir, que los datos experimentales se ajustan bastante bien a una línea recta.

Calcular β_1 , β_0 , r^2 , IC (β_1). El intervalo para contenido/potencia/valoración se sugiere un mínimo de $\pm 20\%$.

Criterios de aceptación

$$r^2 \geq 0.98$$

IC (β_1), no debe incluir el cero

(Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. (CNQFB), 2002)

7.1.2. EXACTITUD

La exactitud de un método analítico, es la concordancia absoluta entre el resultado obtenido con el método y la cantidad verdadera del analito presente en la muestra, a una cantidad fija.

Un método estadístico que demuestre que la magnitud del sesgo es cero, indica que el método es exacto. A la exactitud también se relaciona con el concepto de sesgo de la medición (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (CPFEUM), 2009).

A diferencia de la precisión, que refleja el error aleatorio, la exactitud refleja el error sistemático o la tendencia a él (Hernández B. C., 1997).

La exactitud de un procedimiento analítico debe establecerse en todo su intervalo (U.S. Pharmacopeial Convention (USP), 2006).

7.1.2.1. METODOLOGÍA

Existen diferentes maneras de determinar la exactitud, los siguientes son los más frecuentes en la literatura, y pueden ser utilizados en todos los tipos de análisis:

- Comparación con un método oficial, validado o estandarizado
- Adición estándar
- Comparación de las curvas de regresión lineal de estándares con curvas de regresión lineal de placebos enriquecidos (métodos de curvas de respuesta relativa)
- Comparación de resultados obtenidos de un estándar o material de referencia certificado

En el caso del método de adición estándar se puede llevar a cabo de dos maneras diferentes:

1. Con placebo

Se utiliza una mezcla preparada en el laboratorio de todos los componentes de la matriz de la muestra sin el principio activo a determinar, luego el placebo se enriquece con estándar.

2. Con muestra

Cuando no es posible contar con un placebo, se determina por sextuplicado el contenido promedio del analito en la muestra con el método a validar; una vez conocido el contenido promedio se procede a enriquecer las muestras con estándar. Para preparar las soluciones, en este caso se mantiene constante la cantidad de muestra tomada y se agregan cantidades variables del estándar.

Se deben preparar tres niveles de concentración diferentes, valores sugeridos en la literatura son 80, 100 y 120% de la concentración normal de trabajo del método. Para llevar a cabo el cálculo de % de recuperación, se requiere contar con los datos de contenido del principio activo en la muestra antes de la adición estándar.

Se debe determinar la cantidad recuperada del analito. Calcular el % de recobro de cada placebo analítico, al obtener el cociente de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada expresada en porcentaje.

Calcular \bar{y} , S, CV e IC (μ) del porcentaje de recobro.

Criterios de aceptación

IC(μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo:

97-103% método químico o espectrofotométrico
(Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. (CNQFB), 2002)

Según la ICH, la exactitud puede deducirse una vez que la precisión, linealidad y especificidad se han establecido.

7.1.3. PRECISIÓN

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia relativa entre los resultados obtenidos al aplicar el método analítico, bajo las mismas condiciones analíticas (repetibilidad) o bajo condiciones diferentes de análisis (reproducibilidad), utilizando una muestra homogénea (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (CPFEUM), 2009). Puede considerarse a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. Debe determinarse utilizando muestras originales y homogéneas.

7.1.3.1. REPETIBILIDAD

Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y métodos. (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. (CNQFB), 2002), la repetibilidad se refiere a la variación de los resultados de las muestras, al aplicar el método en una corrida analítica. Es una propiedad crítica del método porque mide la variación del método analítico en la rutina de trabajo. (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (CPFEUM), 2009).

7.1.3.1.1. METODOLOGÍA

En términos generales la precisión, debe determinarse, analizando un número suficiente de alícuotas, que permitan calcular estadísticamente la desviación estándar y la desviación estándar relativa. La ICH, recomienda llevar a cabo un total de nueve determinaciones, que cubran el intervalo especificado en el procedimiento. Para ello se pueden trabajar con tres niveles diferentes de concentración (80, 100 y 120%), con tres muestras independientes de cada nivel.

La repetibilidad se evalúa:

- a) En el caso de exactitud:

Con el coeficiente de variación del % de recobro del analito

- b) En el caso de linealidad:

Con el coeficiente de variación de la relación concentración recuperada contra concentración adicionada (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (CPFEUM), 2009).

Criterios de aceptación

CV del % de recobro:

No mayor de 3% en método químico o espectrofotométrico

(Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. (CNQFB), 2002)

Uno de los factores que puede influir en la repetibilidad del método de análisis es la concentración de analito, ya que la desviación estándar de las respuestas obtenidas aumenta al disminuir la concentración del analito. Por otro lado el valor aceptado del coeficiente de variación depende del intervalo de aceptación especificado en el método de análisis (Asociación Española de Farmacéuticos de la industria (AEFI), 2001).

7.1.3.2. PRECISIÓN INTERMEDIA

La precisión intermedia expresa la variación dentro de un mismo laboratorio, cuando el método analítico se aplica en diferentes días y con diferentes analistas (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (CPFEUM), 2009).

La medida en que debe ser establecida la precisión intermedia depende de las circunstancias en las que está destinado el procedimiento a utilizar. El solicitante debe establecer los efectos de los fenómenos aleatorios en la precisión del procedimiento analítico. Las variaciones típicas que se estudiarán incluyen días, analistas, equipos, etc., no se considera necesario el estudio de estos efectos de forma individual. Se propone el uso de un diseño experimental (matriz) (The International Conference on Harmonisation (ICH), 2005).

7.1.3.2.1. METODOLOGÍA

Analizar por triplicado una muestra homogénea del producto que tenga un nivel cercano o igual al 100% (para contenido/potencia/valoración) en dos días diferentes y por dos analistas diferentes. Reportar el contenido/potencia/valoración del analito de todas las muestras (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. (CNQFB), 2002).

Se evalúa por medio del coeficiente de variación de todos los resultados analíticos, se debe cumplir con el criterio de aceptación establecido (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (CPFEUM), 2009).

Calcular \bar{y} , S, CV del contenido/potencia/valoración, utilizando todos los resultados obtenidos (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. (CNQFB), 2002).

Criterios de aceptación

$CV \leq 3\%$ para métodos químicos o espectrofotométricos

No mayor a una magnitud preestablecida acorde a la especificación del analito en la muestra (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. (CNQFB), 2002).

Los resultados pueden ser analizados utilizando otros métodos estadísticos apropiados que permitan sustentar que la precisión del método es aceptable. Puede ser utilizado un modelo estadístico lineal de diseño experimental ya que es de utilidad cuando se quiere determinar el grado de tolerancia del método a fuentes de variación como estimar la variabilidad entre analistas o entre días (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. (CNQFB), 2002).

7.1.4. REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad se evalúa por medio de un ensayo entre laboratorios. Debe ser considerada en el caso de la normalización de un procedimiento analítico, por ejemplo, para la inclusión de procedimientos en las farmacopeas. Estos datos no son parte del expediente de autorización de comercialización (The International Conference on Harmonisation (ICH), 2005).

7.1.5. LINEALIDAD DEL MÉTODO

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido. Siempre que sea posible se busca una respuesta de tipo lineal que facilitara su trazado, interpolación e interpretación (Asociación Española de Farmacéuticos de la industria (AEFI), 2001).

Todo método analítico no debe presentar sesgo (error sistemático) dentro del intervalo de cuantificación, por lo que es necesario seleccionar al menos tres niveles de concentración (intervalo), que permitan demostrar exactitud y linealidad (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (CPFEUM), 2009).

7.1.5.1. METODOLOGÍA

La linealidad puede determinarse por la aplicación del método analítico, a una muestra (placebo adicionado o muestra adicionada de analito), obtenida de acuerdo a un procedimiento específico para su preparación. Dicha muestra debe ser preparada al menos a tres niveles de concentración del analito por triplicado, para ser analizadas aplicando el método analítico. Si no es posible obtener muestras que contengan todos los componentes del producto, la linealidad puede determinarse por comparación de los resultados obtenidos, aplicando el método en estudio, con los resultados obtenidos al aplicar un segundo método, bien caracterizado, en los tres niveles de concentración seleccionados (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (CPFEUM), 2009).

El intervalo de la concentración del analito adicionado depende del propósito del método y debe incluir la especificación. La siguiente tabla sugiere intervalos para el estudio de linealidad, en la cual la especificación se maneja como porcentaje, por ejemplo el 100% puede representar 100mg/g de muestra, 10 ppm, 5 mg/mL etc. (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. (CNQFB), 2002).

Tabla No. 5.3. Intervalos para el estudio de linealidad		
PROPÓSITO	ESPECIFICACIÓN	INTERVALO MÍNIMO
CONTENIDO/ POTENCIA/VALORACIÓN	LÍMITE INFERIOR (LI)	LI -10% A LS +10%
	LÍMITE SUPERIOR (LS)	
EJEMPLO		
VALORACIÓN	90% - 110%	80% a 120% Por lo tanto los niveles podrían Ser 80%, 100% y 120%

Reportar la relación cantidad adicionada vs cantidad recuperada. Utilizar el método de estimación por mínimos cuadrados y calcular β_1 , β_0 , r^2 , IC (β_1), IC (β_0) y $CV_{y/x}$.

Calcular el % de recobro de cada placebo o muestra adicionada al obtener el cociente de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada expresada en porcentaje. Calcular, S, CV, IC (μ) del porcentaje de recobro.

Criterios de aceptación

Cantidad adicionada vs cantidad recuperada:

$$r^2 > 0.98$$

El IC (β_1) debe incluir la unidad

El IC (β_0) debe incluir el cero

El $CV_{y/x}$ del porcentaje de recobro:

No mayor de 3% en método químico o espectrofotométrico

No mayor a una magnitud preestablecida acorde a la especificación del analito en la muestra.

Porcentaje de recobro:

El IC (μ) debe incluir el 100% o el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo:

97-103% método químico o espectrofotométrico

CV del porcentaje de recobro:

No mayor de 3% en método químico o espectrofotométrico

No mayor a una magnitud preestablecida acorde a la especificación del analito en la muestra.

Otro criterio de aceptación debe ser justificado.

Es conveniente trazar la gráfica de la cantidad adicionada (x) vs la cantidad recuperada (y), incluyendo en ella la ecuación, línea de ajuste y el coeficiente de determinación. (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. (CNQFB), 2002)

7.1.6. ESPECIFICIDAD

Es la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de componentes que se pueden esperar que estén presentes. Normalmente, estos podrían incluir impurezas, productos de degradación, matriz, etc. (U.S. Pharmacopeial Convention (USP), 2006).

En una valoración, la demostración de especificidad requiere evidencia de que el procedimiento no resulta afectado por la presencia de impurezas o excipientes. En la práctica, esto puede hacerse agregando al fármaco o producto farmacéutico una cantidad conocida de excipientes o de impurezas en concentraciones adecuadas, y demostrando que el resultado del análisis no resulta afectado por la presencia de éstos materiales extraños (U.S. Pharmacopeial Convention (USP), 2006).

La especificidad puede verificarse de diferentes maneras, dependiendo del tipo de análisis a realizar. Es importante tomar en cuenta, que en aquellos casos en que la matriz de la muestra es variable, tanto en términos de su composición, así como en la fuente de las materias primas que las componen (diferentes proveedores, diferentes orígenes), se recomienda que la especificidad se establezca para las diferentes composiciones o fuentes de forma independiente.

La presencia de interferencias puede tener distintos efectos en la determinación del analito como:

- Imposibilitar su inequívoca identificación (aparición de falsos positivos).
- Distorsionar la respuesta del analito (afecta normalmente a la pendiente y ordenada en el origen en la recta del calibrado). Este efecto puede delatar la presencia de interferencias desconocidas, aunque también puede ser consecuencia de recuperaciones no lineales) (Velandia, 2008).

En la mayoría de los casos, los métodos cuantitativos que son específicos/selectivos, son exactos (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (CPFEUM), 2009).

7.1.6.1. METODOLOGÍA

Para determinar la especificidad, se debe demostrar que la respuesta analítica se debe únicamente al analito (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (CPFEUM), 2009).

Para el caso de especificidad se debe determinar, la respuesta a los componentes como: aditivos, sustancias auxiliares, sustancias relacionadas estructuralmente al fármaco, etc. Para el caso de selectividad se debe determinar la respuesta a componentes como: sustancias de degradación del fármaco originadas por la influencia de las condiciones de almacenamiento (temperatura, humedad, luz, etc.) o por condiciones extremas (hidrólisis, oxidación, etc.) (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (CPFEUM), 2009).

Establecer las posibles sustancias interferentes y adicionar cantidades conocidas de éstas, solas o combinadas a la muestra y evaluar su respuesta bajo las mismas condiciones de análisis.

Para métodos de contenido/ potencia/ valoración, se analizan placebos del producto y cuando proceda sustancias relacionadas, precursores, homólogos y una mezcla de ellos con el producto.

Si no se cuenta con los productos de degradación se puede favorecer la inestabilidad del analito en la muestra:

- 1) Someter el analito, el placebo y la muestra a temperaturas de 20°C por debajo del punto de fusión del analito de 2 a 4 semanas.
- 2) Exponer el analito, placebo y muestra a luz UV, fluorescente y/o humedad relativa.
- 3) Hacer soluciones del analito, ajustando el pH de 1 a 2 y/o de 10 a 12 y someterlas a 60°C – 80°C.
- 4) Adicionar peróxido de hidrógeno para favorecer la oxidación del analito.

El tiempo y las condiciones se seleccionan con el fin de degradar al analito a niveles del 15 al 30%. Estos estudios no se realizan en analitos con propiedades reactivas.

Para métodos no selectivos, la especificidad se sustenta con los resultados de exactitud y linealidad, si el método cumple con los criterios de aceptación.

Criterios de aceptación

La respuesta del método solo se deberá al analito (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. (CNQFB), 2002).

7.2. MÉTODO PARA CUANTIFICAR MUESTRAS DE PERFILES DE DISOLUCIÓN

7.2.1. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN CON EL FÁRMACO

7.2.1.1. LINEALIDAD

Preparar una curva con cinco puntos de concentración, sin incluir el punto cero. Realizar esto por duplicado.

Criterios de aceptación

Coefficiente de regresión mayor o igual que 0.99
Error relativo debido a la regresión no mayor que el 2 %.

7.2.1.2. PRECISIÓN

Con los datos de linealidad del sistema calcular el coeficiente de variación del factor de respuesta.

Criterios de aceptación

Coefficiente de variación del factor de respuesta menor o igual al 2%

7.2.1.3. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Determinar las condiciones de temperatura y tiempo entre otros, en las que el compuesto permanezca estable.

Criterios de aceptación

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

7.2.1.4. INFLUENCIA DEL FILTRO

Determinar que no existe adherencia del fármaco al filtro.

Criterios de aceptación

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

7.2.2. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN CON EL MEDICAMENTO

Validar el método, tanto para el medicamento de prueba como para el medicamento de referencia.

7.2.2.1. LINEALIDAD

El método debe demostrar una linealidad con al menos 5 puntos de concentración, sin incluir el punto cero. A partir de diez unidades que representen el peso promedio, en relación a la cantidad equivalente del principio activo en la unidad. Realizar esto al menos por duplicado.

Criterios de aceptación

Coefficiente de regresión mayor o igual que 0.99
Error relativo debido a la regresión no mayor que el 2 %.
Coeficiente de determinación debe ser mayor o igual a 0.98.
Valor cero debe quedar incluido en el intervalo de confianza al 95% para la ordenada al origen.

Valor uno debe quedar incluido en el intervalo de confianza al 95% para la pendiente.
Coeficiente de variación de la regresión debe ser menor o igual al 3%.

La comparación entre las pendientes del sistema y del método no debe presentar diferencias significativas.

7.2.2.2. EXACTITUD

Con los datos de concentración cuantificada, obtenidos en la linealidad del método, calcular el porcentaje cuantificado.

Criterios de aceptación

El 100% debe quedar incluido en el intervalo de confianza al 95% o el promedio del porcentaje cuantificado debe encontrarse entre 97% y 103%.

7.2.2.3. PRECISIÓN

7.2.2.3.1. REPETIBILIDAD

Con los datos de exactitud del método, calcular el coeficiente de variación del porcentaje cuantificado.

Criterios de aceptación

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

7.2.2.3.2. REPRODUCIBILIDAD INTRALABORATORIO

En caso de que participen dos o más analistas evaluar su efecto en la precisión del método. Para cada condición de interés analizar, como indica el método propuesto, una muestra homogénea de la disolución del producto, por duplicado y calcular el porcentaje cuantificado.

Criterios de aceptación

El coeficiente de variación global, del porcentaje cuantificado, debe ser menor o igual al 3%.

7.2.2.4. SELECTIVIDAD

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

8. MÉTODO DE ADICIONES PATRÓN

En el método de adición estándar, una cantidad conocida de analito es añadida a una especie y el incremento es la señal medida. El incremento relativo en la señal nos permite inferir cuanto analito fue de la especie original. La adición estándar es empleada cuando la matriz de la muestra es compleja o desconocida.

En el método de adiciones patrón, un cierto volumen de la solución de la muestra en si está presente en la misma proporción en todas las soluciones de referencia. Esto es equivalente a adicionar cantidades de estándar de analito a la solución muestra, de ahí el término de adiciones estándar. En adición, los componentes de la solución muestra no necesitan ser identificados ya que el “efecto matriz”, es decir el aumento o disminución en la señal de absorbancia debido a la presencia de otros componentes en la muestra es eliminado. Esto resuelve el problema de interferencias porque la “matriz” de la muestra está siempre presente a la misma concentración de componentes como en la muestra.

Una forma de lograr esto es tomando volúmenes iguales de solución problema, pero todas salvo una son “tratadas” por separado con cantidades conocida y diferentes de analito y todas se diluyen al mismo volumen. Después se determinan las señales instrumentales para todas las soluciones y los resultados se representan como muestra la figura No. 5.2. La señal se representa en el eje y ; mientras que en el eje x la escala se expresa en términos de la cantidad de analito añadida. (Miller & Miller, 1993)

La curva de calibración adquiere un aspecto ligeramente diferente en el método de adiciones patrón, es una representación gráfica de absorbancia frente a la concentración añadida (a la muestra), en lugar de la concentración. El eje y de tal trama no está en su posición verdadera. Está desplazado a la derecha por la concentración en la solución con concentración cero, la cual es la solución de la muestra. La concentración de esta solución es la concentración buscada.

La recta de regresión se calcula de manera usual y mediante un cálculo matemático se determina la concentración de x cuando $y=0$, en la figura No. 5.2. se muestra claramente que este valor está dado por β_0/β_1 , la razón de la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión (Miller & Miller, 1993)..

Un requisito importante del método de adiciones patrón es que todas las soluciones, deben ser aforadas al mismo volumen, cualquier posible interferencia estará siempre presente a las mismas concentraciones y representara un efecto igual sobre la respuesta que se obtenga en la adición estándar. También, es importante considerar la naturaleza del analito para utilizar soluciones apropiadas y así evitar su descomposición o posibles interacciones no deseadas. La linealidad del método se conserva si el intervalo creciente de respuesta es de 2 a 4 veces mayor, este es un parámetro indispensable para la validación. (Hernández & Solís, 2011)

El método de adiciones patrón es una aproximación al problema de efectos de interferencia por la matriz y mediante un análisis apropiado de los datos, la técnica es capaz de detectar y eliminar algunas tendencias de error pero tiene algunas desventajas como son la difícil automatización y que puede utilizar cantidades de muestra más grandes que en otros métodos.

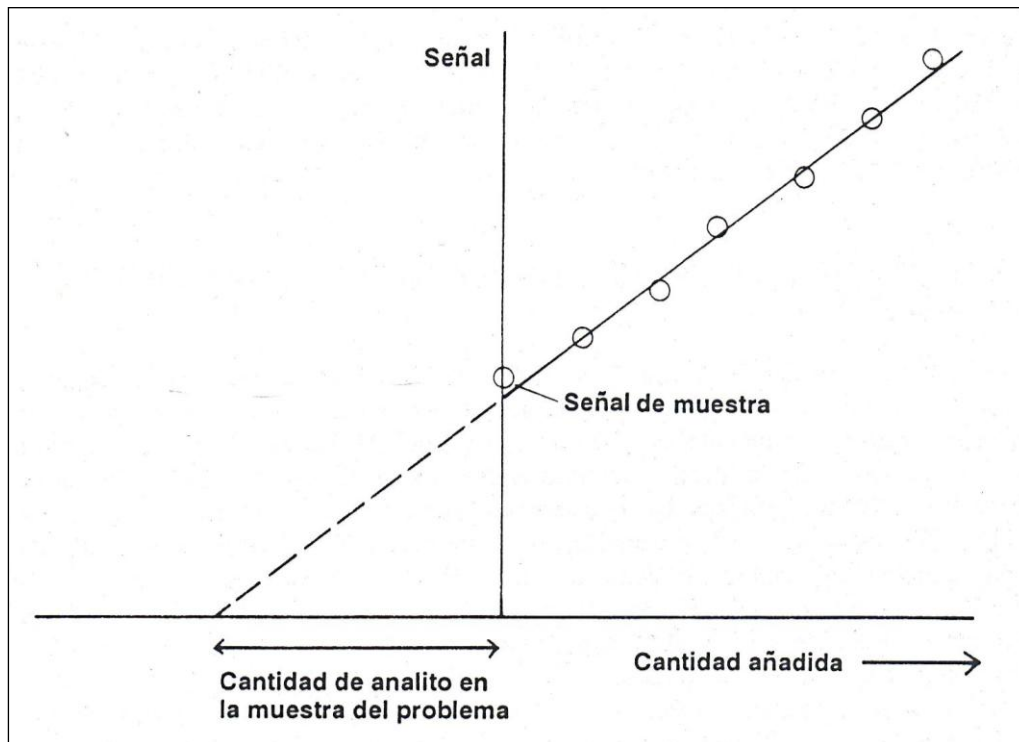


Figura No. 5.2. Método de adición estándar

9. 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 moleculares.

En el sistema biológico, la disolución del fármaco en medio acuoso es una importante condición previa de la absorción sistémica (Shargel & Yu, 1993). Desde el punto de vista macroscópico la disolución corresponde a la desintegración de la estructura cristalina bajo la acción del disolvente que la 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 (López Arellano & Gómez Almaraz, 2005).

Esto también puede expresarse a través del término “velocidad de corte” en la interfase, es decir, de la dinámica de la renovación del área de contacto entre sólido en el líquido. El aspecto cuantitativo del fenómeno, se expresa a través de modelos matemáticos que incluyen una constante de velocidad de disolución (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996). Asimismo, puede ser considerada como el fenómeno 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 (López Arellano & Gómez Almaraz, 2005).

9.1. VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN

La velocidad de disolución *in vitro* es la cantidad de principio activo contenido en una forma farmacéutica sólida disuelto por unidad de tiempo bajo condiciones estandarizadas de interfase sólido-líquido, temperatura y composición de medio. La velocidad de disolución *in vivo* se define como la cantidad de fármaco disuelto por unidad de tiempo en fluidos biológicos en el sitio de absorción, a partir de la forma farmacéutica intacta o de fragmentos o partículas formadas a partir de la misma después de la administración (López Arellano & Gómez Almaraz, 2005).

En biofarmacia, generalmente se manejan dos términos relacionados con la disolución de un sólido en un líquido. Uno de ellos es el de velocidad intrínseca de disolución y se refiere a las características de disolución de un fármaco puro, en condiciones de superficie constante. El segundo término, es la velocidad aparente o global de disolución, el cual se aplica al proceso de disolución de fármacos contenidos en un medicamento, sin considerar la superficie constante del sólido (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

9.1.1 INTERCAMBIO SÓLIDO-LÍQUIDO

El fenómeno de disolución está regido por la afinidad natural (energía de disolución favorable) que exista entre las moléculas del sólido y las del líquido. Ahora bien el primer aspecto necesario para iniciar el proceso que finalmente conduzca a la disolución, es el intercambio que se efectuó entre

el sólido y el líquido, a través de la penetración inicial de éste, en las partículas del sólido. A su vez, el avance del líquido dentro de la partícula sólida está en función de:

- Tamaño y distribución de los poros del sólido.
- La tensión superficial del sólido
- El ángulo de contacto o humectación entre ambas fases (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

A. Tamaño y distribución de los poros del sólido

Los polvos empleados en productos farmacéuticos generalmente son de naturaleza porosa de origen. Por otra parte, la forma farmacéutica sólida que potencialmente presentan los mayores problemas para permitir la disolución del fármaco que contiene, es la del comprimido (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

B. Tensión superficial del líquido

Cuando las fases de un sistema tienden a permanecer aisladas y retraídas en sí mismas, se dice que en la zona límite entre ellas, existe una alta tensión interfacial. Por lo tanto, los fenómenos de superficie en la interfase entre sólido y líquido, juegan un papel muy importante en el fenómeno de disolución y una manera de modificar significativamente la tensión interfacial, es el empleo de los llamados agentes tensoactivos (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

C. Ángulo de humectación

La humectación de un sólido por un líquido está en función de la fuerza de atracción entre ambas moléculas de ambas fases (hidrofilia e hidrofobia), menos las fuerzas de cohesión entre las moléculas del líquido puro (tensión superficial) (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

Una medida de la tendencia de humectación de un sólido por un líquido, es el llamado ángulo de contacto o de humectación, el cual se define como el espacio que impide la formación o en el cual no existe una interfase, entre los elementos de interés (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

En la Figura No. 5.3. se ilustra el concepto, y puede observarse que cuando el ángulo de contacto entre el sólido y el líquido es mayor de 90° , el líquido tiende a permanecer aislado del sólido, y el espacio entre estas fases, es ocupado por una tercera, en este caso gaseosa. La adición de un agente tensoactivo disminuye la tensión entre el sólido y el líquido, favoreciendo un aumento en el área de contacto entre éstos. Así el aire es desplazado y se propicia la humectación del sólido y la posterior disolución (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

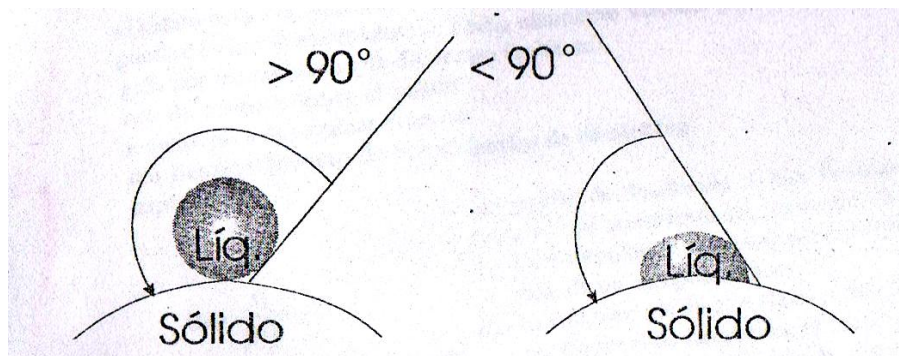


Figura No. 5.3. Esquema representativo del ángulo de humectación (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

9.1.2 HUMECTACIÓN DE LA PARTÍCULA

El contacto de una partícula sólida con un líquido permite poner de relieve su mayor o menor aptitud a ser “mojada”; esta aptitud depende, entre otras cosas, de la tensión superficial del líquido. Aunque sea posible medir fácilmente la tensión interfacial entre un líquido y un gas o entre dos líquidos, la humectación de una partícula, y en general de un polvo, no puede ser apreciada por métodos sencillos (Aiache & Devissaguet, 1983).

10. TEORÍAS DE DISOLUCIÓN

Una vez que el sólido ha comenzado a sufrir el proceso de humectación comienza el fenómeno de disolución de las moléculas de éste en el líquido. Cuando se trata de una sola sustancia pura cuyo tamaño de partícula es homogéneo (polvo monodisperso), la determinación del proceso físico que ocurre y el tratamiento matemático de datos experimentales de disolución son más simples que cuando se trata de formas farmacéuticas sólidas. Estas últimas deben de sufrir etapas adicionales de desintegración, disgregación y liberación del fármaco con el objeto de que la disminución del tamaño de partícula, genere una mayor área disponible para el intercambio o disolución del sólido de interés (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

Las teorías de disolución se han derivado a partir de los modelos que consideran las siguientes condiciones:

- A. La disolución de una partícula única de forma esférica, de un compuesto puro.
- B. El volumen del disolvente es entre cinco y diez veces mayor al de saturación; es decir que la solución final es infinitamente diluida. Esta condición se denomina “sink” esta condición permite la obtención de expresiones matemáticas sencillas mediante las cuales se puede cuantificar el proceso cinético a través de la denominada constante de disolución (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

Las teorías de disolución consideradas son:

- a. Teoría de capa estacionaria o de difusión (Nerst y Brunner, 1904)
- b. Teoría de renovación superficial o penetración (Dankwerst, 1951)
- c. Teoría combinada de Nerst- Dankwerst (Toor y Marchelo, 1958)
- d. Teoría de la velocidad limitada de solvatación o doble barrera (Nedich y Kildsig, 1972)

10.1. TEORÍA DE CAPA ESTACIONARIA O DE DIFUSIÓN (NERST Y BRUNNER, 1904)

En 1897 Noyes y Whitney desarrollaron una ecuación, sobre la base de la ecuación de Fick para describir el fenómeno de disolución (Gennaro A. R., 2003)

$$\frac{dc}{dt} = K(C_s - C_t)$$

Donde dc/dt es la velocidad de disolución del fármaco, K es la constante de proporcionalidad, C_s es la concentración de saturación (solubilidad máxima), C_t es la concentración al tiempo y $C_s - C_t$ es el gradiente de concentración. La constante de proporcionalidad K también se denomina constante de disolución y se ha demostrado que la ecuación sigue una cinética de disolución de primer orden (Gennaro A. R., 2003).

En sus experimentos Noyes y Whitney mantuvieron un área de superficie constante. Sin embargo dado que esta condición no siempre es aplicable, Brunner y Tolloczko modificaron la ecuación para incorporar el área de superficie S , como una variable separada (Gennaro A. R., 2003).

$$\frac{dc}{dt} = K_1 S (C_s - C_t)$$

Para poder explicar el mecanismo de disolución, en 1904 Nernst propuso la teoría del modelo de película. Bajo la influencia de fuerzas no reactivas o químicas, una partícula sólida sumergida en un líquido es sometida a dos pasos consecutivos (Gennaro A. R., 2003).

1. La solución del sólido en la interfase, con formación de una delgada capa estática o película h alrededor de la partícula.
2. La difusión desde esa capa es el límite con la masa del líquido.

El primer paso, la solución es casi instantáneo; el segundo la difusión es mucho más lento y por tanto es el paso limitante (Gennaro A. R., 2003).

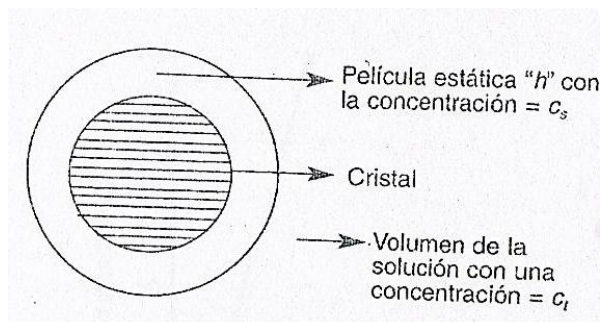


Figura No. 5.4. Modelo de capa de difusión (Gennaro A. R., 2003)

Durante el mismo año Brunner estaba investigando otros factores, además del área de superficie, que afecta el proceso de disolución para poder determinar los componentes fundamentales, de la constante de proporcionalidad. Por medio de la primera ley de difusión de Fick y la teoría propuesta por Nernst, Brunner amplió la ecuación para incluir el coeficiente de difusión, D , el espesor de la capa de difusión estática, " h ", y el volumen del medio de disolución, " v ", llegando a:

$$\frac{dc}{dt} = K_2 \frac{DS}{vh} (C_s - C_t)$$

La constante de proporcionalidad K_2 se conoce como constante de disolución intrínseca y es característica de cada compuesto químico (Gennaro A. R., 2003).

En esta teoría se asume que el proceso de disolución involucra:

1. Una primera etapa en la que las moléculas de sólido se solubilizan y equilibran instantáneamente en la interfase ($x=0$), formando una capa estacionaria inherente a la partícula que se disuelve cuya concentración es máxima o de saturación. Por lo tanto, no hay un gradiente de concentración en esta capa estacionaria de espesor " h ".
2. La segunda etapa en la cual la transferencia de masa en la interfase hacia el seno líquido, es el proceso más lento y se efectúa exclusivamente por difusión. Por tanto la velocidad de disolución del sólido está determinada por el movimiento Browniano de difusión de las moléculas disueltas en la capa estacionaria ($x=0$ a $x=h$)
3. Se considera que el coeficiente de difusión de las moléculas disueltas de soluto, es independiente de la concentración. El coeficiente de difusión es una constante de proporcionalidad que relaciona la cantidad de materia que difunde en un tiempo y en un área dada en función de un gradiente de concentración.
4. Se considera que el disolvente circula sobre la partícula sólida en una dinámica o régimen de flujo laminar, sin turbulencias (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

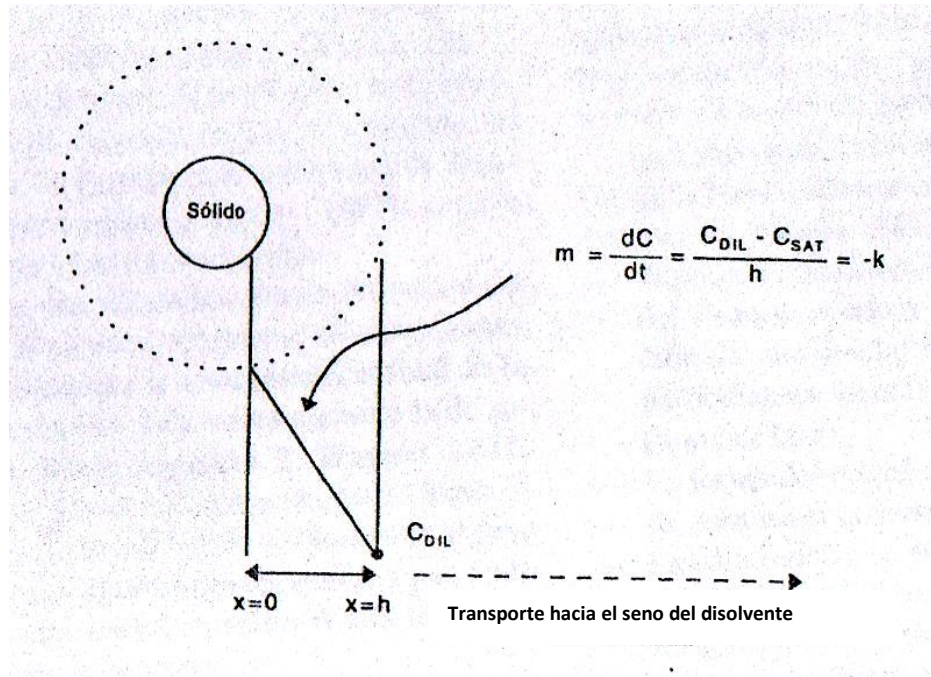


Figura No. 5.5. Esquema del modelo de la capa estacionaria de difusión ($x=0$, $x=h$) (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

Así mismo la teoría de la capa estacionaria y la ecuación de Noyes-Whitney, permiten establecer que:

- Las partículas pequeñas de sólido se disuelven más rápidamente que las grandes, ya que las primeras presentan mayor área disponible para interactuar con el disolvente.
- La agitación incrementa la velocidad de disolución, ya que al aumentar ésta, disminuye el grosor de la capa estacionaria de difusión y las moléculas disueltas están más cercanas a la gran masa del disolvente.
- A mayor solubilidad del soluto en un disolvente dado, mayor será su velocidad de disolución puesto que habrá mayor gradiente de concentración.
- A mayor viscosidad del disolvente, la velocidad de disolución será menor ya que la constante de difusión o traslado de las moléculas de soluto es inversamente proporcional a la viscosidad del medio (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

11. VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN DE UN FÁRMACO CONTENIDO EN UN MEDICAMENTO

La disolución *in vitro* de un fármaco a partir de un sólido puro o una forma farmacéutica está influenciada por varios factores. Estos factores pueden estar relacionados con las características fisicoquímicas del fármaco, la forma farmacéutica y las condiciones de la prueba en disolución *in vitro* (Nielsen & Birger, 2010).

La velocidad de corte o de renovación de interfase, está en función de diversas variables que deben de ser controladas, a fin de obtener procesos y datos de disolución constantes, reproducibles y veraces, estas son: (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

- Patrón de flujo del disolvente
- Viscosidad y tensión superficial del disolvente
- Gases disueltos en el disolvente (la vibración de cualquier fuente, transmitida al medio de disolución favorece la formación de burbujas en el líquido) y dado que la energía cinética externa, también de este modo altera el proceso de disolución (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

A su vez, el patrón de flujo (laminar o turbulento) está en función de:

- Geometría del recipiente que contiene el medio de disolución.
- Geometría y velocidad del aditamento agitador del medio.
- Calibración geométrica al milímetro del equipo de disolución en conjunto (disolutor) (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

El patrón de flujo del disolvente, puede ser modificado por la distribución, tamaño y densidad de las partículas en el medio de disolución y estos factores a su vez están en función de las propiedades fisicoquímicas de las materias primas, del proceso (y/o reproceso) de fabricación y edad de la forma farmacéutica (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

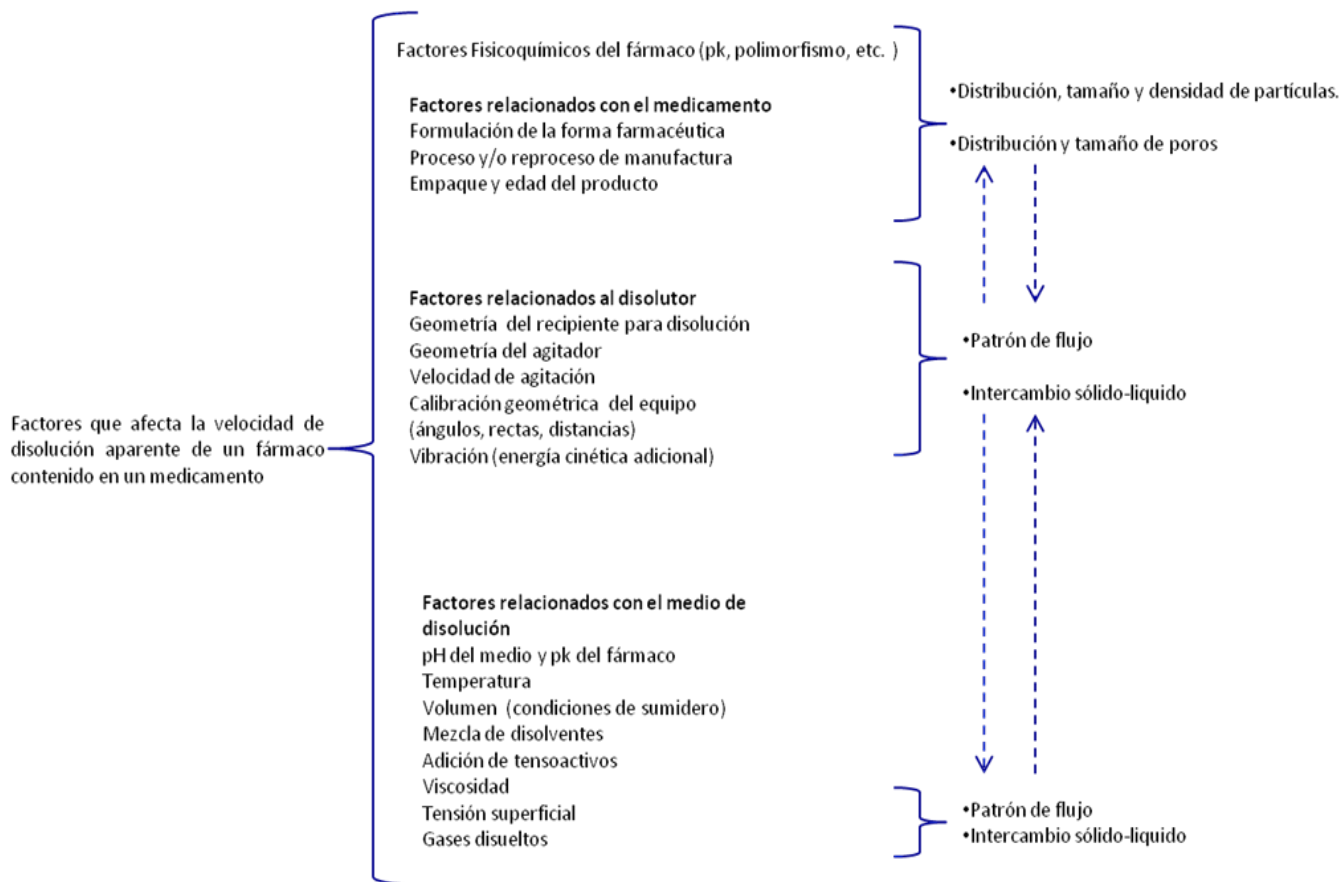


Figura No. 5.6. Factores que afecta la velocidad de disolución aparente de un fármaco (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996)

Factores físicoquímicos del fármaco puro, estos factores incluyen: pK, estado químico (ácido, base, sal, anhidro, hidratos), estado cristalino (amorfo, polimorfos) tamaño y forma de la partícula. Todos estos factores se determinan en condiciones dadas, las características de disolución propias o intrínsecas del compuesto (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

12. EFECTOS DE PARÁMETROS DE PRUEBAS SOBRE LA VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN

12.1 FACTORES QUE DEPENDEN DEL SISTEMA

12.1.1. AGITACIÓN

La relación entre la intensidad de agitación y la velocidad de disolución varía de forma considerable con el tipo de agitación usada, el grado de flujo laminar y turbulento en el sistema, la forma y diseño del agitador y las propiedades físicoquímicas del sólido. Cuando se utiliza un dispositivo agitador, como la cesta, la paleta, un filtro giratorio, etc., la velocidad de agitación genera un flujo que continuamente modifica la interfase líquido-sólido entre el solvente de forma similar a la velocidad de flujo en el aparato de disolución de flujo continuo (Gennaro A. R., 2003).

En las pruebas de disolución aparente *in vitro*, deben de conservarse patrones de flujo laminar, afín de obtener resultados constantes y reproducibles. Un flujo turbulento causa intercambios de tipo azaroso entre el sólido y el líquido y por tanto arroja resultados no reproducibles (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

Por lo general un flujo turbulento está asociado a altas velocidades de agitación y baja densidad de las partículas a disolver. Por lo anterior, los aparatos tiene especificaciones de velocidad relativamente bajas, 100 rpm en promedio para el método de canastilla, de 50 a 75 rpm para el método de paletas, y una velocidad de flujo de 10 -20 mL/min para el aparato de flujo continuo; en general estos valores son similares entre sí (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

Así mismo se ha demostrado que la velocidad de agitación relativamente baja, tiene mayor poder de diferenciación entre los perfiles de disolución de distintos productos. En cambio una alta velocidad de agitación, favorece una rápida dispersión de partículas, y la velocidad de disolución estará regida principalmente por el rápido cambio de tamaño de partículas (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

De acuerdo con la teoría de Nernst y Brunner, el espesor de la capa del líquido que rodea a las partículas es inversamente proporcional a la velocidad de agitación. Si la disolución de un sólido está controlada por la difusión de moléculas disueltas que va soltando la superficie sólida, el espesor de la capa de difusión es un factor importante en el proceso de disolución (López Arellano & Gómez Almaraz, 2005).

12.1.2. GASES DISUELTOS EN EL MEDIO

La presencia de aire o de gases disueltos en el medio de disolución, pueden alterar los resultados de disolución por las siguientes causas:

- Alteración del patrón normal de flujo del fluido, debida a la distribución azarosa de burbujas en el medio.
- Disminución del área de contacto entre el sólido y el líquido, por depósito de burbujas sobre la forma de dosificación, o en la canastilla que contiene.
- Alteración del pH del medio por bióxido de carbono disuelto, que afecta marcadamente la disolución de ácidos débiles (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

12.1.3. VOLUMEN DEL MEDIO

De acuerdo a las leyes de la fisicoquímica la disolución es favorecida bajo condiciones sink. Es decir debe de existir un gradiente de concentración favorable tal que la concentración final del solido disuelto sea entre cinco y diez veces menor que la de saturación. Esta condición sink también se da

in vivo, ya que conforme se disuelve el principio activo, es absorbido y trasladado a otro sitio por el fluido sanguíneo (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

Para la mayoría de los fármacos, 900 mL de medio de disolución son suficientes para alcanzar condiciones sink, pero para aquellos con valor de hidrosolubilidad muy pequeño, este volumen es muy insuficiente y para estos casos se han sugerido las siguientes alternativas (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

- El empleo del aparato de flujo continuo, el cual a través de renovación constante de fluido, extrae o disuelve pequeñas cantidades de moléculas de fármaco conforme se disuelven, de modo que siempre habrá gradiente de concentración favorable a la disolución, con pequeños pero continuos volúmenes de disolvente.
- El empleo de agentes tensoactivos no iónicos en baja concentración.
- El empleo de un medio constituido por dos fases en el cual la fase orgánica, actúa como sumidero, al extraer la fase acuosa, las moléculas del fármaco conforme se va disolviendo. Este método ha sido criticado por falta de reproducibilidad en los resultados.
- Empleo de codisolventes (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

12.1.4. TEMPERATURA

El efecto de las variaciones de la temperatura del medio de disolución depende principalmente de las curvas de temperatura/solubilidad del fármaco y excipientes en el preparado. Para una molécula disuelta el coeficiente de difusión D , depende de la temperatura T de acuerdo con la ecuación de Stokes (Gennaro A. R., 2003).

$$D = KT / (6\pi\eta r)$$

Donde K es la constante de Boltzmann y $6\pi\eta r$ es la fuerza de Stokes para una molécula esférica (η es la viscosidad en unidades de poise y r es el radio de la molécula) (Gennaro A. R., 2003).

La solubilidad del fármaco está en función de la temperatura del sistema, por tanto para obtener resultados veraces y reproducibles, es necesario controlar la temperatura durante todo el tiempo de prueba, de modo que no varíe más allá de medio grado centígrado, según especificaciones farmacopéicas, aunque variaciones menores de este valor, ya pueden crear diferencias en la velocidad de disolución, entre las unidades de prueba (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

12.2 COMPOSICIÓN DEL MEDIO

12.2.1 pH DEL MEDIO

La elección del pH del medio, para una prueba de disolución está en función de diversos factores como son:

- Características fisicoquímicas del fármaco y en su caso, de los excipientes, de tal modo de favorecer y mantener constante el proceso de disolución del principio activo.
- En general siempre que las características del principio activo lo permitan, se elegirá agua destilada como medio de disolución.
- La disolución en condiciones de pH variable con ácido clorhídrico 0.1N y solución amortiguadora de fosfatos, se emplea para preparaciones de tipo entérico, y para las de acción prolongada a fin de simular las condiciones del tracto gastrointestinal (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

La solubilidad de un electrolito débil varía considerablemente en función del pH. La velocidad de disolución de un ácido débil aumenta si se incrementa el pH en tanto que la velocidad de disolución de las bases débiles disminuyen (López Arellano & Gómez Almaraz, 2005).

12.2.2 VISCOSIDAD

Si se considera que el coeficiente de difusión es inversamente proporcional a la viscosidad del medio, resulta evidente que esta puede afectar de forma negativa la velocidad de disolución de un sólido en un medio acuoso. (López Arellano & Gómez Almaraz, 2005).

Por otra parte, cuando el intercambio entre moléculas en estado sólido y moléculas en estado líquido es rápido, el fenómeno de transporte a través de un medio viscoso, será entonces el paso limitante de la disolución (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

12.2.3 TENSIÓN SUPERFICIAL DE MEDIO

La adición de pequeñas cantidades de agentes tensoactivos al medio de disolución disminuye la tensión superficial permitiendo una mayor facilidad de penetración del disolvente en los poros del sólido, y por tanto un aumento en el área de contacto disponible para disolución. Se puede aceptar su empleo, en casos plenamente justificados y con la validación correspondiente del método de disolución y del método analítico. (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

12.3 FACTORES QUE DEPENDEN DEL SÓLIDO A DISOLVER

12.3.1 SOLUBILIDAD

La solubilidad es un parámetro termodinámico que representa la concentración de la solución de un principio activo en equilibrio con el soluto. Según la ecuación de Noyes y Whithney, la solubilidad de una sustancia representa el factor más importante en la velocidad de disolución. Si la superficie del sólido permanece constante durante todo el proceso, la velocidad de disolución es directamente proporcional a la solubilidad (López Arellano & Gómez Almaraz, 2005).

Varios factores que pueden modificar la solubilidad de una sustancia sólida:

- A. Naturaleza química del sólido
- B. Tamaño de partícula
- C. Coeficiente de solubilidad
- D. Polimorfismo
- E. Impurezas

El tamaño de partícula afecta, puesto que influye en la superficie de la partícula y, por tanto puede aumentar la velocidad de disolución. Al disminuir el tamaño de partícula (por ejemplo al micronizar un principio activo), aumenta la superficie específica y la velocidad de disolución. El coeficiente de solubilidad depende, entre otros factores, de si la molécula puede o no ser ionizada, si se utiliza una sal (y el tipo de sal), si es una forma anhidra o hidratada (generalmente las formas anhidras son más solubles) (Vila Jato, 2001).

Que el principio activo este o no cristalizado también afecta la solubilidad y la velocidad de disolución. Las formas amorfas generalmente son más solubles que las formas cristalinas. Otra peculiaridad importante, en el caso de formas cristalinas, es la posible formación de polimorfos. Los polimorfos pueden presentar distintas características de solubilidad y, por lo tanto, distinta biodisponibilidad. Por todas estas razones es necesaria una buena caracterización fisicoquímica (Vila Jato, 2001).

12.3.2 FACTORES DE FORMULACIÓN QUE INFLUYEN EN LA SOLUBILIDAD

Los excipientes que se utilizan en la elaboración de la formulación pueden afectar las propiedades de solubilidad del principio activo y, por tanto, en las características de absorción y biodisponibilidad (Shargel & Yu, 1993).

Por estas razones en los estudios de preformulación es necesario estudiar las características de velocidad de disolución del principio activo solo y en combinación con distintos excipientes. Estos

estudios se realizan mediante pruebas *in vitro* que se encuentran tipificadas y estandarizadas en las farmacopeas (Vila Jato, 2001).

12.3.3 TAMAÑO DE PARTÍCULA

El aumento del área superficial de las partículas que intervienen en el proceso de disolución determina un incremento proporcional en la velocidad de éste, como queda expresado en la ecuación de Noyes y Whithney. La solubilidad de los sólidos finamente divididos (dimensiones de un orden de $1\mu\text{m}$) es mayor que el de las partículas grandes (López Arellano & Gómez Almaraz, 2005).

Otro factor que puede afectar la velocidad de disolución, también consecuencia del tamaño de partícula, es el efecto de las cargas eléctricas que aparecen en los polvos finamente divididos debido a la disociación iónica del sólido en solución. Según la teoría de Helmholtz, existe una doble capa eléctrica en la interfase sólido- líquido (López Arellano & Gómez Almaraz, 2005).

12.3.4 FORMA GEOMÉTRICA

Rippie y Johnson han intentado establecer la influencia de la forma geométrica de los cristales en la velocidad de disolución. El estudio correspondiente deja en claro que este factor ejerce un efecto significativo en el proceso porque a su vez es de gran complejidad (López Arellano & Gómez Almaraz, 2005).

13. OTROS FACTORES RELACIONADOS CON LA TÉCNICA DE DISOLUCIÓN

13.1. TOMA DE MUESTRA

Estas se deben efectuar siempre en el mismo punto y con la menor turbulencia posible, a fin de mantener el patrón de flujo constante y reproducible (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

13.2. ADSORCIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO

Esta puede ocurrir tanto en los recipientes de disolución, como en el medio filtrante a través del cual se toma la muestra, o en las sondas para el muestreo. Esto puede presentarse particularmente cuando las concentraciones del fármaco son bajas, o la naturaleza del mismo es afín al material adsorbente (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

14. PRUEBAS DE DISOLUCIÓN

Las pruebas de disolución sirven para conocer la velocidad con la que el principio activo se disuelve en un medio líquido (generalmente acuoso) y la cantidad total que se disuelve (Vila Jato, 2001).

14.1 OBJETIVOS DE LAS PRUEBAS DE DISOLUCIÓN

- Guiar en el desarrollo y optimización de los estudios de formulación y en el proceso de producción.
- Vigilar el desempeño del proceso de manufactura durante el desarrollo, así como la aprobación del producto farmacéutico.
- Minimizar el riesgo de bioequivalencia de lote a lote (López Arellano & Gómez Almaraz, 2005).
- Saber si existe una interacción excipiente/principio activo que afecte la velocidad de disolución y por tanto pueda influir en la biodisponibilidad (Vila Jato, 2001).

14.2. DESARROLLO DE LA PRUEBA

14.2.1. RECOPIACIÓN DE PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

La primera etapa en la selección y optimización de una prueba de disolución es recopilar los datos físicos y químicos para el compuesto de interés. Éstos incluyen el pKa, la solubilidad como una función del medio y estabilidad del compuesto en solución como una función del pH y del tiempo. El conocimiento del pKa es útil ya que se define la carga de la molécula en la solución a cualquier pH dado (López Arellano & Gómez Almaraz, 2005).

La determinación de las solubilidades acuosas se puede separar en tres etapas:

1. Equilibrio de una solución saturada de un principio activo a una temperatura específica.
2. Toma de una muestra de la solución saturada, filtración o centrifugación de la misma.
3. Determinación analítica de la concentración del principio activo disuelta en la solución (López Arellano & Gómez Almaraz, 2005).

La estabilidad del principio activo en solución también se debe considerar en el diseño de una prueba de disolución. La estabilidad en medios de disolución puede limitar el intervalo de pH en el cual se puede optimizar una prueba de disolución. En general, la estabilidad del principio activo debe determinarse a 37°C durante 2 hrs para formulaciones de liberación modificada. La estabilidad a 25°C se debe evaluar durante al menos 24 hrs para determinar si las muestras se pueden mantener durante la noche antes del análisis (López Arellano & Gómez Almaraz, 2005).

14.2.2. PARÁMETROS A INVESTIGAR Y SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DE LA PRUEBA

La utilidad de una prueba de disolución se termina por su capacidad, para discriminar entre formulaciones y su correlación con la Biodisponibilidad *in vivo*. En ausencia de Biodisponibilidad *in vivo*, la selección de las condiciones iniciales de la prueba se establecen con base a las propiedades fisicoquímicas del principio activo, el diseño de la formulación y dosis pretendida (López Arellano & Gómez Almaraz, 2005).

14.2.2.1. APARATO DE DISOLUCIÓN Y VELOCIDAD DE ROTACIÓN

Una de las primeras decisiones que deben tomarse en el proceso de desarrollo de un nuevo método de disolución es la selección del aparato. Los aparatos difieren en cuanto a la forma y la geometría del recipiente de disolución, el tipo y la intensidad de la agitación, la posición del preparado, la dispersión de las partículas, el volumen del medio de disolución, la capacidad de cambiar el solvente con una cierta velocidad para mantener las condiciones sink y reproducibilidad del sistema. Se aconseja que el aparato de disolución sea científicamente realista y económicamente estable y tenga la capacidad de proporcionar una condición hidrodinámica eficaz (Gennaro A. R., 2003).

14.2.2.2 MEDIO DE DISOLUCIÓN

El medio y el volumen de disolución se seleccionan con base a los datos de solubilidad y la dosis en las que se satisfacen las condiciones sink. Los datos de solubilidad deben usarse como guía para seleccionar racionalmente medios para la prueba (López Arellano & Gómez Almaraz, 2005).

La FDA recomienda que se utilicen medios acuosos dentro del rango de pH de 1.2 a 6.8. Generalmente los siguientes medios se prueban:

- HCl 0.1 N (pH 1.2)
- Solución amortiguadora de acetatos USP a pH 4.5
- Solución amortiguadora de fosfatos USP a pH 6.8
- Fluido gástrico simulado a pH 1.2 (sin enzimas)
- Fluido intestinal simulado a pH 6.8 (sin enzimas)

14.2.2.3. TEMPERATURA

La temperatura del medio de disolución debe ser mantenida rigurosamente con vibraciones mínimas y sin puntos de calentamiento excesivos localizados (Gennaro A. R., 2003).

14.2.2.4. MUESTREO

Los perfiles de disolución con un número apropiado de intervalos de tiempo, para caracterizar la velocidad y extensión de la liberación del principio activo. El volumen extraído puede o no remplazarse, cuando no se remplace el volumen no debe extraerse más de 10% del medio de disolución (López Arellano & Gómez Almaraz, 2005).

Tabla No. 5.4. Parámetros de las pruebas de disolución y los intervalos típicos

Parámetro	Intervalo típico
Medio de disolución	Depende de las propiedades fisicoquímicas del principio activo
Medio de desgasificación	Si es necesaria
Aparatos	Canasta rotatoria Paleta rotatoria Aparato de cilindro recíprocante Aparato de flujo continuo
Velocidad de agitación	50 rpm paletas 100 rpm canasta
Temperatura	37°C
Método de muestreo	10-20 mL manual <3 mL automatizado
Filtro	<10µm de tamaño de poro
Volumen de medio	500 a 900 mL
Método	Espectrofotometría/ CLAR/ otro

Es necesario realizar un gran número de estudios de disolución en distintas condiciones hasta comprobar y elegir cuáles son las idóneas para caracterizar el principio activo y sus formulaciones. Es importante estandarizar bien las condiciones del estudio de disolución para que sirvan como método predictivo de las características biofarmacéuticas *in vivo* y posteriormente como medio de control rutinario de lotes industriales a realizar cuando se comercializa el medicamento (Vila Jato, 2001).

15. VALIDACIÓN DEL MÉTODO CUANTITATIVO

15.1. EVALUACIÓN DEL FILTRO

Usualmente es necesaria la filtración de los medios de disolución antes de la cuantificación del principio activo. Esta etapa permite la separación de las partículas del principio activo no disueltas y los excipientes insolubles. Típicamente, se utiliza un filtro desechable, con un tamaño de poro de 0.2 y 10 µm el cual debe ser compatible en el medio de disolución y no debe alterar significativamente la concentración del principio activo en la solución (López Arellano & Gómez Almaraz, 2005).

15.2. ESTUDIOS DE VALIDACIÓN PRELIMINAR

La NOM-177-SSA señala validar el método analítico para los medicamentos de prueba y de referencia. Si se tienen disponibles los placebos de los medicamentos, realizar la validación mediante el porcentaje de recuperación; cuando no sea posible obtener los placebos llevar a cabo la validación mediante el método de estándar adicionado (López Arellano & Gómez Almaraz, 2005).

16. APARATOS DE DISOLUCIÓN

Actualmente la USP hace referencia a siete aparatos oficialmente reconocidos para llevar a cabo pruebas de disolución (U.S. Pharmacopeial Convention (USP), 2006); sin embargo, la elección de este depende de la forma farmacéutica. En México, la mayor parte de las pruebas de disolución que se llevan a cabo es utilizando los aparatos I y II de disolución, bajo las condiciones de prueba que marca la Farmacopea Nacional o bien, la USP. Los métodos con estos aparatos son simples, robustos y se usan mundialmente. Estos métodos son suficientemente flexibles para usarse en las pruebas de disolución de una gran variedad de productos farmacéuticos. Los otros aparatos de la USP o métodos alternativos deben usarse si es necesario basándose en lo que sea más conveniente para un producto o forma farmacéutica en particular.

En la actualidad la USP acepta las siguientes opciones de pruebas de disolución:

Aparato No.		Adecuado para:	Método de agitación:
USP I	Canastilla	Sólidos y polvos	Agitador rotativo
USP II	Paleta	Sólidos	Agitador rotativo
USP III	Cilindro oscilante	Sólidos y polvos	Oscilante
USP IV	Celda de flujo continuo	Sólidos y polvos	Fluido en movimiento
USP V	Paleta sobre disco	Parches transdérmicos	Agitador rotativo
USP VI	Cilindro rotativo	Parches transdérmicos	Agitador rotativo
USP VII	Disco oscilante	Sólidos, polvos y Parches transdérmicos	Oscilante

(A. Hanson, 1991)

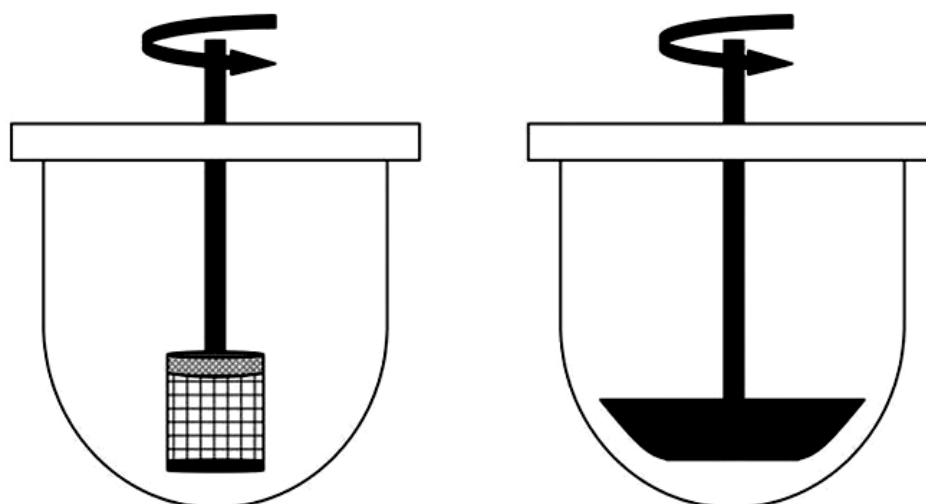


Figura No. 5.7. Aparatos de disolución I y II USP

16.1 APARATO I USP

El método de la canastilla giratoria se compone de una cesta cilíndrica sostenida por un eje de motor. La cesta contiene la muestra y gira en un matraz de fondo redondo que contiene el medio de disolución. El matraz se sumerge en todo un baño con una temperatura constante de 37°C (Shargel & Yu, 1993).

El método de la canastilla representa un intento de limitar en la posición de la forma de dosificación, con el fin de proporcionar la máxima probabilidad de una consistente interfaz sólido-líquido (A. Hanson, 1991).

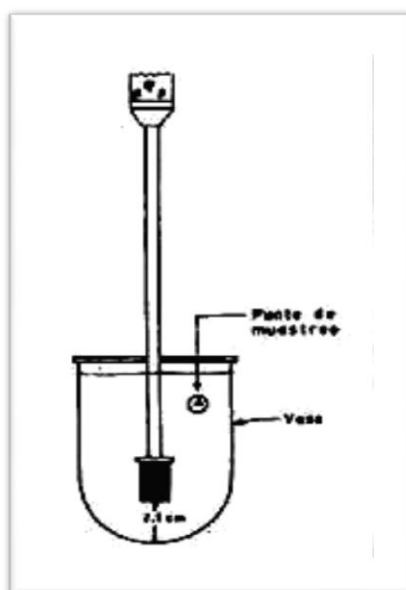


Figura No. 5.8. Aparato de disolución I

16.2 APARATO II USP

Consiste esencialmente en una paleta giratoria con una hoja de dimensiones específicas conformes al radio interior de un matraz de fondo redondo. Este método supera muchos de los inconvenientes de la canastilla giratoria, pero requiere una precisión extrema en la geometría de la pala y el matraz además sufre de variación inaceptable en los datos de disolución después de incluso pequeños cambios en la orientación paleta (A. Hanson, 1991).

La paleta es de recubrimiento especial que minimiza la turbulencia debido a la agitación. La paleta está verticalmente unida a un motor de velocidad variable que gira a una velocidad controlada. El comprimido o cápsula se coloca en el matraz de disolución de fondo redondo, que minimiza la turbulencia del medio de disolución. El aparato se encuentra en un baño de agua a temperatura constante mantenida a 37°C. La posición y la alineación de la paleta se especifican en la USP. El método de la paleta es muy sensible a la inclinación, una alineación incorrecta puede afectar drásticamente los resultados de la disolución con algunos productos farmacéuticos (Shargel & Yu, 1993).

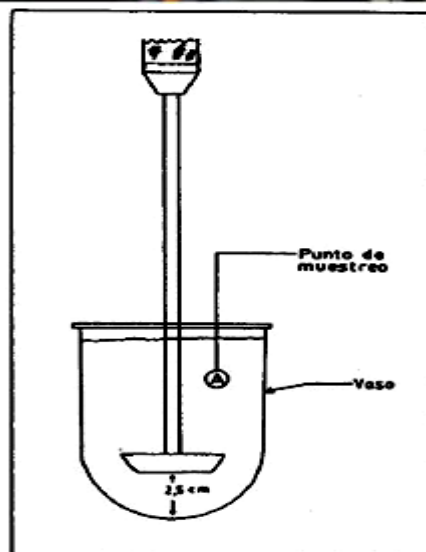


Figura No. 5.8.1 Aparato de disolución II

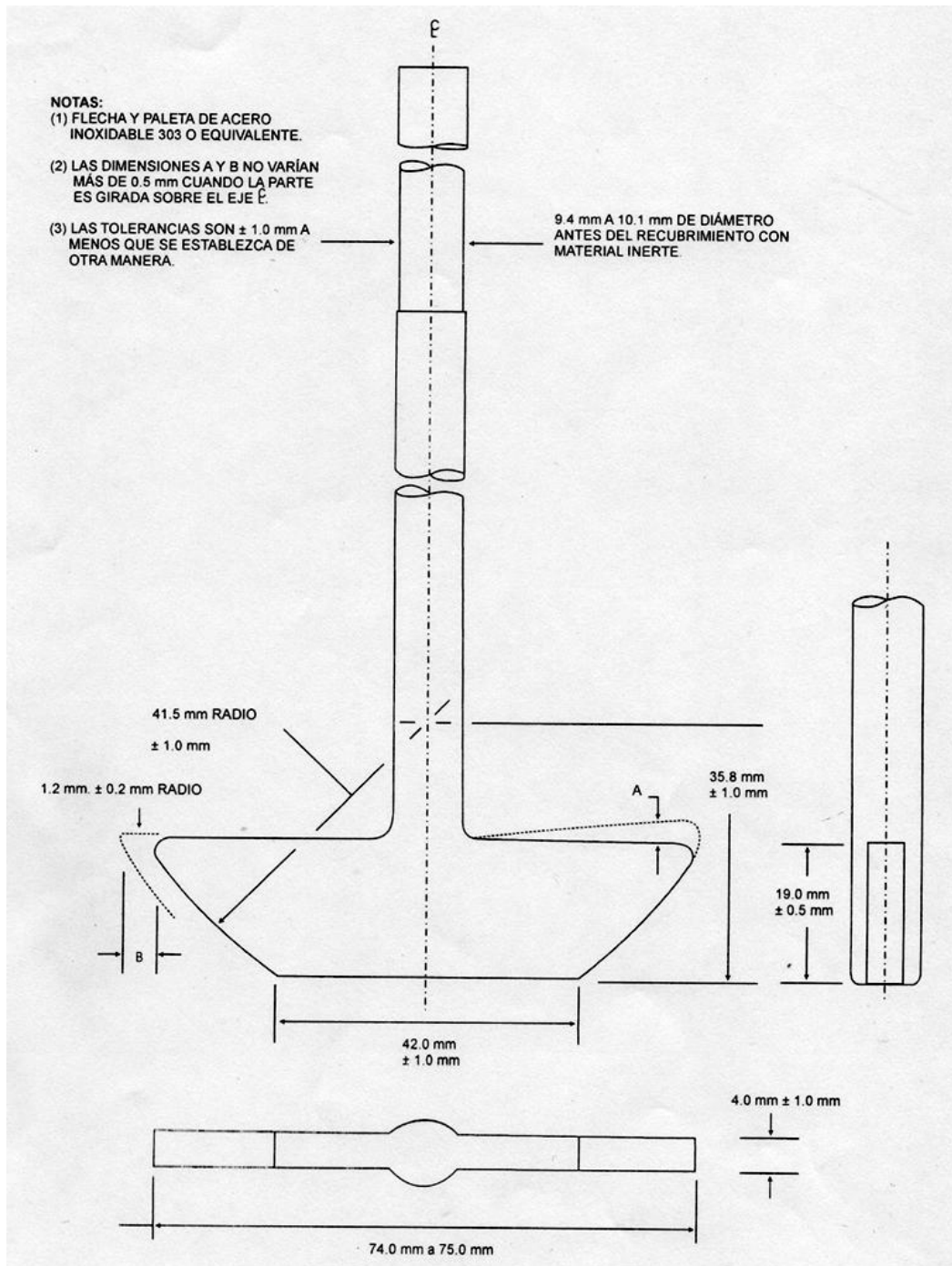


Figura No. 5.9. Elemento de agitación de paleta

16.3 APARATO DE DISOLUCIÓN IV USP

El método de flujo continuo implica limitar la forma de dosificación en una celda y bombear el medio de disolución a través de esa celda. Es un sistema abierto de flujo continuo automático y estandarizado que consiste en lo siguiente: un reservorio de medio de disolución y una bomba; una celda de flujo continuo y un baño de agua que mantenga el medio de disolución en $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

La bomba lleva el medio de disolución hacia arriba a través de la celda a una velocidad de flujo estándar de 4, 8 y 16 mL por minuto (U.S. Pharmacopeial Convention (USP), 2006).

16.4 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS APARATOS DE DISOLUCIÓN I, II Y IV

Tabla No. 5.5. Ventajas y desventajas de los aparatos de disolución I, II y IV

Aparato No.	Ventajas	Desventajas
USP I Canastilla	<ul style="list-style-type: none"> Mantiene la forma de dosificación inmersa totalmente en el medio de disolución. 	<ul style="list-style-type: none"> Obstrucción de los claros del tamiz de la canastilla. Formación de cámara de aire en la parte superior de la canastilla. Tasas de flujo inadecuado cuando las partículas salen de la cesta y flotan en el medio. Dificultades cuando se intentan métodos automatizados.
USP II Paleta	<ul style="list-style-type: none"> Patrón de flujo más estable, mejor dispersión del sólido. Buena inspección visual de la forma farmacéutica durante la prueba. 	<ul style="list-style-type: none"> Sensible a las variaciones en el patrón de flujo del disolvente. Cualquier variación en la geometría de la propela, provoca patrones de flujo distintos al normal.
USP IV Flujo continuo	<ul style="list-style-type: none"> Para fármacos poco hidrosolubles, es el medio ideal para obtener condiciones sink. Los cambios de pH en el medio de disolución se logran fácilmente. Se puede automatizar la toma de muestra. 	<ul style="list-style-type: none"> La validación de la velocidad de flujo durante el tiempo de prueba es difícil. La obstrucción de filtros causa variaciones graves en el flujo de medio de disolución y puede dañar la bomba. Puede requerir más de 100 L del medio de disolución.

17. UTILIDAD Y APLICACIONES DE LAS PRUEBAS DE DISOLUCIÓN

La literatura internacional indica que cualquier fármaco en cualquier forma farmacéutica, es susceptible a sufrir una inadecuada liberación a partir del medicamento o sistema de entrega que los contiene, sea en cantidad o velocidad. De hecho la tendencia a mediano plazo, es la de establecer pruebas de disolución de fármacos contenidos tanto en las formas farmacéuticas tradicionales (no solamente las sólidas), como los contenidos en sistemas de entrega novedosos (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

La prueba de disolución es importante desde varios puntos de vista:

17.1. COMO PRUEBA FISICOQUÍMICA RUTINARIA DE CONTROL DE CALIDAD

Es un indicador sencillo y eficaz de las buenas prácticas de manufactura (BPM). La prueba de disolución puede indicar en un momento dado, si la materia prima, o el proceso de producción están fuera de control (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

A la fecha las pruebas de disolución farmacopéicas tienen como objetivo cuantitativo, establecer “no menos de un determinado por ciento de fármaco disuelto en un tiempo dado”. Es decir se trata de solo un punto o dato, que no proporciona por lo tanto una idea del proceso global de disolución a través del tiempo (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

Un perfil de disolución, proporciona por un lado mayor seguridad e información acerca del proceso global de disolución, y por otro, una base de datos potencialmente muy útiles para efectos de correlaciones de disolución *in vitro* con resultados de Biodisponibilidad (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

17.2. DESARROLLO DE PRODUCTOS Y EL CONTROL DE CALIDAD

Las pruebas de disolución *in vitro* son útiles en desarrollo de productos y en la vigilancia de la uniformidad de un lote a otro durante el proceso de fabricación con posterioridad a la aprobación de la comercialización. También se usan para comprobar la uniformidad de las características de liberación de una forma farmacéutica durante el almacenamiento. Asimismo, dichas pruebas pueden constituir una comprobación útil de varias características de la forma farmacéutica.

Las pruebas de disolución *in vitro* y la especificación de control de calidad deberán basarse en las especificaciones de la farmacopea adecuadas o en el comportamiento *in vitro* de los lotes de prueba usados para producir material destinado al estudio de equivalencia.

17.3. COMO INDICADOR DE BIODISPONIBILIDAD

Los perfiles de disolución obtenidos durante los estudios de desarrollo del medicamento, son particularmente útiles para intentar establecer correlación de parámetros de disolución *in vitro* con resultados de biodisponibilidad, a efecto de establecer bioequivalencia de productos genéricos. El gran volumen de información generado durante los estudios de formulación podría ser un banco de datos muy útil para las autoridades sanitarias, en relación con pruebas *in vitro*, de productos genéricos (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

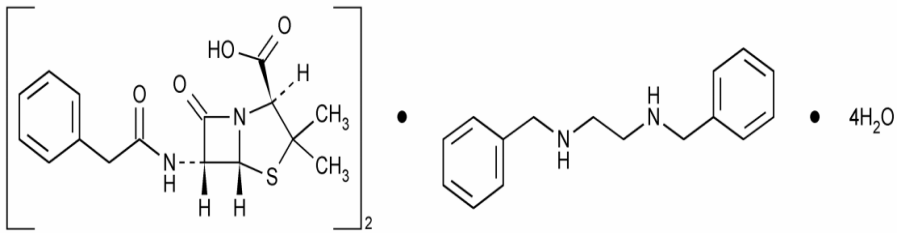
17.4. COMO TEMA DE INVESTIGACIÓN O POSIBLE INCLUSIÓN EN FARMACOPEA

Para productos que actualmente no están sujetos a la norma de disolución farmacopéicas como puede ser suspensiones en general, supositorios, productos veterinarios, etc.

Asimismo, los estudios integrales de liberación, disolución y difusión de fármacos a través de membranas (naturales o sintéticas), son importantes para los denominados sistemas de entrega, (fármacos contenidos en membranas); para preparaciones tópicas tradicionales, para productos cosméticos (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996).

18. GENERALIDADES DE LA BENCILPENICILINA BENZATÍNICA

18.1. MONOGRAFÍA

Nombre químico	Ácido [2S-(2 α ,5 α ,6 β)3,3-dimetil]-7-oxo-6-[(fenilacetil)amino]-4-tia-1-azabicyclo[3,2,0]heptano-2-carboxílico con la N,N'-dibenciletilendiamina en proporción (2:1), tetrahidratada
Fórmula condensada	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ 2C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₄ S *4H ₂ O
Estructura química	
Numero CAS	1538-09-6 (anhidro); 5928-83-6 (monohidratado); 41372-02-5 (tetrahidratado)
Peso Molecular	Anhidra (909.13); monohidratado (927.13);Tetrahidratada (981.13)
Descripción	Contiene no menos del 96% y no más del equivalente al 102% de bencilpenicilina benzatínica y no menos del 24% y no más del 27% de N,N'-dibenciletilendiamina (benzatina C ₁₆ H ₂₀ N ₂), calculados ambos % con respecto a la sustancia anhidra
Sinónimos	Penicilina G benzatínica, benzetacil

Propiedades fisicoquímicas

Estado	Polvo cristalino
Color	Blanco
Olor	Inodoro
pKa	2.76
pH	5.5-7.5 en solución saturada
Punto de fusión	129-133°C con descomposición
Potencia mínima U.S.P (UI/mg)	1211
Potencia teórica (UI/mg)	1050
Solubilidad (mg/mL)	
	Metanol 16.90
	Etanol 15.40
	Alcohol bencílico 12.45
	Isopropanol 3.65
	Acetona 3.00
	Agua 0.20

18.2. ESTRUCTURA QUÍMICA

La estructura de bencilpenicilina, comúnmente llamada penicilina G, es la siguiente:

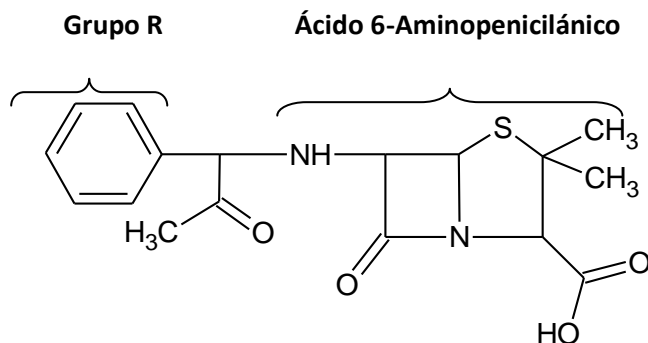


Figura No. 5.10. Estructura de la Bencilpenicilina

Todas las penicilinas son ácidos; el núcleo fundamental, común a todos, es el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) a la que está unido un grupo R a través de un enlace amida en el carbono 6. La característica esencial de 6-APA (que no posee propiedades antimicrobianas clínicamente significativas como una entidad individual) y de todas las penicilinas es la estructura fundida β -lactámica y tiazolidina. Cualquier modificación de los 3 átomos de carbono asimétricos o bien una ruptura en la tiazolidina o el anillo β -lactámico resulta en la disminución de la actividad óptica y la pérdida concomitante completa de la actividad antimicrobiana (Osol, 1973).

18.3. SOLUBILIDAD

Siendo las penicilinas ácidos, forman fácilmente sales y se distribuyen para uso medicinal; su solubilidad en agua depende del catión que reemplaza el hidrógeno del grupo carboxilo. Actualmente la penicilina G está disponible en cuatro sales (Osol, 1973).

Tabla No. 5.6. Sales actualmente disponibles de Penicilina G

Sal	Formula empírica	Peso molecular	Solubilidad en agua 25 °C (mg/mL)
Sodio	$C_{16}H_{17}NaN_2O_4S$	356.38	>20
Potasio	$C_{16}H_{17}KN_2O_4S$	372.49	>20
Procaínica	$C_{16}H_{18}N_2O_4SC_{13}H_{20}N_2O_2H_2O$	588.73	4
Benzatínica	$C_{16}H_{20}N_2C_{16}H_{18}N_2O_4S4H_2O$	981.21	0.2

8.4. ESTABILIDAD

Todas las sales disponibles en la actualidad de bencilpenicilina son estables cuando se mantienen secas y protegidas de humedad y temperatura excesiva. La penicilina es muy higroscópica lo que provoca hidrólisis que causa disrupción del anillo β -lactámico, un proceso que se acelera con el

aumento de temperatura. Entre la degradación se produce penicilina biológicamente inactiva y ácidos penicilóico, que reducen el pH y catalizan la descomposición adicional. La descomposición de disoluciones de sales de bencilpenicilina puede ser retardado por amortiguamiento a pH 6.0 a 7.0, siendo óptimo 6.8. Los fosfatos y citratos son adecuados agentes tampón y varias mezclas secas de penicillinatos y una cantidad apropiada de fosfato y citrato para dar el pH apropiado cuando son reconstituidos en diluyente (Osol, 1973).

18.5. INDICACIONES TERAPÉUTICAS

La BPB intramuscular está indicada para el tratamiento de las infecciones causadas por microorganismos sensibles a la penicilina G que sean susceptibles a las concentraciones séricas bajas y muy prolongadas de esta presentación farmacéutica. Las siguientes infecciones generalmente responderán a la dosis adecuada de BPB intramuscular:

- Infecciones leves a moderadas de las vías respiratorias altas (por ejemplo, faringitis) por estreptococos sensibles.
- Infecciones venéreas como sífilis
- Pian, frambesia y mal del pinto

Su acción más prolongada la convierte en especialmente apropiada para la profilaxis de la fiebre reumática (Gennaro A. , 1998).

18.6. FARMACOCINÉTICA

Por vía intramuscular la BPB se disuelve lentamente debido a su baja hidrosolubilidad la cual se hidroliza a penicilina G, esta combinación de hidrólisis y baja solubilidad, resulta en una absorción lenta y por ende produce concentraciones en el suero sanguíneo mucho más bajas pero prolongadas que las de otras penicilinas parenterales, por lo general durante 1 a 4 semanas.

Por ejemplo, 1 200 000 UI darán un nivel plasmático promedio de solo 0.15 UI/mL el primer día, que para el día 14 habrá caído hasta 0.03 UI/mL (Gennaro A. , 1998). Aproximadamente 60% de la penicilina G se fija a las proteínas séricas. El fármaco se distribuye en todos los tejidos del cuerpo en cantidades muy variables. Las concentraciones más altas se encuentran en los riñones, con cantidades menores en el hígado, la piel y los intestinos. La penicilina G penetra en menor grado en todos los demás tejidos y en líquido cefalorraquídeo. En presencia de función renal normal, el fármaco es eliminado rápidamente por excreción tubular. En neonatos, lactantes pequeños e individuos con deterioro en la función renal, la excreción se retarda considerablemente.

18.7. FARMACODINAMIA

La penicilina G ejerce acción bactericida contra los microorganismos sensibles a la penicilina durante la etapa de multiplicación activa. Actúa por inhibición de la biosíntesis del mucopéptido

de la pared celular. La penicilina G ejerce una intensa actividad *in vitro* contra estafilococos (excepto cepas productoras de penicilinasa). Estreptococos (grupos A, C, G, H, L y M) y neumococos. Otros microorganismos sensibles a la penicilina G son: *Neisseria gonorrhoeae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium*, *Actinomyces bovis*, *Treponema pallidum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Listeria monocytogenes* y *Leptospira*. *Treponema pallidum* es extremadamente sensible a la acción bactericida de la penicilina G (Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2012).

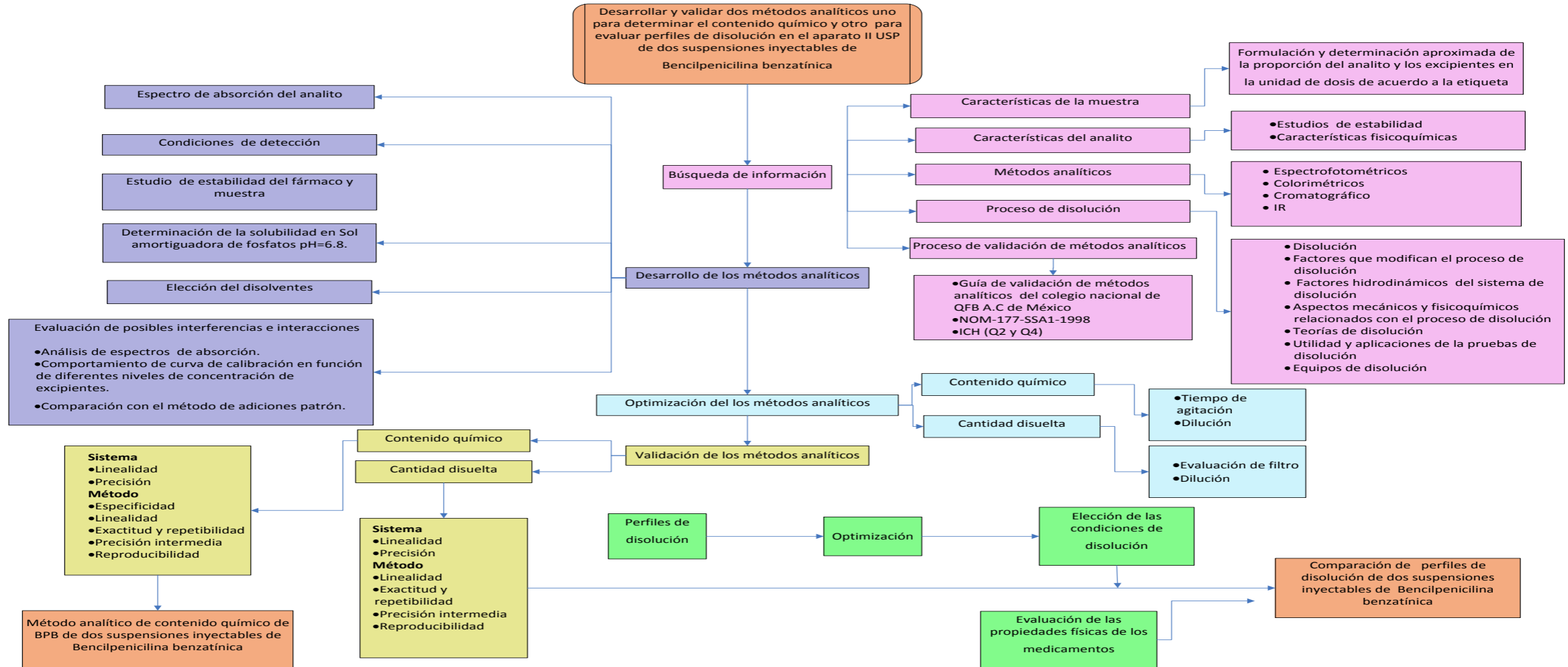
18.8. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DE LA SUSPENSIÓN INYECTABLE DE BPB

Tabla No. 5.7. Especificaciones y criterios de aceptación de la suspensión inyectable de BPB establecidos en algunos compendios farmacopéicos

Especificación	(Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (CPFEUM), 2009)	(U.S. Pharmacopeial Convention (USP), 2006)
Contenido	Contiene no menos de 1090 y no más de 1272 Unidades/mg	Contiene no menos del 90.0% y no más de 115% de la cantidad declarada de penicilina

VI. MATERIAL Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

1. Diagrama de flujo



2. EQUIPOS, INSTRUMENTOS, REACTIVOS O EXCIPIENTES Y SOLUCIONES

Los equipos, reactivos y materiales utilizados se encuentran en el Laboratorio No. 5: Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (LEDEFAR), de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria ubicada en Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4.

Tabla No. 6.2.1. Equipos utilizados en el presente trabajo				
	Marca	No. de inventario	Modelo	Número de serie
Agitador magnético	KA WORKS	-	LABDISC WHITE	-
Aparato II USP	VANKEL	4155-0597	VK 7000	UNAMFESCC1UK2011
Aparato II USP	VANKEL	4489-0995	VK 7000	VK7000OL10IQLQPQ
Balanza analítica	OHAUS	-	APS250D	1114050584
Balanza analítica	METTLER-TOLEDO	1908788	AB204-S	1119430155
Espectrofotómetro UV-Visible	VARIAN	-	CARY 100 CONC	EL05043015
Potenciómetro-conductímetro	METTLER-TOLEDO	02228926	SEVEN MULTI	1227257138
Purificador de agua	MILLIPORE	0232315	MILLI-Q	
Termobalanza de halógeno	METTLER-TOLEDO	-	HR73	1116143669

Tabla No. 6.2.2. Reactivos utilizados en el presente trabajo				
Reactivo o excipiente	Lote	Proveedor	Pureza (%)	No. CAS
CH ₃ OH	V52C05	QUIMICA MEYER	99.90	67-56-1
HCl	-	J.T BAKER	36.50-38.00	7647-01-0
KH ₂ PO ₄	J16C16	J.T BAKER	99.20	7778-77-0
NaOH	K26K50	AR	-	1310-73-2
Sustancia de referencia primaria de BPB	J1D164	USP ROCKVILLE,MD	100.00	41372-02-5
Sustancia de referencia secundaria de BPB			96.50	

Tabla No. 6.2.3. Soluciones utilizadas en el presente trabajo	
Solución Amortiguadora de fosfatos pH=6.8	
Solución Ácido clorhídrico 1M	

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAR CONTENIDO QUÍMICO DE BPB EN PRODUCTO DE REFERENCIA Y PROD PBA

3.1.1 CONDICIONES DE DETECCIÓN

Se evaluó la espectrofotometría UV-Visible como método de análisis cuantitativo ya que éste permite obtener una respuesta analítica característica, de acuerdo a las propiedades intrínsecas del analito y además establecer una relación lineal entre la concentración del mismo y la respuesta analítica. Cabe mencionar que este método posee ciertas ventajas sobre otros métodos de análisis, como son: rápida obtención de resultados, se pueden analizar varias muestras además de la sencilla preparación de las mismas así como su bajo costo.

Los métodos de análisis reportados para la detección de la BPB por espectrofotometría UV-Visible son indirectos y aplicados únicamente a la molécula de penicilina de forma general. En este caso a través de la evaluación del espectro de absorción de BPB se pudo establecer si ésta sal proporciona una respuesta importante donde el cambio de absorbancia por unidad de concentración sea mayor proporcionándonos máxima sensibilidad.

Dicha evaluación se hizo en un rango de 190 a 350 nm en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 ya que este es el pH de máxima estabilidad del analito de acuerdo a la literatura. Para ello se preparó una solución de la sustancia de referencia primaria de BPB de 20 µg/mL en solución amortiguadora de fosfatos pH= 6.8.

3.1.2 ESTABILIDAD DE LA SUSTANCIA DE REFERENCIA PRIMARIA DE BPB

La estabilidad es la propiedad de un compuesto para conservar sus características físicas, químicas y biológicas, en este caso se evaluó la estabilidad de la sustancia de referencia primaria de BPB para así determinar cuan estable es el fármaco durante su análisis y uso, así como las condiciones de máxima estabilidad con la finalidad de emplear la sustancia de referencia primaria de BPB con la seguridad de que aún sigue conservando dichas características y como parte de la validación del método analítico para cuantificar muestras de perfil de disolución. Esta propiedad se evaluó preparando una solución de la sustancia de referencia primaria de BPB de 100 µg/mL en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 (Solución A) y a partir de esta, se prepararon dos soluciones de diferente concentración (20 y 40 µg/mL) en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 cada una por triplicado, las cuales se sometieron a diferentes condiciones de temperatura (24-25, 40 y 4°C), se tomaron 6 mL de cada solución cada 30 min hasta los 180 min y a cada muestreo se le realizó una lectura a 205 nm en un espectrofotómetro UV-Visible.

3.1.3 EVALUACIÓN DE POSIBLES INTERFERENCIAS E INTERACCIONES DE LA MATRIZ DEL PRODUCTO DE REFERENCIA

Para desarrollo del método analítico, fue necesario analizar la matriz en la que se encuentra el analito y determinar posibles interferencias o interacciones que modifiquen la respuesta analítica. Ya que si se daba cualquiera de los anteriores se optaría por dos opciones: llevar a cabo una calibración univariante, separando el analito de sus acompañantes, realizar una calibración multivariante que prediga cuantitativamente al analito en presencia de dichos acompañantes o emplear otro método instrumental. Para evaluar si existe modificación de respuesta analítica se llevó a cabo dos metodologías, se evaluó el comportamiento de los espectros de absorción y de curvas de calibración del analito solo y acompañado con la matriz en proporciones bajas y altas de la misma.

Para la elaboración de la matriz se debe conocer la composición de la muestra, que en este caso no se conoce por completo ya que el fabricante del producto de referencia proporcionó únicamente la composición cualitativa y para tener una aproximación de la composición cuantitativa se determinó el peso promedio de polvo en una unidad de dosis y se realizó una matriz empírica. Esto se hizo de la siguiente manera: se pesaron por separado tres frascos viales del producto de referencia en las balanzas analíticas disponibles en el laboratorio, se vació el contenido de los mismos y una vez que los frascos viales estuvieran completamente libres de producto, se pesaron por separado en las mismas balanzas. Una vez que se determinó el peso promedio del producto de referencia en la unidad de dosis, se estimó la proporción de BPB (de acuerdo a lo declarado en el marbete) y la parte proporcional a la matriz, la cual se tomó como un 100% para realizar la división de porcentaje de cada uno de los componentes tomando como referencia las recomendaciones del Handbook of Excipients de acuerdo a su función en la formulación. Posteriormente considerando lo anterior se elaboró una matriz equivalente a un lote de 50 frascos.

Tabla No. 6.3.1. Cantidades (g) pesadas para la elaboración de matriz de Prod ref			
Excipiente	% en la formulación	Cantidad por frasco (g)	Cantidad para 50 frascos (g)
Excipiente 1	9.7422	0.1083	5.4128
Excipiente 2	0.8660	0.0096	0.4811
Excipiente 3	0.2165	0.0024	0.1203
Total	10.8246	0.1203	6.0142

De acuerdo a las cantidades de la tabla No. 6.3.1, se preparó la matriz y se llevó a cabo el análisis de curvas de calibración de BPB sin y con la misma, inicialmente se preparó una solución de la sustancia de referencia secundaria de BPB de 125 µg/mL (Solución A) y una solución de matriz de 15 µg/mL (Solución B), dicha concentración representa la que se esperaría si se encontrase en la muestra de acuerdo a la proporción que se estimó.

Teniendo las soluciones anteriores se elaboraron tres curvas de calibración de BPB: sin adición de matriz, con matriz en una proporción alta (3.6 µg/mL) y con matriz en una proporción baja (0.6 µg/mL); en el primer caso únicamente se tomaron alícuotas de 2, 3, 4, 5 y 6 mL de la Solución A, en el segundo caso se tomaron las mismas alícuotas de la Solución A y además se agregaron 6 mL de Solución B y en el último caso se agregaron 1 mL de Solución B. Cada solución de las curvas de calibración se preparó en un matraz volumétrico de 25 mL (por triplicado), aforo con solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8, homogenizo mediante diez inversiones y realizó tres lecturas a 205 nm en un espectrofotómetro UV-Visible.

Al igual que la metodología anterior, también se evaluaron los espectros de absorción del analito con y sin la adición de matriz. La cantidad de matriz se determinó de tal manera que variara su concentración a la par que la concentración de BPB, simulando las concentraciones que se obtendrían si se tomase una porción de producto de referencia. Inicialmente se preparó una solución de la sustancia de referencia secundaria de BPB de 125 µg/mL (Solución A) y una solución de matriz de 15 µg/mL (solución B).

Se realizaron diluciones por triplicado en matraces de 25 mL como se muestra en tabla No. 6.3.2.

Tabla No. 6.3.2. Preparación de Solns para evaluar los espectros de absorción de BPB con y sin matriz		
Sol	Volumen Sol A (mL)	Volumen Sol B (mL)
1	2	0
2	4	0
3	6	0
4	0	2
5	0	4
6	0	6
7	2	2
8	4	4
9	6	6

Finalmente a las soluciones se les determinó su espectro de absorción en el rango de 190 a 350 nm en un espectrofotómetro UV-Visible Varian CARY 100 conc.

3.1.4 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO PARA DETERMINAR CONTENIDO QUÍMICO DE BPB EN PRODUCTO DE REFERENCIA (15 Y 30 MIN DE AGITACIÓN, CON 15 ML DE METANOL)

El objetivo de la optimización de un método analítico es identificar cuáles son las condiciones que nos proporcionan un resultado analítico confiable, empleando la mínima cantidad de recursos materiales en el menor tiempo, que además nos provea un menor error sistemático, teniendo como resultado un método analítico barato, rápido y confiable.

Como condición se evaluó el tiempo de agitación al que sometería la muestra durante el ensayo analítico, para esto se pesaron individualmente seis muestras lo equivalente a 70 mg de BPB de producto de referencia, se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 mL enjuagando el pesamuestra con 15 mL de metanol, se agito magnéticamente tres muestras durante 15 min y las otras tres durante 30 min, posteriormente se adicionó 10 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 y se agitó de forma magnética durante 10 min, se aforó con solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 y se homogenizó mediante diez inversiones. Se tomó una alícuota de 2 mL de la solución anterior la cual se colocó en un matraz volumétrico de 100 mL, se aforó con solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 y se homogenizaron mediante diez inversiones. Las soluciones se leyeron espectrofotométricamente a 205 nm.

3.1.5 ENSAYO ANALÍTICO

El ensayo analítico desarrollado y optimizado para determinar contenido de BPB en polvo de suspensión inyectable de 1 200 000 UI consistió en los siguientes pasos:

Se preparó una curva de calibración por triplicado con cinco niveles de concentración equidistantes de solución de la sustancia de referencia secundaria de BPB por dilución (5, 10, 15, 20 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con la cual se llevó a cabo la cuantificación de BPB en la muestra analítica.

Se pesó en un pesamuestra de vidrio aproximadamente exacto una muestra de lo equivalente a 70 mg de BPB de producto de referencia, se colocaron en un matraz volumétrico de 100 mL enjuagando el pesamuestra con 15 mL de metanol, se agito magnéticamente durante 15 min, posteriormente se adicionó 10 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 y se agitó de forma magnética durante 10 min, se aforó con solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 y se homogenizó mediante diez inversiones. Se tomó una alícuota de 2 mL de la solución anterior la cual se colocó en un matraz volumétrico de 100 mL, se aforó con solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 y se homogenizaron mediante diez inversiones. La solución se leyó espectrofotométricamente a 205 nm.

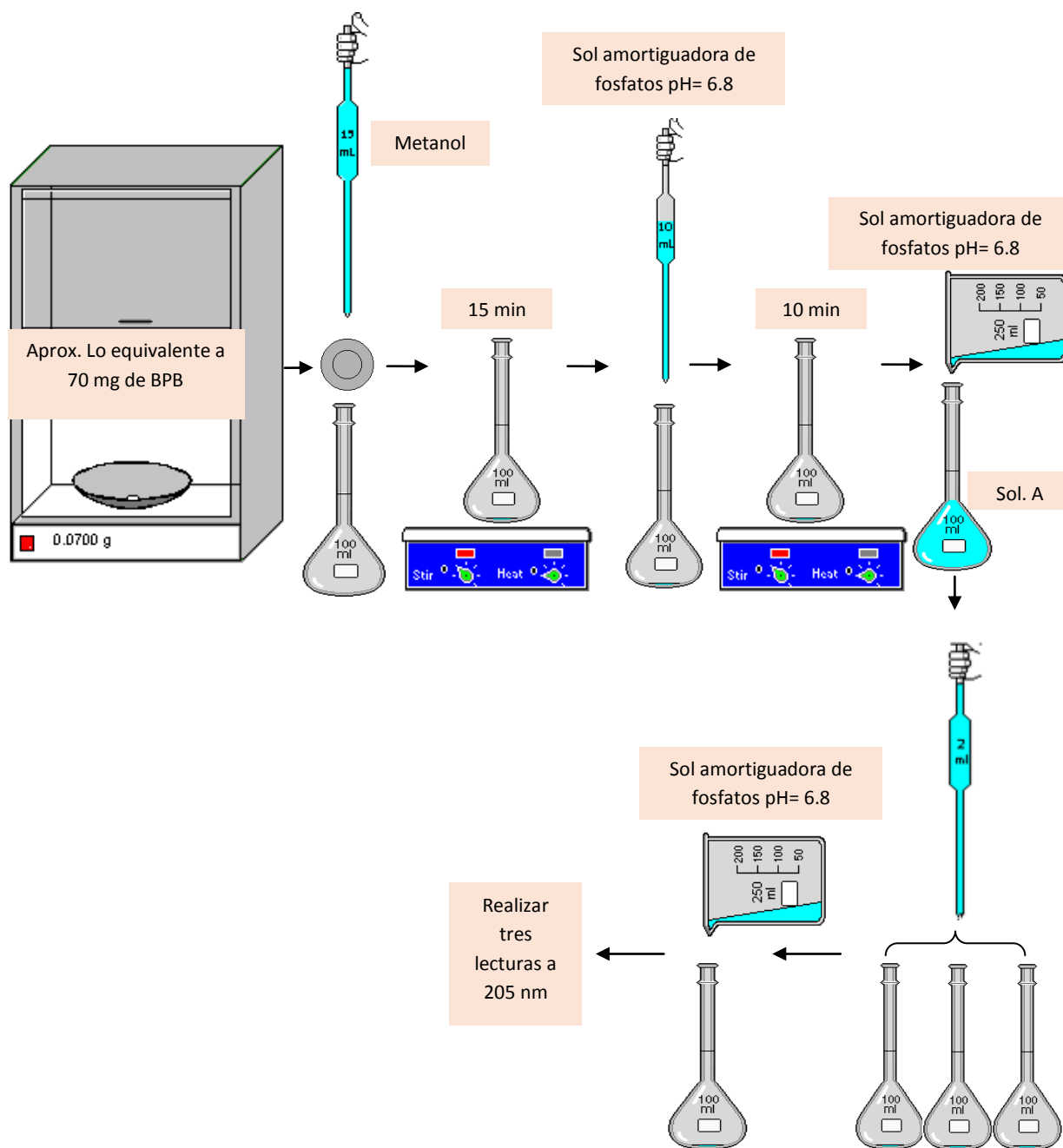


Figura No. 6.3.1. Ensayo analítico para determinar contenido de BPB en los Prod ref y Prod pba

3.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAR CONTENIDO QUÍMICO DE BPB

3.2.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Se llevó a cabo la verificación de la linealidad del sistema conforme a la metodología descrita en la Guía de Validación de Métodos Analíticos de QFB A. C, preparándose por triplicado cinco niveles de concentración equidistantes de solución de la sustancia de referencia secundaria de BPB por dilución (5, 10, 15, 20 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), considerando que la concentración intermedia es la que representa el 100% en la muestra del método analítico para determinar contenido químico de BPB y así mismo el intervalo es de ± 66.6667 .

3.2.2 PRECISIÓN DEL SISTEMA

La precisión del sistema se verificó conforme a la metodología descrita en la Guía de Validación de Métodos Analíticos de QFB A. C, preparando un sextuplicado de soluciones de la sustancia de referencia secundaria de BPB que representan el 100% de la muestra procesada por dilución (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$); y además se preparó por sextuplicado de soluciones de la sustancia de referencia secundaria de BPB que representan $\pm 66.6667\%$ (10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para evaluar dicho parámetro en el intervalo de trabajo.

3.2.3 ESPECIFICIDAD (PROD REF Y PROD PBA)

De alguna manera en la evaluación de las posibles interacciones e interferencias que podían atribuirse a los excipientes de la formulación se deduce que si estos no modifican la respuesta analítica, el método puede considerarse específico y en consecuencia exacto. Pero debido a que además de los excipientes, existen otro tipo de sustancias que pueden alterar la respuesta analítica como son los productos de degradación e impurezas, razón por la que se evaluó la especificidad del método adicionando a la muestra (un paso previo a la detección) una solución de la sustancia de referencia secundaria de BPB que se sometió en condiciones que favorecen la inestabilidad del analito.

Ya que no se cuenta con las sustancias interferentes, éstas se generaron sometiendo una solución de la sustancia de referencia secundaria de BPB (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Solución A) a $\text{pH}=1$ (solución HCl 1M) durante siete días a condiciones ambientales para provocar la degradación de BPB.

Previamente a la adición de la solución anterior a la muestra, se evaluó el nivel de degradación del analito ya que este debe estar entre 15-30% y posteriormente se llevó a cabo el ensayo analítico para el producto de referencia y el producto de prueba (Solución B) y se agregó una a alícuota de 5 mL Solución A (Solución AB) posteriormente se aforaron con solución amortiguadora de fosfatos $\text{pH}=6.8$, homogenizaron mediante diez inversiones y se leyeron por triplicado a de 205 nm.

3.2.4 LINEALIDAD, EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Se evaluó la linealidad, exactitud y repetibilidad del método para determinar el contenido químico de BPB mediante la elaboración de placebos adicionados (cinco niveles de concentración) en los cuales se varió la proporción tanto de BPB como de los excipientes que se encuentran dentro de la formulación como se muestra en la Tabla No. 6.3.3.

Tabla No. 6.3.3. Composición de los placebos cargados para evaluación de la linealidad del método		
En la formulación	Placebo cargado	
	% de BPB	mg de BPB
110	1,145.52	18.77
107.2	Se pesó solo materia prima con pureza de 96.5 %	
100	1,042.80	121.48
90	936.76	227.52
80	828.97	335.31

A cada una de los placebos adicionados anteriores se les realizó el ensayo analítico por triplicado por pesada a excepción del nivel correspondiente al 100% de analito en la muestra el cual se realizó por sextuplicado.

Se pesó en un pesamuestra de vidrio aproximadamente exacto lo equivalente a 70 mg de BPB, se colocaron en un matraz volumétrico de 100 mL enjuagando el pesamuestra con 15 mL de metanol, se agito magnéticamente durante 15 minutos, posteriormente se adicionó 10 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 y se agitó de forma magnética durante 10 minutos, se aforó con solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 y se homogenizó mediante diez inversiones. Se tomó una alícuota de 2 mL de la solución anterior la cual se colocó en un matraz volumétrico de 100 mL, se aforó con solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 y se homogenizaron mediante diez inversiones. La solución se leyó espectrofotométricamente a 205 nm.

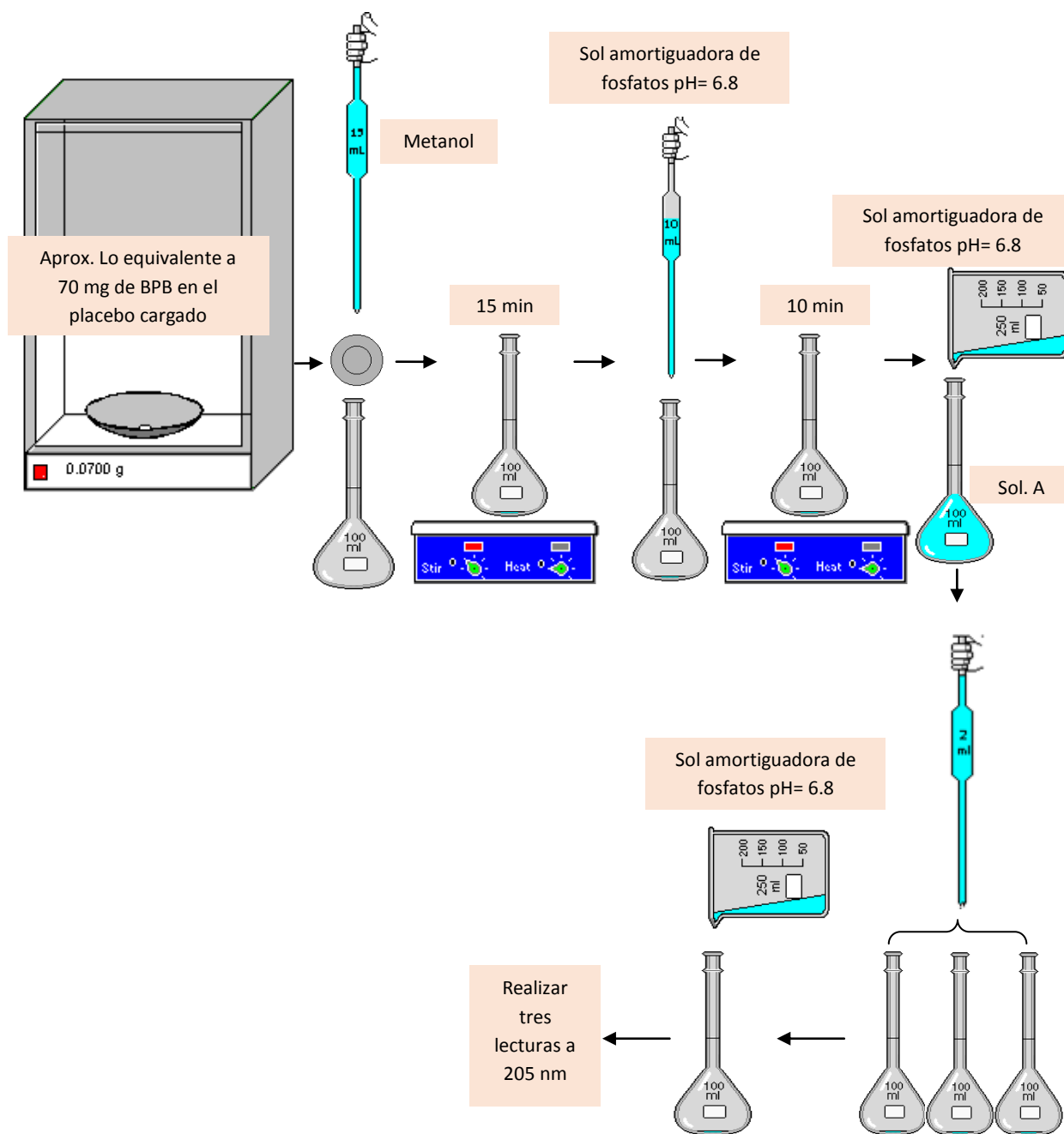


Figura No. 6.3.2. Evaluación de la linealidad del método para determinar contenido químico de BPB

3.2.5 PRECISIÓN INTERMEDIA (PRODUCTO DE REFERENCIA)

Para la evaluación de la precisión intermedia del método para determinar contenido químico de BPB en el producto de referencia se analizaron muestras homogéneas en dos días y dos analistas diferentes, siguiendo el ensayo analítico tal como se describe en la Figura No. 6.3.2.

3.2.6 DETERMINACIÓN DE CONTENIDO QUÍMICO DE BPB EN PRODUCTO DE REFERENCIA Y PROD PBA

El ensayo analítico se realizó por triplicado tanto por pesada como por dilución para el producto de referencia y 2. Se pesó en un pesamuestra de vidrio aproximadamente exacto una muestra de lo equivalente a 70 mg de BPB de producto de referencia, se colocaron en un matraz volumétrico de 100 mL enjuagando el pesamuestra con 15 mL de metanol, se agito magnéticamente durante 15 min, posteriormente se adicionó 10 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 y se agitó de forma magnética durante 10 min, se aforó con solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 y se homogenizó mediante diez inversiones. Se tomó una alícuota de 2 mL de la solución anterior la cual se colocó en un matraz volumétrico de 100 mL, se aforó con solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 y se homogenizaron mediante diez inversiones. La solución se leyó espectrofotométricamente a 205 nm.

3.3 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAR CANTIDAD DISUELTA DE BPB

3.3.1 DETERMINACIÓN DE SOLUBILIDAD DE BPB EN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS PH=6.8 37°C

Una de las características fisicoquímicas del principio activo determinante en el proceso de disolución es la solubilidad, ya que a partir de ésta se estima el volumen necesario para crear condiciones sink de una cantidad dada del principio activo. Debido a esto se determinó la solubilidad del mismo en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8, ya que este disolvente dada sus características provee las condiciones fisiológicas semejantes al sitio de administración y así mismo provee estabilidad al analito; esto se hizo de la siguiente manera: tres muestras de 720 mg de la sustancia de referencia secundaria de BPB se colocaron en vasos disolutor con 900 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ y se agitó a una velocidad de 50 rpm por 24 hrs, pasado el tiempo se detuvo la agitación e inmediatamente se filtró por gravedad 40 mL de líquido de cada vaso disolutor con un filtro Whatman No. 542. A cada solución obtenida por cada vaso se le realizó tres diluciones de 5 en 100 mL y finalmente se les realizó tres lecturas a 205 nm.

3.3.2 ELECCIÓN DE LA DILUCIÓN EN EL PERFIL DE DISOLUCIÓN EN EL APARATO II USP

En cada muestreo durante el perfil de disolución se realizó una dilución para llegar a una concentración de BPB dentro del rango de la linealidad, en este caso se evaluó la precisión de las diluciones de 2/10 y 5/25mL; esto con la finalidad de evaluar la influencia del material en la precisión del resultado y observar si hay diferencias en las cantidades de BPB disueltas detectadas. Esto se le realizó a dos muestras de producto de referencia, se pesó individualmente en pesamuestras de vidrio dos muestras de aproximadamente 70 mg de polvo de producto de referencia, los cuales se colocaron en vasos para la prueba de disolución que contenían 900 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8, la prueba se realizó a una velocidad de 100 rpm muestreándose 15 mL (sin intercambio de medio) a los 30, 60, 120 y 180 min, inmediatamente tomada la muestra al tiempo n se filtró por gravedad con un filtro Whatman No. 542; a cada solución obtenida por cada vaso se le realizó una dilución de 2/10 y 5/25mL, finalmente se les realizó tres lecturas a 205 nm.

3.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAR CONTENIDO QUÍMICO DE BPB

3.4.1 EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL FILTRO

Frecuentemente es necesaria la filtración de los medios de disolución antes de la cuantificación del fármaco para separar las partículas no disueltas del fármaco así como los excipientes insolubles que se encuentren en el medio de disolución, para obtener una correcta cuantificación del principio activo disuelto, es importante la evaluación de dichos filtros para determinar y descartar cualquier interacción o adherencia del fármaco con el filtro. En este caso se evaluó un filtro de 2.7 μm de diámetro de poro, primero se preparó una solución de la sustancia de referencia primaria de BPB de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en solución amortiguadora de fosfatos pH= 6.8 de la cual se filtraron 15 mL con papel filtro Whatman No. 542 (2.7 μm) y 15 mL se dejaron sin filtrar, de cada uno de los 15 mL anteriores se tomaron 3 alícuotas de 3 mL y se colocaron en matraces volumétricos de 25 mL aforando con solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8, a cada solución se le realizó tres lecturas a 205 nm.

3.4.2 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA (PRODUCTO DE REFERENCIA Y PROD PBA)

Para la evaluación de la estabilidad de la muestra se pesó por triplicado aproximadamente 100 mg de polvo de producto de referencia y producto de prueba, los cuales se colocaron en vasos disolutor con 900 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 a $37\pm 0.5^\circ\text{C}$, se agitaron a una velocidad de 50 rpm, se tomaron muestras de 10 mL a los 120 min e inmediatamente se filtraron por gravedad con papel Whatman No. 542; a cada solución obtenida por vaso se le realizó una dilución de 5 en 25 mL y se le realizó una lectura a 205 nm a los tiempos (30, 60, 120, 180 y 1440 minutos).

3.4.3 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Para evaluar la linealidad del método para determinar la cantidad disuelta de BPB, se empleó el método de adición patrón, para este caso, de forma general consistió en añadir un volumen constante de la solución de la sustancia de referencia secundaria de BPB (cinco niveles de concentración diferentes) a un volumen constante de muestra (tres niveles de concentraciones diferentes). Inicialmente se llevó a cabo la preparación de soluciones de la sustancia de referencia secundaria de BPB de cinco niveles de concentración (5,10, 15, 20 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para adicionar a las muestras.

Posteriormente se prepararon soluciones muestra de tres niveles de concentración diferentes, se pesó en un pesamuestra de vidrio por triplicado aproximadamente exacto 70 mg de polvo producto de referencia, los cuales se colocaron en vasos disolutor del aparato II USP (vaso 1, 2 y 3) que contenían 900 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 operando a 37 °C y 50 rpm. Una vez transcurrida 1, 2 y 3 hrs se paró el aparato y se extrajo el vaso correspondiente del cual se filtró el líquido con papel Whatman No. 542, de cada solución anterior se tomó una alícuota de 200 mL con matraz volumétrico la cual se colocó en un matraz volumétrico de 500 mL, se aforó con solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 (Solución muestra A, B y C).

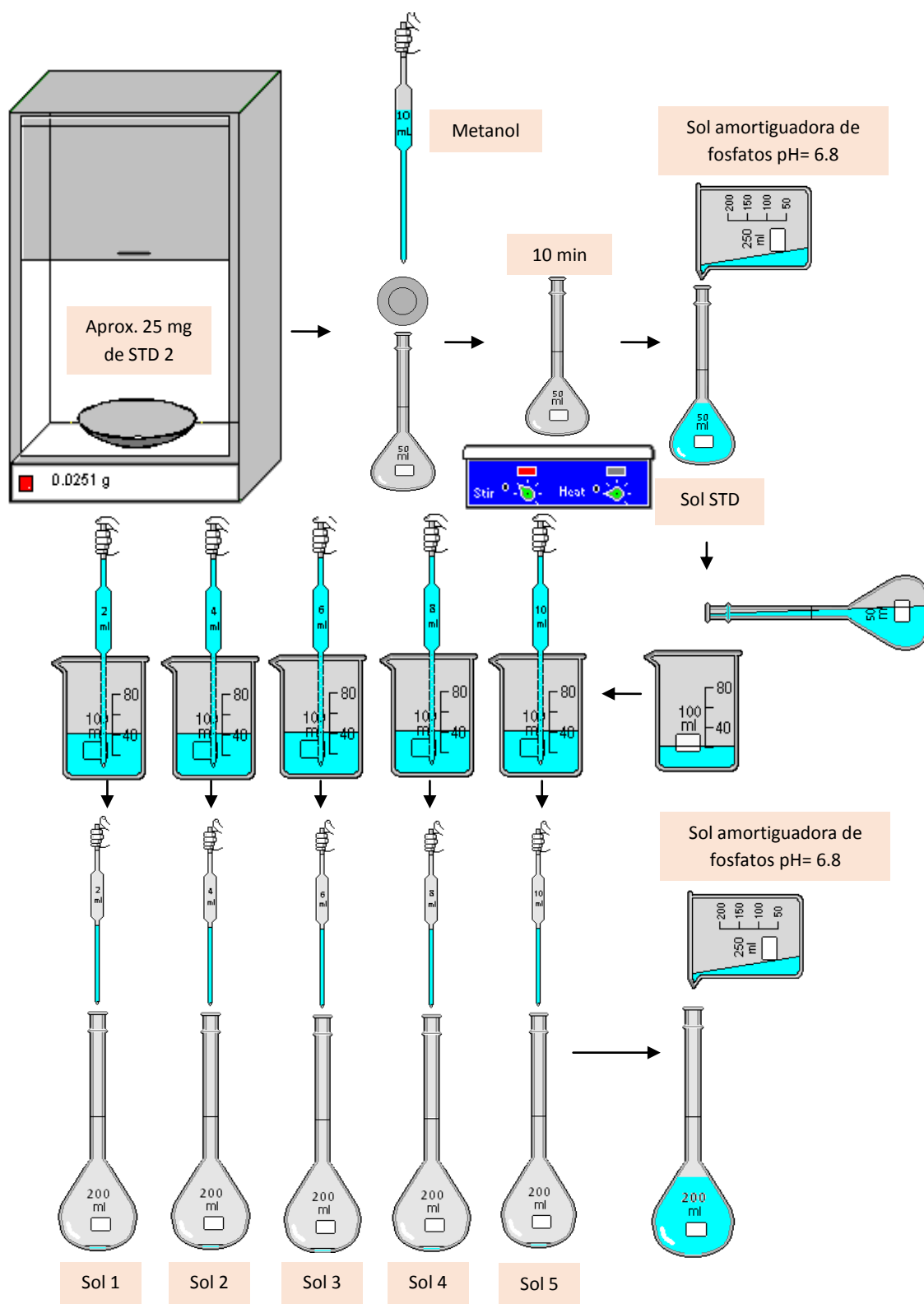


Figura No. 6.3.3. Preparación de soluciones STD para la evaluación de la linealidad del método por adiciones patrón

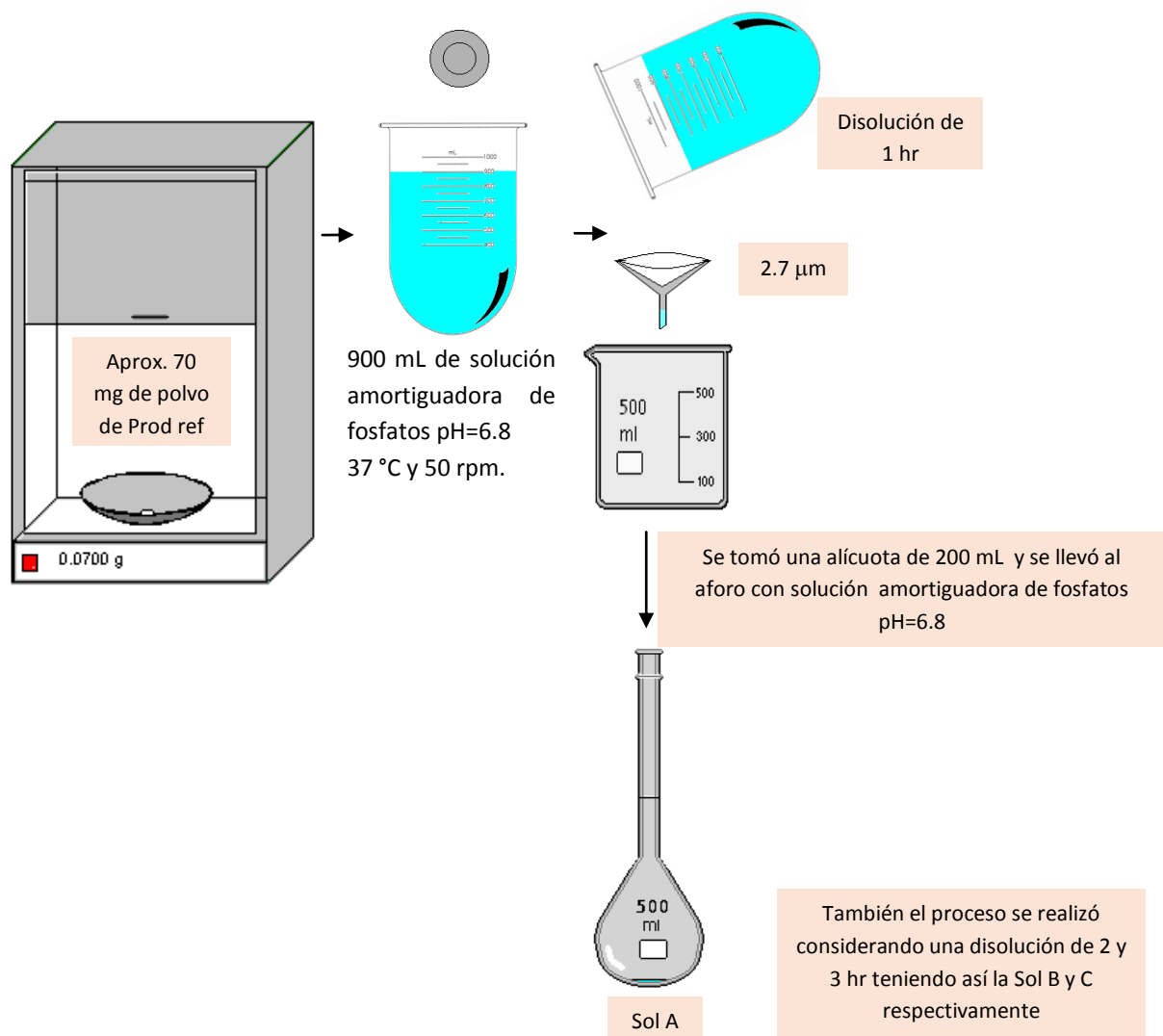


Figura No. 6.3.4. Preparación de soluciones mtra para la evaluación de la linealidad del método por adiciones patrón

A partir de las soluciones anteriores se prepararon las siguientes soluciones en matraces volumétricos de 25 mL por triplicado:

Finalmente a las soluciones se le realizó tres lecturas a 205 nm en un espectrofotómetro UV-Visible Varian CARY 100 conc.

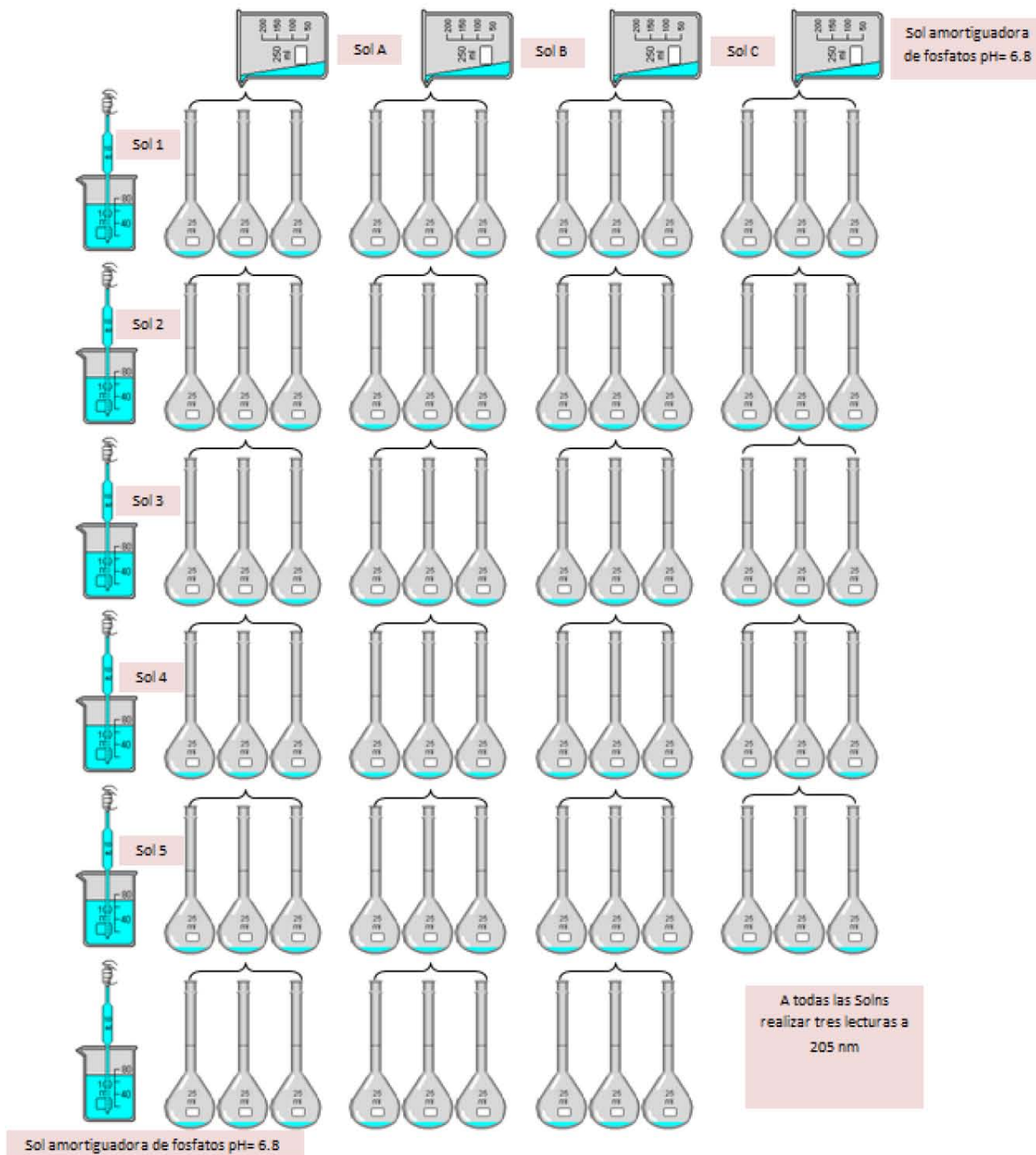


Figura No. 6.3.5. Preparación de los sistemas para la evaluación de la linealidad del método por adiciones patrón

NOTA: Se realizó el mismo procedimiento para el producto de prueba.

3.4.4 REPRODUCIBILIDAD INTRALABORATORIO (PRODUCTO DE REFERENCIA)

Se evaluó el efecto en la precisión del método para determinar cantidad disuelta en el aparato II USP de dos analistas diferentes, a dos muestras de producto de referencia analizadas por duplicado. Cuatro muestras de aproximadamente 100 mg de producto de referencia se colocaron en vasos disolutor con 900 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8, se agitaron a una velocidad de 50 rpm, se muestrearon 15 mL de cada vaso disolutor a los 120 min (sin intercambio de medio) de cada vaso e inmediatamente se filtraron por gravedad con papel Whatman No. 542; a cada solución obtenida por cada vaso se le realizó una dilución de 5 en 25 mL y finalmente se les realizó tres lecturas a 205 nm.

3.5 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE DISOLUCIÓN EN EL APARATO II USP

3.5.1 EVALUACIÓN DE LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN PARA LA ELABORACIÓN DE LOS PERFILES DE DISOLUCIÓN EN EL APARATO II USP (PRODUCTO DE REFERENCIA)

Doce muestras de 100 mg de producto de referencia se colocaron en vasos disolutor con 900 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 6 muestras se agitaron a una velocidad de 50 rpm y las otras 6 a 100 rpm, se tomó una muestra de 10 mL a los 30, 60, 120, 180, 240 y 300 min (sin intercambio de medio) de cada vaso e inmediatamente se filtraron por gravedad con papel Whatman No. 542; a cada solución obtenida por cada vaso se le realizó tres diluciones de 5 en 25 mL y finalmente se les realizó tres lecturas a 205 nm.

3.6 COMPARACIÓN PERFILES DE DISOLUCIÓN DE PRODUCTO DE REFERENCIA Y PROD PBA

Veinticuatro muestras de 100 mg (doce de producto de referencia y doce de producto de prueba) se sometieron a las condiciones mencionadas en la Tabla No. 6.3.4 y a cada muestra obtenida se le realizó una dilución de 5 en 25 mL y finalmente se les realizó tres lecturas a 205 nm.

Tabla No. 6.3.4. Condiciones óptimas para la elaboración de perfiles de disolución de una suspensión inyectable de BPB en el aparato II USP

Velocidad de agitación (rpm)	50
Temperatura °C	37 ± 0.5
Medio de disolución	Solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8
Volumen del medio (mL)	900
Volumen de muestra (mL)	10
Tiempos de muestreo (min)	30,60,120,180,240 y 360
Filtro	Whatman No. 542, diámetro de poro de $2,7 \mu\text{m}$
Dilución	5 mL de filtrado a 25 mL con Solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8
Muestra	Aproximadamente exacto 100
Sin intercambio de medio	

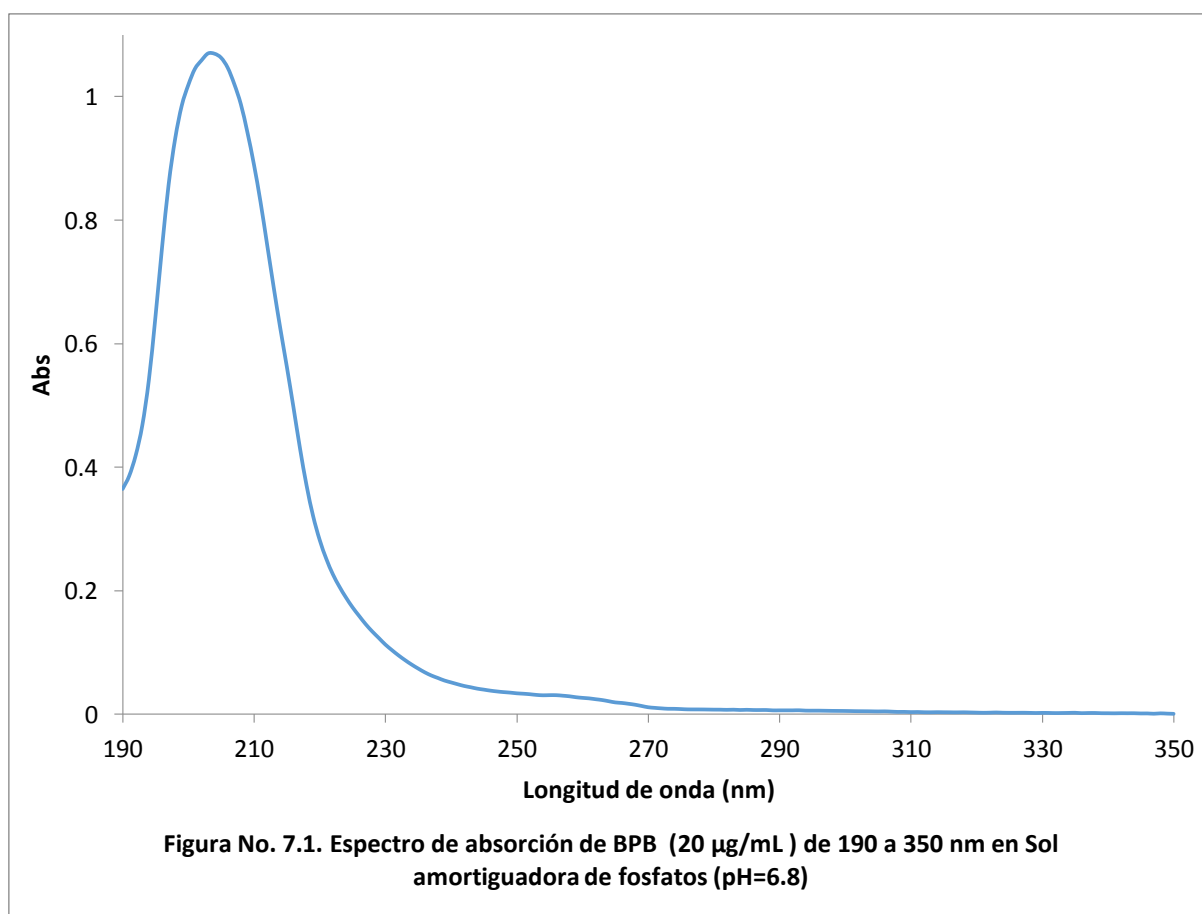
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAR CONTENIDO QUÍMICO DE BPB EN PRODUCTO DE REFERENCIA Y PROD PBA

DESARROLLO

Condiciones de detección

El método de análisis instrumental elegido para llevar a cabo la detección fue la espectrofotometría UV, la cual se fundamenta en la absorción de ciertas cantidades de energía y está descrita por la ley de Lambert-Beer que afirma que la absorbancia es proporcional a la concentración de la especie absorbente, esta ley puede aplicarse bajo este formato si las soluciones están diluidas y se mantienen a una temperatura y presión constantes (Harris, 2007).



En la Figura No. 7.1. se representa el espectro de absorción de la BPB en solución amortiguadora de fosfatos (pH=6.8), en un rango de 190 a 350 nm en el espectro ultravioleta observándose así un solo máximo de absorción a una longitud de onda de 205 nm, el cual nos proporciona la mayor sensibilidad posible, es decir, una absorbancia mayor por unidad de concentración dándonos una buena señal analítica, por lo que ésta fue la longitud de onda seleccionada para trabajar.

Estabilidad

Para conocer las condiciones de máxima estabilidad del analito que ofrezcan la confiabilidad de que la respuesta analítica debida a el analito sea consistente, se evaluó la estabilidad de la sustancia de referencia primaria de BPB a dos diferentes concentraciones (20 y 40 µg/mL), cada una sometida a diferentes condiciones de temperatura (24-25, 40 y 4°C), esto durante aproximadamente 180 minutos mediante el análisis de la señal analítica (Absorbancia) obtenida a partir de soluciones preparadas.

Se muestra en la Tabla No. 7.1 que en las tres diferentes condiciones de temperatura a las que se sometieron las soluciones se obtuvo un CV menor de 2%, lo que nos dice que la sustancia de referencia primaria de BPB permanece estable durante el periodo de estudio en las tres concentraciones en las condiciones ambientales estudiadas. Esto a su vez nos indica que se puede trabajar de forma confiable dentro del rango de los parámetros evaluados con especial interés en el estudio de disolución.

Tabla No. 7.1. Resultados de la evaluación espectrofotométrica de estabilidad de BPB a 40, 24-25 y 4°C en Solns de 20 y 40 µg/mL de la SR1				
Concentración de BPB (µg/mL)		40°C	24-25°C	4°C
20	$\bar{x} Abs$	1.1987	1.1165	1.0569
	S	0.0134	0.0064	0.0166
	CV	1.1195	0.5730	1.5686
	DA = $\frac{\%cuantificado_{final}}{\%cuantificado_{inicial}}$	2.28	1.37	1.05
40	$\bar{x} Abs$	2.0696	1.9994	1.9875
	S	0.0067	0.0087	0.0126
	CV	0.3230	0.4353	0.6343
	DA = $\frac{\%cuantificado_{final}}{\%cuantificado_{inicial}}$	0.99	0.49	2.03

Evaluación de posibles interferencias e interacciones de la matriz del producto de referencia

El efecto matriz, es como tal la influencia no deseada que ejercen los componentes de la matriz sobre los resultados obtenidos, como consecuencia de alguna de las siguientes causas:

- Que dichos componentes sufran procesos semejantes a los que experimenta el analito durante el proceso de ensayo o medida.
- Que alguno de los concomitantes interactúe, física o químicamente, con el analito de forma que modifique o altere los resultados obtenidos.

Se espera que el efecto matriz sea despreciable ya que se tiene el conocimiento de que ninguno de los componentes absorbe radiación en la longitud de onda elegida o muy próxima. Pero para cerciorarnos de que no hay efecto matriz, se llevó a cabo una prueba de significación, en la cual de forma general se decide si la diferencia entre la cantidad medida y la cantidad conocida se puede justificar por errores aleatorios (Miller & Miller, 1993) y no por una interferencia o interacción.

Como se describió en la metodología se llevó a cabo la evaluación del efecto matriz a través de la comparación del comportamiento de la matriz en proporciones bajas y altas con respecto a la de una solución de la sustancia de referencia secundaria de BPB, comparando las medias de los coeficientes de absortividad obtenidos por las diferentes curvas de calibración.

Se plantea las siguientes hipótesis:

$$H_0 = \varepsilon_{\text{sin EXCP}} = \varepsilon_{\text{con EXCP}} \text{ (baja)}$$

$$H_A = \varepsilon_{\text{sin EXCP}} \neq \varepsilon_{\text{con EXCP}} \text{ (baja)}$$

$$H_0 = \varepsilon_{\text{sin EXCP}} = \varepsilon_{\text{con EXCP}} \text{ (alta)}$$

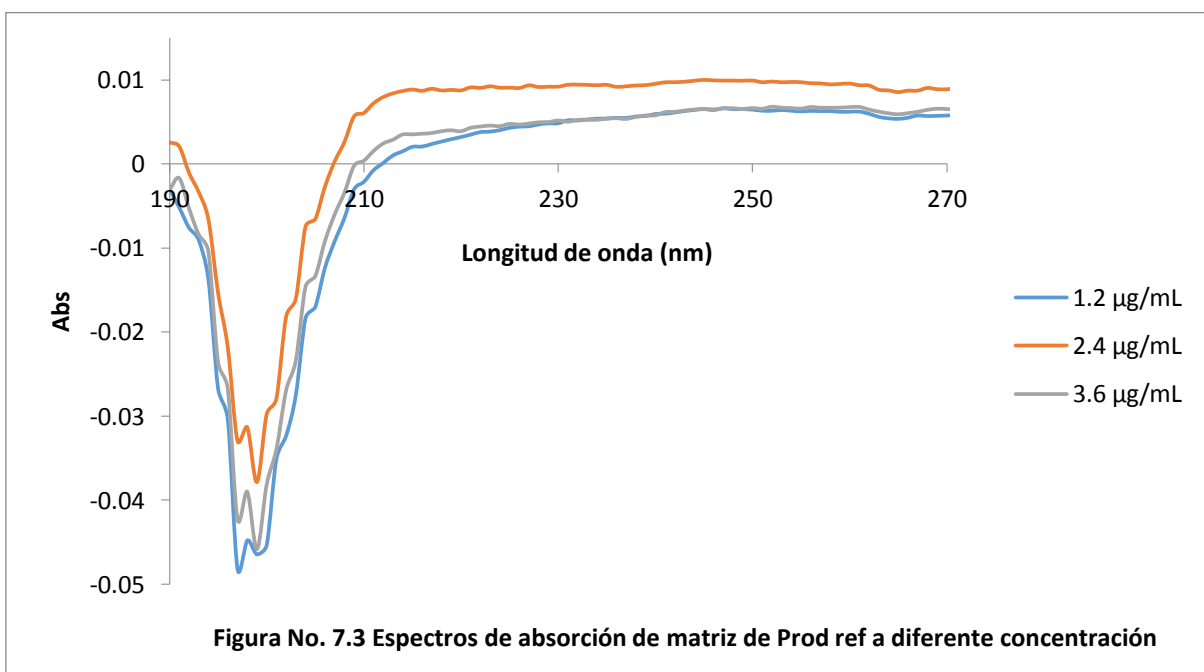
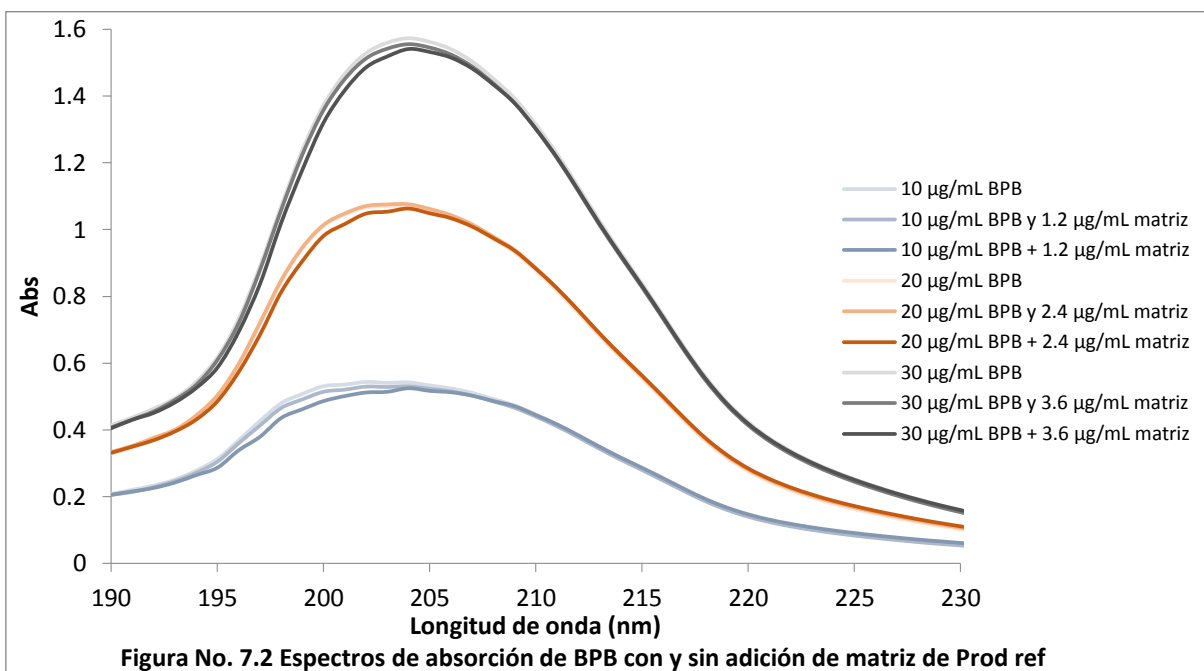
$$H_A = \varepsilon_{\text{sin EXCP}} \neq \varepsilon_{\text{con EXCP}} \text{ (alta)}$$

Tabla No. 7.2. Prueba t para la evaluación de interferencias e interacciones de la matriz del Prod ref			
	ϵ (mL/ μ g*cm)		
	Sin excipientes	Con excipientes	
		Proporción baja (varianzas desiguales)	Proporción alta (varianzas iguales)
\bar{x}	0.0546	0.0540	0.0552
S	0.0020	0.0010	0.0018
CV	3.6767	1.8987	3.2513
β_1	0.0508	0.0520	0.0510
β_0	0.0683	0.0362	0.0767
r	0.9977	0.9987	0.9978
r^2	0.9954	0.9975	0.9955
Varianza	4.0322E-06	1.0507E-06	3.2253E-06
Observaciones		15	
Varianza agrupada		-	3.6288E-06
Grados de libertad		21	28
Estadístico t		1.0792	-0.8933
P(T<=t) dos colas		0.2927	0.3793
Valor crítico de t (dos colas)		2.0796	2.0484

El valor observado de $|t|$ de los coeficientes de absorptividad en ambos casos es menor que el valor crítico, aceptándose la hipótesis nula: no hay diferencia significativa entre las curvas de calibración (sin la adición de excipientes y con la adición de estos en una proporción baja y alta). Esta evaluación forma parte del estudio de especificidad.

Espectros de absorción de BPB con y sin la adición de matriz

A través de los resultados mostrados en la Figura No. 7.2. se confirma que la matriz no interfiere ni interacciona con el analito cualquiera que sea su concentración en la muestra, ya que se presenta la misma respuesta que cuando se evalúa solo el analito; así mismo se observa en la Figura No. 7.3. que la absorbancia de los excipientes es prácticamente nula; por tanto se puede evaluar al analito en presencia de su matriz sin necesidad de un proceso de separación dentro del ensayo analítico.



Optimización del tiempo de agitación (producto de referencia) (15 y 30 min de agitación, con 15 mL de metanol)

Uno de los parámetros que se tomó en cuenta para la optimización del método analítico fue el tiempo de agitación necesario para disolver la BPB en metanol, se usó metanol como disolvente ya que la BPB es muy soluble en el (16.90 mg/mL), el metanol es un compuesto orgánico el cual debe sus relevantes propiedades como disolvente de sustancias iónicas no solo a su alta polaridad y a su constante dieléctrica sino también a otro factor, que contiene un grupo OH el cual puede formar puentes de hidrogeno, este disolvente solvata tanto cationes como aniones, los cationes en su polo negativo y los aniones por medio de puentes de hidrogeno.

Cuando se disuelve un sólido en un líquido, las unidades estructurales, iones o moléculas se separan unas de otras y el espacio entre ellas pasa a ser ocupado por moléculas de disolvente. Durante la disolución, debe de suministrarse energía para vencer fuerzas interiónicas o intermoleculares, la cual es aportada por la formación de enlaces entre partículas de soluto y moléculas de disolvente: las fuerzas anteriores son remplazadas por otras nuevas. (Thornton Morrison & Neilson Boyd, 1998).

Se evaluaron dos tiempos de agitación 15 y 30 minutos, con el propósito de determinar en cuál de estos tiempos se obtiene una mejor recuperación de la BPB, para así tener un método analítico optimizado con el menor tiempo y recursos materiales posibles, sin afectar la eficacia de este. A continuación se muestran los porcentajes de recuperación de BPB en el método analítico de contenido químico de BPB con dos tiempos de agitación (15 y 30 minutos).

Tabla No. 7.3. % de recuperación de BPB para la selección del tiempo de agitación óptimo		
Tiempo de agitación (min)	15	30
	% recuperado de BPB	
	94.5357	94.7678
	94.8618	94.5570
	94.1201	94.2714
\bar{x}	94.5059	94.5320
S	0.3718	0.2492
CV	0.3934	0.2636
S ²	0.1382	0.0621

En la tabla No. 7.3 se pueden observar las medias de recuperación de BPB obtenido en el método analítico de contenido químico con dos diferentes tiempos de agitación así como su S, CV y S²

correspondiente, ambos tiempos de agitación tienen varianzas iguales, esto fue comprobado con una prueba de F de Fisher.

Se compararon las medias obtenidas en los dos diferentes tiempos de agitación mediante una prueba de t, para comprobar si existe o no diferencia significativa entre estos por lo que se plantea las siguientes hipótesis:

$$H_0 = \bar{x}_{15 \text{ min}} = \bar{x}_{30 \text{ min}}$$

$$H_A = \bar{x}_{15 \text{ min}} \neq \bar{x}_{30 \text{ min}}$$

Tabla No. 7.4. Prueba t para las medias de dos tiempos de agitación (15 y 30 min) con varianzas iguales		
Agitación	30 min	15 min
Media	94.5059	94.5320
Varianza	0.1382	0.0621
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0.1001	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-0.1013	
P(T<=t) una cola	0.4621	
Valor crítico de t (una cola)	2.1318	
P(T<=t) dos colas	0.9242	
Valor crítico de t (dos colas)	2.7764	

Hay 4 grados de libertad (3+3-2), el valor crítico de t=2.77 (P=0.05). El valor observado de |t|=-0.1013 es menor que el valor crítico, aceptándose la hipótesis nula: no hay diferencia significativa entre el tiempo de agitación (15 y 30 minutos), por lo que se prueba que el tiempo de agitación no afecta el porcentaje de recuperación.

Linealidad del sistema

En la tabla No. 7.5 se representan los resultados de la evaluación de la linealidad del sistema; que se verificó mediante un análisis de regresión para establecer la relación entre la concentración de BPB y la absorbancia (205 nm). Se observa que el coeficiente de determinación es >0.98 (0.9997) por tanto el sistema es lineal.

Tabla No. 7.5. Evaluación de linealidad del sistema de BPB con Sol amortiguadora de fosfatos pH=6.8		
Concentración de BPB ($\mu\text{g/mL}$)	Abs (205nm)	Factor de respuesta
5.1535	0.2659	0.0516
5.1535	0.2677	0.0519
5.1535	0.2730	0.0530
10.3070	0.5354	0.0519
10.3070	0.5383	0.0522
10.3070	0.5441	0.0528
15.4605	0.8276	0.0535
15.4605	0.8322	0.0538
15.4605	0.8127	0.0526
20.6140	1.0982	0.0533
20.6140	1.0846	0.0526
20.6140	1.0936	0.0531
25.7676	1.3543	0.0526
25.7676	1.3682	0.0531
25.7676	1.3654	0.0530
	\bar{x}	0.0527
	S	0.0006
	CV	1.1744
	r	0.9998
	r^2	0.9997

También se llevó a cabo un ANADEVa, se observa que el IC (β_1), no incluye el cero (0.0525-0.0538) con un nivel de confianza del 95.0%.

Tabla No. 7.6. ANADEVa de la linealidad del sistema						
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	
Regresión ($Abs = \beta_1 C + \beta_0$) [*]	1	2.2529	2.2529	42258.7558	3.221E-24	
Residuos	13	0.0007	5.3312E-05			
Total	14	2.2536				
	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción (β_0)	-0.0047	0.0044	-1.0648	0.3063	-0.0143	0.0048
Concentración de BPB ($\mu\text{g/mL}$) (β_1)	0.0532	0.0003	205.5693	0.0000	0.0526	0.0537

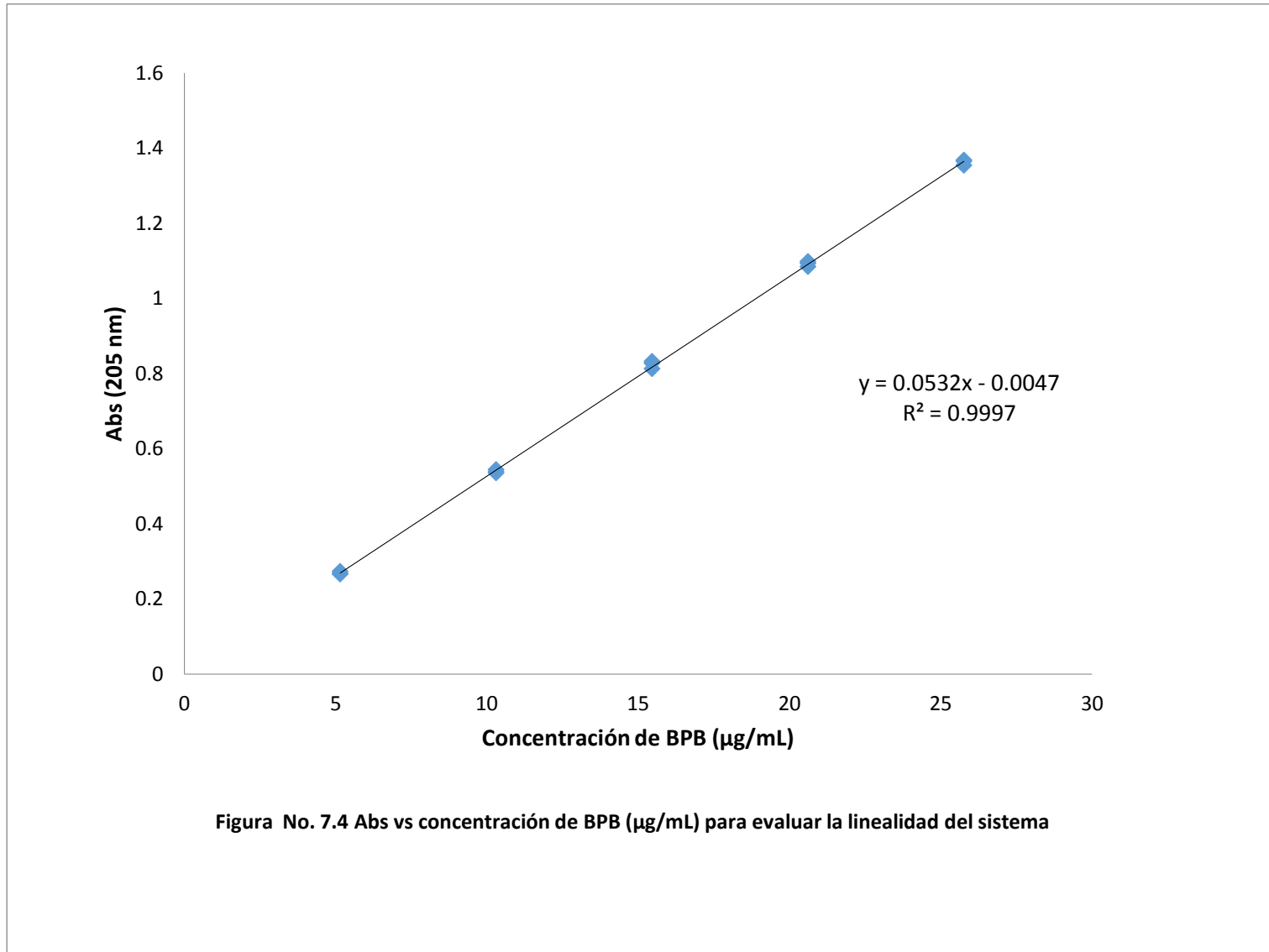
^{*} Abs = absorbancia del analito
C = concentración del analito

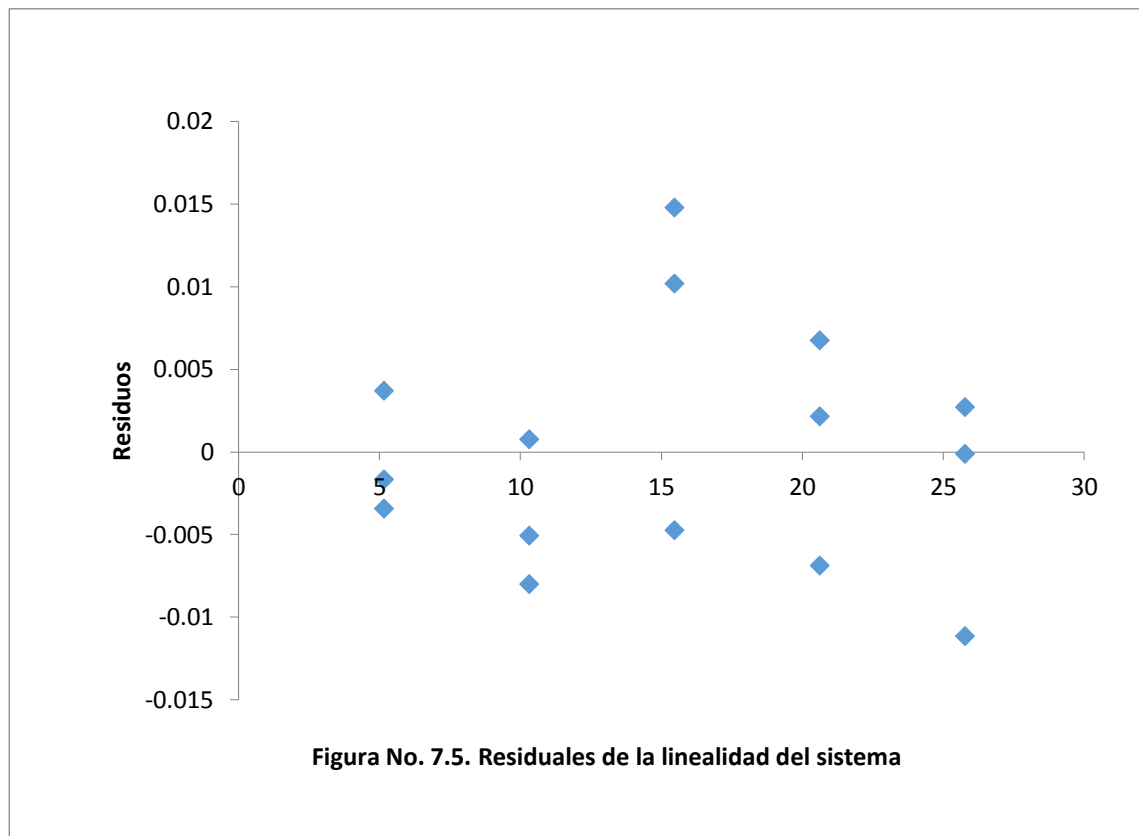
Así mismo se realizó un análisis estadístico de F para confirmar la linealidad del sistema, estableciéndose la siguiente hipótesis:

- H_0 : No existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración recuperada del analito.
- H_A : Existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración recuperada del analito.

Se puede observar que el valor de F calculado es mayor que el valor crítico de F, por lo cual se rechaza la hipótesis nula confirmando que existe una relación lineal entre la cantidad adicionada y la concentración recuperada del analito.

A continuación se ilustra la relación entre la concentración de BPB ($\mu\text{g/mL}$) y la Abs, así como la ecuación de regresión y el coeficiente de determinación.





El análisis de residuales nos permitió verificar el cumplimiento del supuesto de normalidad, independencia y homogeneidad de la varianza, en la Figura No. 7.5. observamos que no hay tendencia observándose un comportamiento aleatorio.

Precisión y evaluación de la predicción del sistema

A partir de los resultados de la Tabla No. 7.7 se puede afirmar que el sistema es preciso, ya que el CV < de 1.5% (0.8123).

Tabla No. 7.7. Evaluación de la precisión del sistema de BPB con Sol amortiguadora de fosfatos pH=6.8

Concentración de BPB (C _r)(µg/mL)	Abs (205 nm)	Factor de respuesta
5.1535	0.2738	0.0531
5.1535	0.2742	0.0532
5.1535	0.2759	0.0535
5.1535	0.2697	0.0523
5.1535	0.2730	0.0530
5.1535	0.2707	0.0525
15.4605	0.8242	0.0533
15.4605	0.8265	0.0535
15.4605	0.8321	0.0538
15.4605	0.8315	0.0538
15.4605	0.8326	0.0539
15.4605	0.8325	0.0538
25.7676	1.3677	0.0531
25.7676	1.3680	0.0531
25.7676	1.3689	0.0531
25.7676	1.3652	0.0530
25.7676	1.3650	0.0530
25.7676	1.3659	0.0530
	\bar{x}	0.0532
	S	0.0004
	CV	0.8123

Especificidad (producto de referencia y producto de prueba)

Tabla No. 7.8. Evaluación de la degradación de BPB en HCl 1M (Sol A)

	Abs (205 nm)	mg de BPB	% de BPB	% degradado
	-	9.2680	100	0
7 días después	0.1134	4.4398	47.9052	52.0948

Tabla No. 7.9. Resultados de la determinación de la especificidad del método analítico para la determinación de contenido químico de BPB en Prod ref y Prod pba

Sol	$\overline{\text{Abs}}$ (205 nm)	Cantidad de BPB cuantificado (mg)
Prod ref		
B	0.7152	67.6556
AB	0.8249	77.9657
B-A	0.7115	67.3079
Prod pba		
B	0.7859	74.3076
AB	0.8968	84.7264
B-A	0.7834	74.0685

Tabla No. 7.10. Prueba t para evaluar la especificidad del método para determinar contenido químico de BPB en Prod ref y Prod pba suponiendo varianzas iguales

	Prod ref		Prod pba	
	<i>Sol B</i>	<i>Sol B-A</i>	<i>Sol B</i>	<i>Sol B-A</i>
Media	67.6556	67.3079	74.3076	74.0685
Varianza	0.2195	0.0864	0.0368	0.0656
Observaciones	3			
Varianza agrupada	0.1529		0.0512	
Grados de libertad	4			
Estadístico t	1.0890		1.2948	
P(T<=t) una cola	0.1687		0.1325	
Valor crítico de t (una cola)	2.1318		2.1318	
P(T<=t) dos colas	0.3374		0.2651	
Valor crítico de t (dos colas)	2.7764		2.7764	

Linealidad del método

Se evaluó la linealidad del método para determinar contenido químico de BPB a través del análisis de placebos cargados para demostrar que los resultados obtenidos son proporcionales a la concentración del analito. Se analizaron cinco niveles de diferente proporción de BPB cada uno por triplicado.

Las tablas 7.12 y 7.13 resumen las cantidades adicionada y recuperada de la sustancia de referencia secundaria de BPB, así como los porcentajes recuperados de BPB en cada uno de los niveles seleccionados.

Tabla No. 7.11. Cantidades adicionada y recuperada de la SR2 de BPB obtenidos en la evaluación de la linealidad del método analítico de contenido químico de BPB en placebos cargados

Nivel (% BPB)	Cantidad adicionada [A] (mg)	Cantidad recuperada [R] (mg)	[A]/[R]	
110	72.1776	72.6369	0.9937	
110	71.8726	72.2505	0.9948	
110	71.9120	72.0173	0.9985	
107	67.8642	69.1988	0.9807	
107	67.6326	68.5682	0.9864	
107	67.7581	69.1238	0.9802	
100	63.0635	63.1400	0.9988	
100	62.8396	62.2630	1.0093	
100	63.0008	62.5560	1.0071	
90	56.3847	56.4364	0.9991	
90	56.4651	55.3860	1.0195	
90	56.6260	55.7611	1.0155	
80	49.8399	49.5492	1.0059	
80	49.8826	49.8696	1.0003	
80	50.0535	51.0122	0.9812	
	β_0	-2.0054	S	0.0123
	β_1	1.0350	\bar{y}	0.9981
	r^2	0.9932	CV	1.2294

Tabla No. 7.12. % de recobro de la SR2 obtenidos en la evaluación de la linealidad del método analítico de contenido químico de BPB en placebos cargados

Nivel (% BPB)	% de recobro
110	100.6362
110	100.5257
110	100.1464
107	101.9665
107	101.3833
107	102.0156
100	100.1213
100	99.0824
100	99.2940
90	100.0917
90	98.0889
90	98.4726
80	99.4168
80	99.9739
80	101.9154
\bar{x}	100.2087
s	1.2320
CV	1.2295
IC sup	100.7357
IC inf	99.6818

De acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación de la linealidad del método de contenido químico de BPB se puede considerar como lineal ya que cumple con los criterios establecidos, en la evaluación de la cantidad adicionada vs la cantidad recuperada se obtuvo un coeficiente de determinación $r^2 > 0.98$ (0.993), el IC (β_1) incluye la unidad, el IC (β_0) incluye el cero, con un CV <3% (1.2294). En la evaluación del porcentaje recuperado los intervalos de confianza incluyen el 100% teniendo un CV <3% (1.2295).

Tabla No. 7.13. ANADEVIA de la evaluación de la linealidad del método analítico de contenido químico de BPB por adiciones patrón

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>	
Regresión (Abs= $\beta_1 C + \beta_0$)*	1	995.6513	995.6513	1898.18145	1.7786E-15	
Residuos	13	6.8189	0.5245			
Total	14	1002.4702				
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción (β_0)	-2.0054	1.4806	-1.3545	0.1987	-5.2041	1.1932
Pendiente (β_1)	1.0350	0.0238	43.5681	1.7786E-15	0.9837	1.0863

* Abs = absorbancia del analito
C = concentración del analito

Así mismo se realizó un análisis estadístico de F para confirmar la linealidad del método, estableciéndose la siguiente hipótesis:

- H_0 : No existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración recuperada del analito.
- H_A : Existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración recuperada del analito.

Se puede observar que el valor de F calculado es mayor que el valor crítico de F, por lo cual se rechaza la hipótesis nula confirmando que existe una relación lineal entre la cantidad adicionada y la concentración recuperada del analito

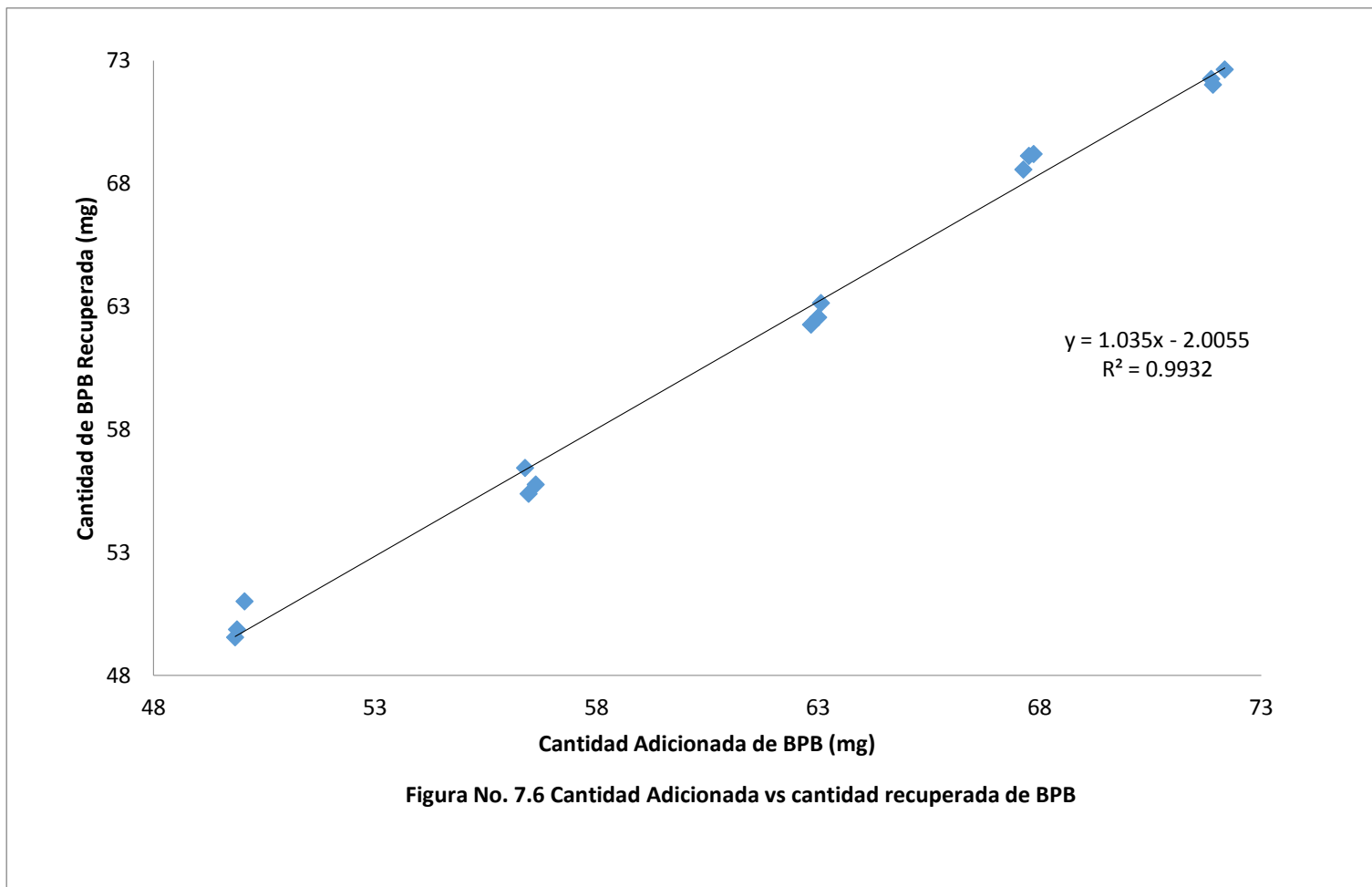


Figura No. 7.6 Cantidad Adicionada vs cantidad recuperada de BPB

Exactitud y repetibilidad del método

En la Tabla 7.15 se resumen los porcentajes recuperados de la sustancia de referencia secundaria de BPB en los diferentes niveles de porcentaje de BPB; a partir de estos datos se demuestra que el método para determinar contenido químico es exacto ya que la media del porcentaje recuperado se encuentra entre 97-103%, además es repetible ya que el CV del porcentaje recuperado no es mayor al 2% de acuerdo a los criterios de aceptación para un método espectrofotométrico.

Tabla No. 7.14. % recuperados de SR2 obtenidos en la evaluación de la exactitud y repetibilidad del método analítico de contenido químico de BPB en placebos cargados

Nivel (% BPB)	% de recobro
100	100.1213
100	98.8570
100	99.5487
100	98.6525
100	99.1491
100	98.7758
\bar{x}	99.1841
s	0.5601
CV	0.5647
IC sup	99.6322
IC inf	98.7359

Precisión intermedia (producto de referencia)

Se evaluó la precisión intermedia del método de contenido químico, en dos días diferentes y por dos analistas diferentes, obteniéndose así un CV < 3% en las determinaciones individuales por lo que el método es preciso.

	Día 1	Día 2	\bar{x}	CV
Analista 1	94.5586	95.1661	94.8567	0.5
	95.1889	95.0944		
	95.0412	94.0910		
Analista 2	94.0027	94.2313	93.7314	0.5
	93.0046	93.9273		
	93.5628	93.6600		
$\bar{\bar{x}}$	94.2265	94.3617		
CV	0.9	0.7		
	\bar{y}	94.2941		
	S	0.7195		
	CV	0.8		

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Día(Analista)	0.291649	2	0.145825	0.24	0.7893
Residuo	5.40234	9	0.60026		
Total (corregido)	5.69399	11			

Se realizó una ANADEVIA de dos factores anidados Día (Analista), para la evaluación de la precisión intermedia del método de contenido químico de BPB en el cual los factores están estructurados en una manera jerárquica. Dado que el valor-P en la tabla ANADEVIA para porcentaje de BPB que corresponde a Día (Analista) es mayor 0.05 (0.7893), no hay una relación estadísticamente significativa entre el porcentaje de BPB y las variables predictoras con un nivel de confianza del 95.0.

 Determinación de contenido químico de BPB en producto de referencia y producto de prueba

Tabla No. 7.17. Contenido químico de BPB en Prod ref y Prod pba			
	Prod ref	Prod pba	Diferencia
Contenido químico	94.3205	98.6406	4.3201
n*	3	3	
S	0.3383	0.5039	
CV	0.3587	0.5109	
* número de determinaciones			

MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAR CANTIDAD DISUELTA DE BPB EN PRODUCTO DE REFERENCIA Y PROD PBA
DESARROLLO

Determinación de la solubilidad de la sustancia de secundaria de BPB en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 a 37 °C

Cabe mencionar que la molécula de BPB es un ácido débil con un pKa de 2.76, por lo tanto se espera que aumente su solubilidad cuando se encuentre en la solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 ya que se encontrara la especie ionizada. La benzatina que reemplaza el catión H del grupo carboxilo de la penicilina G le confiere la más baja hidrosolubilidad con respecto a las sales inorgánicas de la penicilina G (sódica y potásica), esto con fines terapéuticos ya que se requiere una baja liberación e hidrólisis para alcanzar una concentración sostenida del mismo. Por lo general esta sal puede ser anhidra, mono o tetrahidratada, siendo más soluble la forma anhidra. Anteriormente se comentó que la determinación de la solubilidad sería útil para estimar el volumen de disolvente para llevar a cabo el estudio del proceso de la disolución en condiciones sink o viceversa, para estimar la cantidad de polvo de producto de referencia para alcanzar estas condiciones. De acuerdo a los resultados experimentales la BPB tiene una baja solubilidad (0.3619 mg/mL a 37°C), por lo tanto se estima que son necesarios entre 13.7 y 27.2 L de solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 para satisfacer las condiciones sink para una unidad de dosis del producto de referencia, que contiene aproximadamente 990.9165 mg de BPB (lo cual excede la capacidad del aparato II USP); o en el caso contrario se deben de agregar solo 36.5 mg del producto en los 900 mL (lo cual no es una cantidad representativa).

Elección de la dilución en el perfil de disolución en el aparato II USP

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el ensayo realizado para la elección de la dilución para perfiles de disolución en el aparato II USP, se realizaron dos diluciones diferentes (2/10 mL y 5/25 mL):

Tabla No. 7.18. ANADEVa de la elección de la dilución en perfiles de disolución en el aparato II USP del Prod ref					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2.105	1	2.105	0.03	0.861
Intra grupos	1901.78	28	67.920		
Total (Corr.)	1903.88	29			

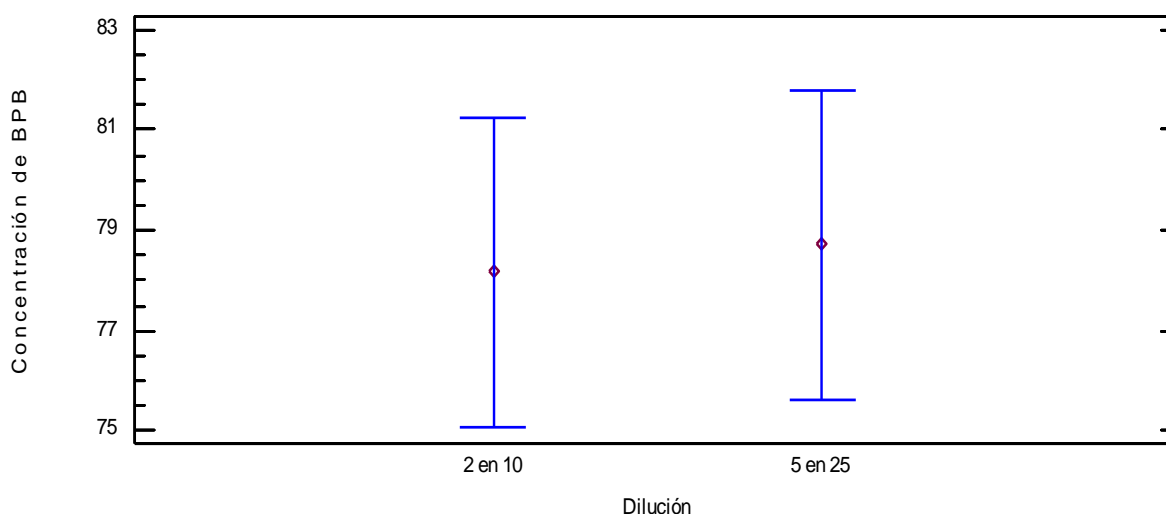


Figura No. 7.7 Evaluación de la dilución del método de cantidad disuelta de BPB (Medias e intervalos LSD 95%)

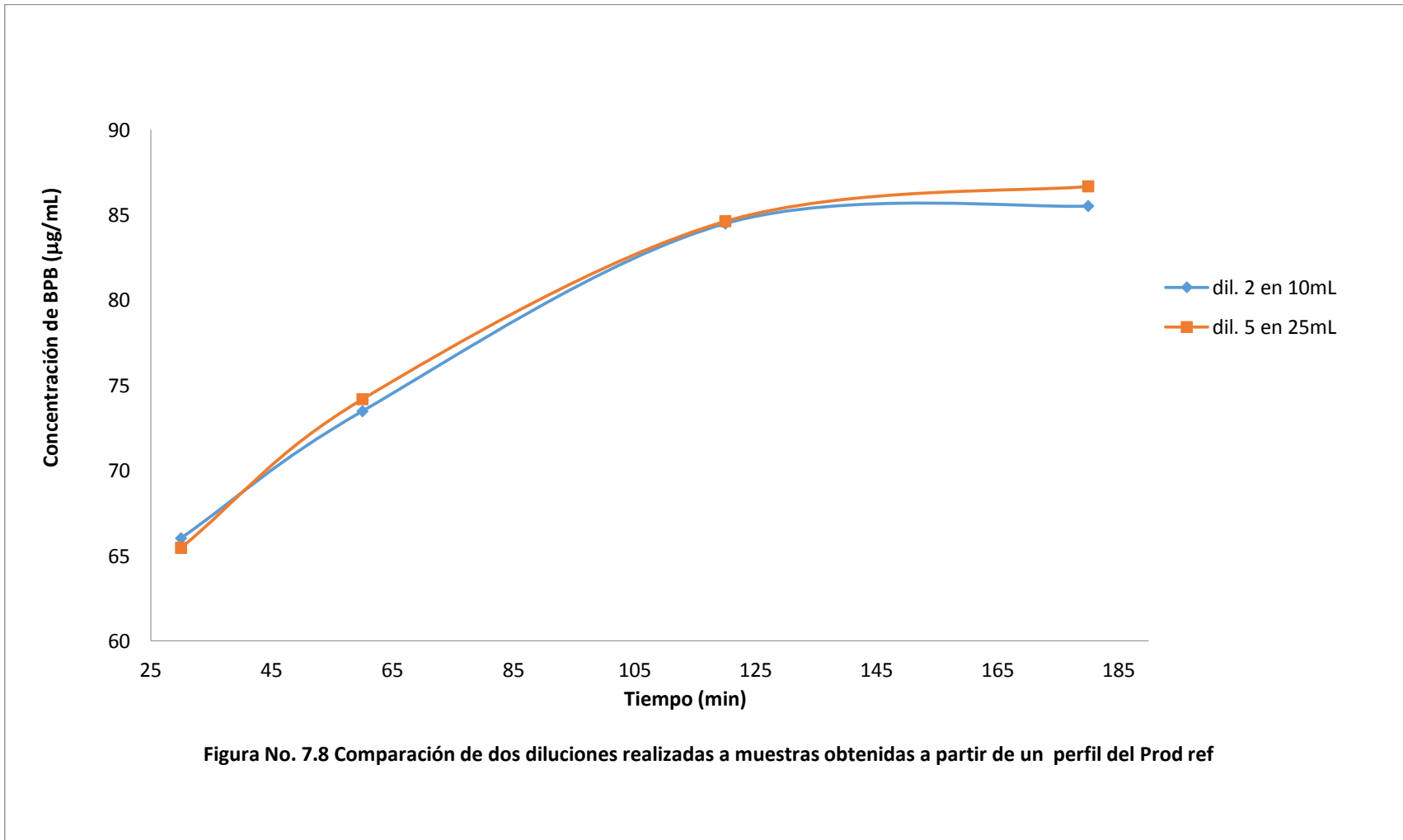
El valor-P prueba la significancia estadística del factor estudiado en este caso fue la dilución, puesto que un valor-P es mayor a 0.05 este no tienen efecto estadísticamente significativo sobre la concentración de BPB (µg/mL) con un 95.0% de nivel de confianza.

Una vez comprobado que la dilución no ejerce efecto estadísticamente significativo se procedió a determinar cuál de estas tiene un menor error aleatorio y una menor influencia en la precisión del resultado analítico mediante el cálculo del CV como se muestra a continuación, en lo cual se puede

observar que la dilución de 5/25 mL es menor, por lo que esta fue la dilución elegida para los perfiles de disolución que posteriormente se realizarían.

Tabla No. 7.19. Parámetros estadísticos de tres muestras de Prod ref a diferentes tiempos de muestreo en el aparato II con una dilución 2/10 mL y 5/25 mL

Concentración de BPB ($\mu\text{g/mL}$)			
Dilución 2/10 mL			
Tiempo (min)	\bar{x}	S	CV
30	66.0317	3.1046	4.7016
60	73.4910	1.9532	2.6578
120	84.5061	4.2369	5.0137
180	85.5368	2.9189	3.4125
	CV _{global}	3.9464	
Dilución 5/25 mL			
	\bar{x}	S	CV
30	65.4741	2.4641	3.7635
60	74.1970	2.2664	3.0545
120	84.6439	0.6743	0.7966
180	86.6928	3.0366	3.5027
	CV _{global}	2.7793	



Evaluación de influencia del filtro

Se evaluó la influencia del filtro para determinar si existe o no adherencia del fármaco a este y de esta forma cerciorarse que los filtros no retengan el principio activo pero sí los excipientes.

Tabla No. 7.20. Diferencia absoluta del promedio de % recuperados de BPB en la evaluación de papel filtro Wathman 542 (2.7 μm)	
	Sol STD
$DA = \overline{\%}_{\text{sol filtrada}} - \overline{\%}_{\text{sol sin filtrar}}$	0.5910

La diferencia absoluta de los promedios de seis soluciones filtradas con papel Whatman 542 (2.7 μm) menos los promedios seis soluciones sin filtrar fue menor de 2% por lo que se dice que no hay adherencia del fármaco al filtro.

Estabilidad de la muestra (producto de referencia y producto de prueba)

La estabilidad de la muestra es la propiedad del analito por analizar de conservar sus características desde el momento del muestreo hasta su análisis, por lo que esta se evaluó en diferentes intervalos de tiempo hasta 1440 min que sería el tiempo máximo que tardaría en llevarse acabó el análisis de la muestra.

La Tabla No. 7.23 muestra los resultados obtenidos de la estabilidad de la muestra (producto de referencia y producto de prueba) en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 durante 1440 minutos a una temperatura de $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, obteniéndose una diferencia absoluta del promedio de la concentración de BPB del cuantificado al final y al inicio del análisis menor al 3% lo que indica que ambos productos son estables durante 1440 minutos.

Tabla No. 7.21. Diferencia absoluta del promedio de la concentración de BPB (μg/mL) cuantificado en la muestra (Prod ref y Prod pba) en la evaluación de la estabilidad	
	Prod ref
$DA = \overline{\text{Con. cuantificado}}_{\text{final}} - \overline{\text{Con. cuantificado}}_{\text{inicial}}$	0.0637
	Prod pba
$DA = \overline{\text{Con. cuantificado}}_{\text{final}} - \overline{\text{Con. cuantificado}}_{\text{inicial}}$	-0.3300

Linealidad del método

Se evaluó la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB del producto de referencia y producto de prueba, para demostrar que los resultados obtenidos son proporcionales a la concentración del analito. Se analizaron cinco niveles de concentración cada uno por triplicado.

La Tabla No. 7.24. y Tabla No. 7.25. resumen las concentraciones adicionada y recuperada de la sustancia de referencia secundaria de BPB, así como los porcentaje recuperados de la sustancia de referencia secundaria de BPB, ambos obtenidos en los diferentes sistemas de acuerdo al método de adiciones patrón.

Tabla No. 7.22. Concentraciones adicionada y recuperada de SR2 obtenidos en la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod ref)			
Concentración adicionada [A] (µg/mL)	Concentración recuperada [R] (µg/mL)		[A]/[R]
1.9371	1.9395		1.0013
3.8742	3.9740		1.0258
5.8113	5.9343		1.0212
7.7484	7.7537		1.0007
9.6855	9.8367		1.0156
1.9371	1.9719		1.0179
3.8742	3.9786		1.0270
5.8113	5.8826		1.0123
7.7484	7.7223		0.9966
9.6855	9.8399		1.0159
1.9371	1.9384		1.0007
3.8742	3.9617		1.0226
5.8113	5.9018		1.0156
7.7484	7.6757		0.9906
9.6855	9.8931		1.0214
β_0	0.0126	S	0.0115
β_1	1.0097	\bar{x}	5.8803
r^2	0.9994	CV	0.1949

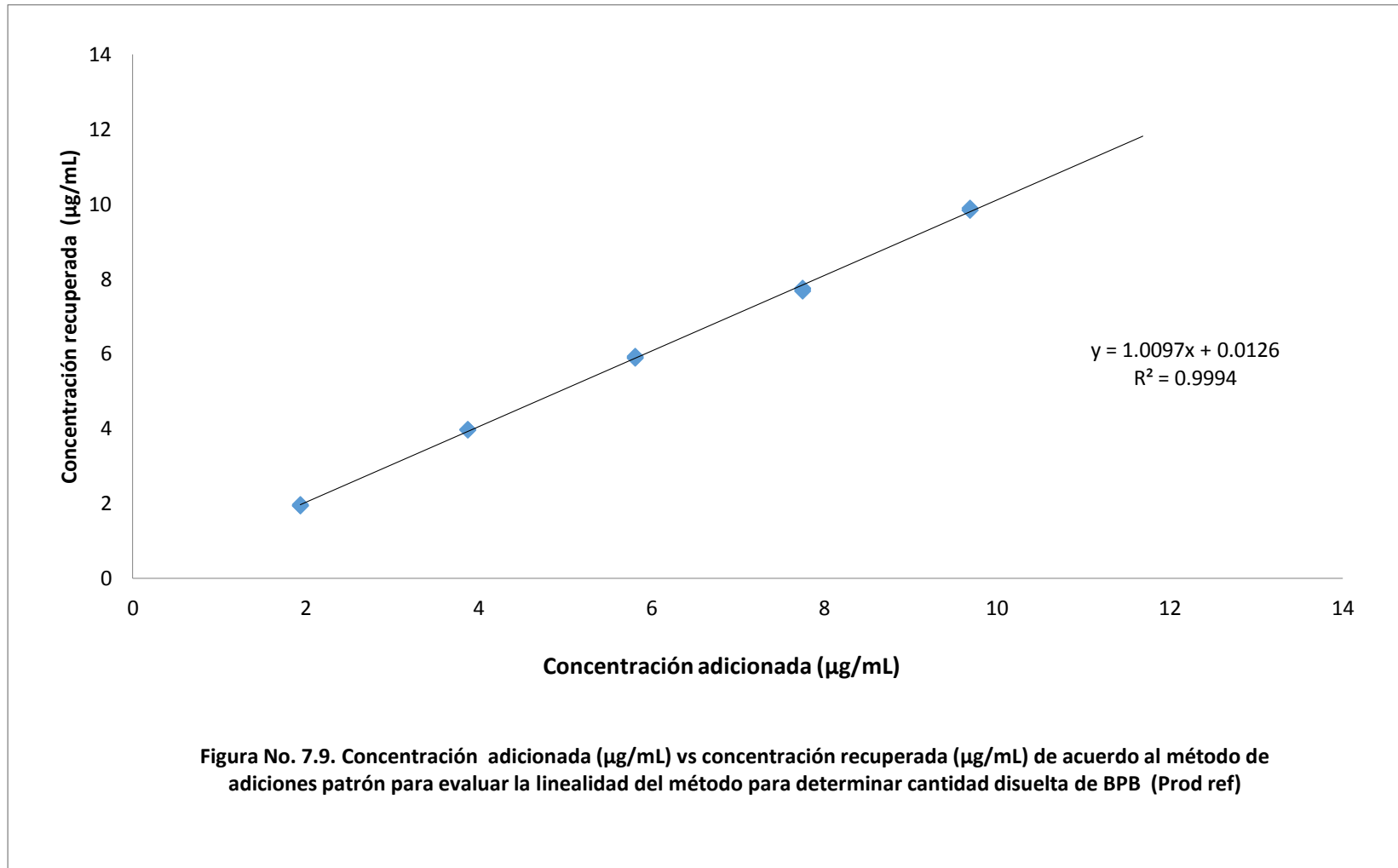


Tabla No. 7.23. % recuperados de SR2 obtenidos en la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod ref)

	% de recobro
1	100.1263
1	101.7948
1	100.0671
2	102.5756
2	102.6952
2	102.2593
3	102.1169
3	101.2276
3	101.5568
4	100.0677
4	99.6631
4	99.0621
5	101.5615
5	101.5944
5	102.1429
\bar{x}	101.2341
s	1.1458
CV	1.1319
IC inf	100.5995
IC sup	101.8687

De acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación de la linealidad el método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB se puede considerar como lineal ya que cumple con los criterios establecidos, en la evaluación de la cantidad adicionada vs la cantidad recuperada se obtuvo un coeficiente de determinación $r^2 > 0.98$ (0.999), el IC (β_1) incluye la unidad, el IC (β_0) incluye el cero, con un CV $< 3\%$ (0.1949). En la evaluación del % recuperado los intervalos de confianza incluyen el 100% teniendo un CV $< 3\%$ (1.1319).

Tabla No. 7.24. ANADEV A de la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod ref)

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	
Regresión (Abs= $\beta_1 C + \beta_0$)*	1	114.7671	114.7671	20738.4805	3.2852E-22	
Residuos	13	0.0719	0.0055			
Total	14	114.8391				
	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción (β_0)	0.0126	0.0450	0.2791	0.7846	-0.0847	0.1099
Pendiente (β_1)	1.0097	0.0070	144.0086	0.0000	0.9946	1.0249

* Abs = absorbancia del analito
C = concentración del analito

Comparación de la pendiente de la regresión lineal de la evaluación de la linealidad del sistema y la linealidad del método

Tabla No. 7.25. Valores de regresión lineal obtenidos en la evaluación de la linealidad del sistema y la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB (Prod ref)

Linealidad	Intercepto	Pendiente
Método	0.313616	0.0533779
Sistema	-0.00470452	0.0531753

Tabla No. 7.26. ANADEV A para la comparación de las pendientes de la regresión lineal en la evaluación de la linealidad del sistema y linealidad del método para determinar cantidad disuelta de BPB (Prod ref)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Concentración	9.13705	1	9.13705	504.17	0.0000
Interceptos	1.1816	1	1.1816	65.20	0.0000
Pendientes	0.0000254095	1	0.0000254095	0.00	0.9702
Modelo	10.3187	3			

La prueba F para las Pendientes prueba las hipótesis:

H₀: Las pendientes de la regresión lineal de la evaluación de la linealidad del sistema y la de la linealidad del método son iguales

H_A: Las pendientes de la regresión lineal de la evaluación de la linealidad del sistema y la de la linealidad del método no son iguales

Debido a que el valor de P es mayor a 0.05, no se rechaza la hipótesis nula por lo tanto las pendientes de la regresión lineal de la evaluación de la linealidad del sistema y la de la linealidad del método no varían significativamente con un nivel de confianza de 95%.

Producto de prueba

La Tabla No. 7.29. y Tabla No. 7.30. resumen las concentraciones adicionada y recuperada de la sustancia de referencia secundaria de BPB, así como los porcentaje recuperados de la sustancia de referencia secundaria de BPB, ambos obtenidos en los diferentes sistemas de acuerdo al método de adiciones patrón.

Tabla No. 7.27. Concentraciones adicionada y recuperada de SR2 obtenidos en la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod pba)			
Concentración adicionada [A] ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración recuperada [R] ($\mu\text{g/mL}$)		[A]/[R]
1.9386	1.9549		1.0084
3.8773	3.9114		1.0088
5.8159	5.8895		1.0126
7.7546	7.8977		1.0185
9.6932	9.6977		1.0005
1.9386	1.9498		1.0058
3.8773	3.9529		1.0195
5.8159	5.7976		0.9969
7.7546	7.8496		1.0122
9.6932	9.7161		1.0024
1.9386	1.9257		0.9933
3.8773	3.9210		1.0113
5.8159	5.8805		1.0111
7.7546	7.9049		1.0194
9.6932	9.6983		1.0005
β_0	0.0202	S	0.0081
β_1	1.0047	\bar{y}	1.0081
r^2	0.9997	CV	0.8048

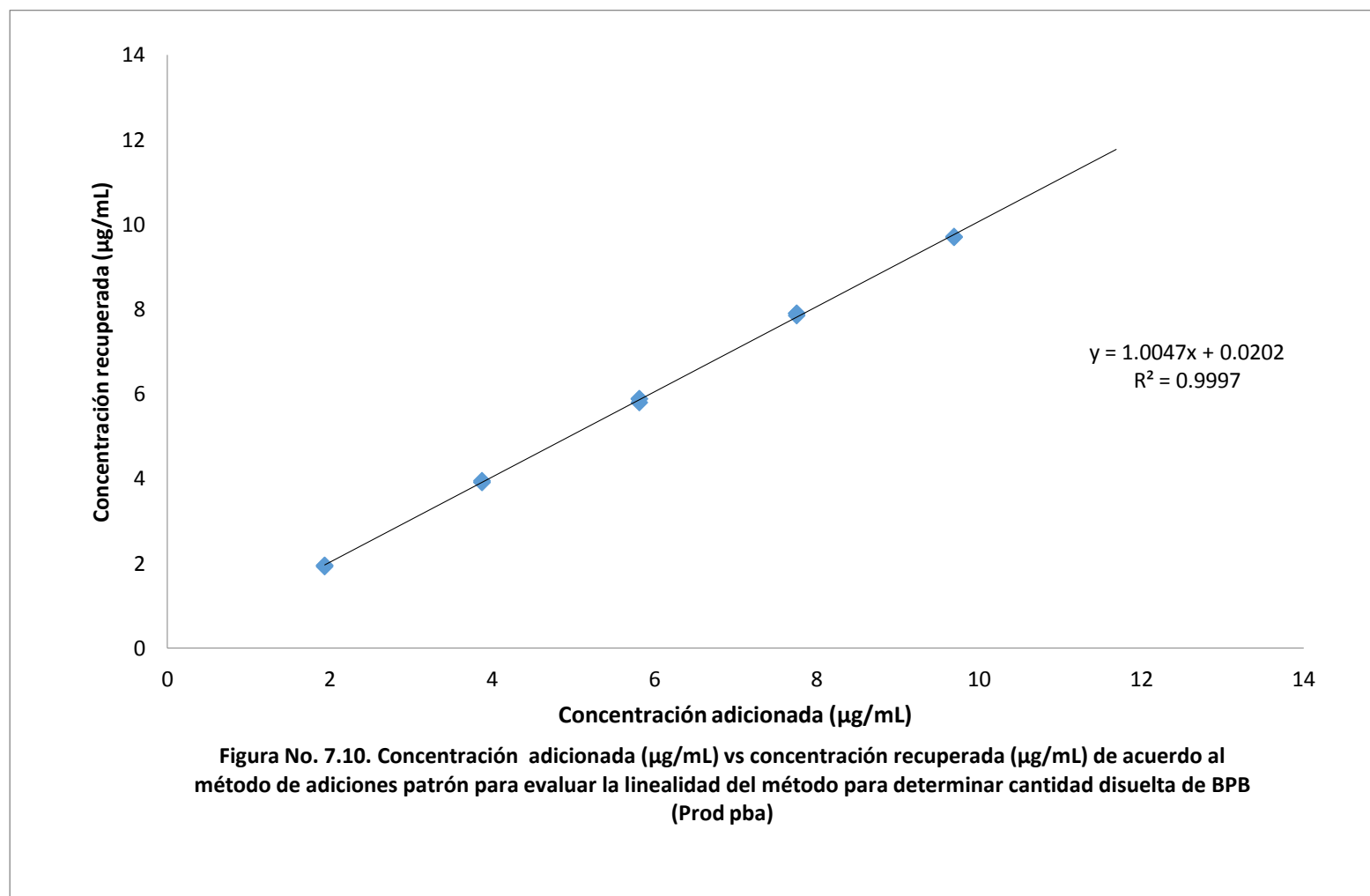


Tabla No. 7.28. % recuperados de SR2 obtenidos en la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod pba)

Nivel	% Recuperado
1	100.8398
1	100.5757
1	99.3307
2	100.8805
2	101.9497
2	101.1273
3	101.2645
3	99.6854
3	101.1100
4	101.8453
4	101.2247
4	101.9387
5	100.0458
5	100.2362
5	100.0520
\bar{x}	100.8071
s	0.8113
CV	0.8048
IC sup	101.2564
IC inf	100.3577

De acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación de la linealidad el método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB del producto de prueba se puede considerar como lineal ya que cumple con los criterios establecidos, en la evaluación de la cantidad adicionada vs la cantidad recuperada se obtuvo un coeficiente de determinación $r^2 > 0.98$ (0.999), el IC (β_1) incluye la unidad, el IC (β_0) incluye el cero, con un CV <3% (0.8048). En la evaluación del porcentaje recuperado los intervalos de confianza incluyen el 100% teniendo un CV <3% (0.8048).

Tabla No. 7.29. ANADEV A de la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod pba)

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	
Regresión (Abs= $\beta_1 C + \beta_0$)*	1	113.8028	113.8028	41072.9143	3.8754E-24	
Residuos	13	0.0360	0.0028			
Total	14	113.8389				
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción (β_0)	0.0202	0.0319	0.6323	0.5381	-0.0487	0.0890
Pendiente (β_1)	1.0047	0.0050	202.6645	3.8754E-24	0.9939	1.0154

* Abs = absorbancia del analito
C = concentración del analito

Comparación de la pendiente de la regresión lineal de la evaluación de la linealidad del sistema y la linealidad del método

Tabla No. 7.30. Valores de regresión lineal obtenidos en la evaluación de la linealidad del sistema y la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB (Prod pba)

Linealidad	Intercepto	Pendiente
Método	0.330634	0.0563679
Sistema	-0.00470452	0.0531753

Tabla No. 7.31. ANADEV A para la comparación de las pendientes de la regresión lineal en la evaluación de la linealidad del sistema y linealidad del método para determinar cantidad disuelta de BPB (Prod pba)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Concentración	5.18429	1	5.18429	249.94	0.0000
Interceptos	1.26587	1	1.26587	61.03	0.0000
Pendientes	0.00505494	1	0.00505494	0.24	0.6231
Modelo	6.45521	3			

La prueba F para las Pendientes prueba las hipótesis:

H_0 : Las pendientes de la regresión lineal de la evaluación de la linealidad del sistema y la de la linealidad del método son iguales

H_A : Las pendientes de la regresión lineal de la evaluación de la linealidad del sistema y la de la linealidad del método no son iguales

Debido a que el valor de P es mayor a 0.05, no se rechaza la hipótesis nula por lo tanto las pendientes de la regresión lineal de la evaluación de la linealidad del sistema y la de la linealidad del método no varían significativamente con un nivel de confianza de 95%.

Reproducibilidad intralaboratorio (producto de referencia)

Se determinó la reproducibilidad intralaboratorio del método analítico de la cuantificación de BPB en perfiles de disolución (producto de referencia y producto de prueba) evaluando el efecto de dos analistas en la precisión de este, como se puede observar en los resultados obtenidos a partir de dos muestras homogéneas se obtuvo un CV < 3% en las determinaciones de ambos analistas en los dos productos evaluados por lo que el método es reproducible.

Tabla No. 7.32. Resultados de la evaluación de reproducibilidad intralaboratorio		
	Concentración ($\mu\text{g/mL}$) de BPB	
	Prod ref	Prod pba
Analista 1	101.8807	75.3477
	101.9016	75.3947
Analista 2	100.9900	74.5175
	101.4317	73.9818
\bar{x}	101.5510	74.8105
S	0.4323	0.6837
CV	0.4257	0.9140

Tabla No. 7.33. ANADEVa para la evaluación de la reproducibilidad intermedia del método de cantidad disuelta de BPB (Prod ref y Prod pba)					
Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.62333	1	1.62333	0.01	0.9369
Intra grupos	1430.46	6	238.409		
Total (corregido)	1432.08	7			

Así mismo se realizó una ANADEVa para la evaluación de la reproducibilidad intermedia del método de cantidad disuelta de BPB (producto de referencia y producto de prueba), en el cual se evaluó el efecto del analista sobre la cuantificación de BPB. Dado que el valor-P es mayor 0.05 (0.9369), no hay efecto estadísticamente significativo del analista sobre nuestra variable de respuesta (Concentración ($\mu\text{g/mL}$) de BPB) con un nivel de confianza del 95.0%.

Tabla No. 7.34. Resumen de las características de validación de dos métodos analíticos (uno para la determinación de contenido químico de BPB y otro para la determinación de % disuelto de BPB) para Prod ref y Prod pba

Características de validación		Resultados	Prod ref	Prod pba	
Sistema	Precisión y exactitud	S	0.0004		
		CV	0.8123		
	Linealidad	β_1	0.0532		
		β_0	-0.0047		
		r^2	0.9997		
		IC (β_1) _{97.5%}	0.0525-0.0538		
		Intervalo (%)	33.3333-166.6666		
Método para determinar contenido químico	Especificidad	Respuesta	Debido sólo por el analito		
	Exactitud y repetibilidad	\bar{y}	99.1841	-----	
		S_y	0.5601	-----	
		CV_y	0.5647	-----	
		IC(μ) _{%recobro}	98.7359-99.6322	-----	
	Linealidad	[adicionada] vs [recuperada]	β_1	1.0350	-----
			β_0	-2.0054	-----
			r^2	0.9932	-----
			IC (β_1) _{97.5%}	0.9749-1.0952	-----
		IC (β_0) _{97.5%}	-5.7552-1.7444	-----	
		% recobro	CV_{y_A}	1.2294	-----
			\bar{y}	100.2087	-----
			S_y	1.2320	-----
	CV_y		1.2295	-----	
	Precisión intermedia	IC(μ) _{%recobro}	99.6818-100.7357	-----	
		\bar{y}	94.2941	-----	
		S_y	0.7195	-----	
		CV_y	0.8	-----	
	Método para perfiles de disolución	Estabilidad de la muestra (fármaco)	Temperatura	24±1 °C	
			Tiempo	180	
DA = $\frac{\% \text{cuantificado}_{\text{final}} - \% \text{cuantificado}_{\text{inicial}}}{\% \text{cuantificado}_{\text{inicial}}}$			1.3669		
Estabilidad de la muestra (medicamento)		Temperatura	24±1 °C	24±1 °C	
		Tiempo	1440 min	1440 min	
		DA = $\frac{\% \text{cuantificado}_{\text{final}} - \% \text{cuantificado}_{\text{inicial}}}{\% \text{cuantificado}_{\text{inicial}}}$	0.0637	-0.3077	
Influencia del filtro		DA = $\frac{\% \text{cuantificado}_{\text{sinfiltrar}} - \% \text{cuantificado}_{\text{filtrado}}}{\% \text{cuantificado}_{\text{filtrado}}}$	0.5910		
Linealidad		r	0.9997	0.9998	
		S	0.0115	0.0081	
		r^2	0.9994	0.9997	
		IC (β_0) _{95%}	-0.1015-0.1267	0.9921-1.0172	
		IC (β_1) _{95%}	0.9919-1.0275	-0.0606-0.1009	
		CV	0.1949	0.8048	
Comparación entre la pendiente del sistema y del método		La comparación entre la pendiente del sistema y del método no deben presentar diferencia significativa	No existe diferencia significativa	No existe diferencia significativa	
Exactitud		$\% \text{cuantificado}$	100.5995-101.8687	100.3577-101.2564	
Precisión		Repetibilidad	$CV_{\% \text{cuantificado}}$	1.1319	0.8048
	Reproducibilidad intralaboratorio	$CV_{\text{global } \% \text{cuantificado}}$	0.4257	0.9140	

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE DISOLUCIÓN EN EL APARATO II USP

Evaluación de la velocidad de agitación para la elaboración de los perfiles de disolución en el aparato II USP

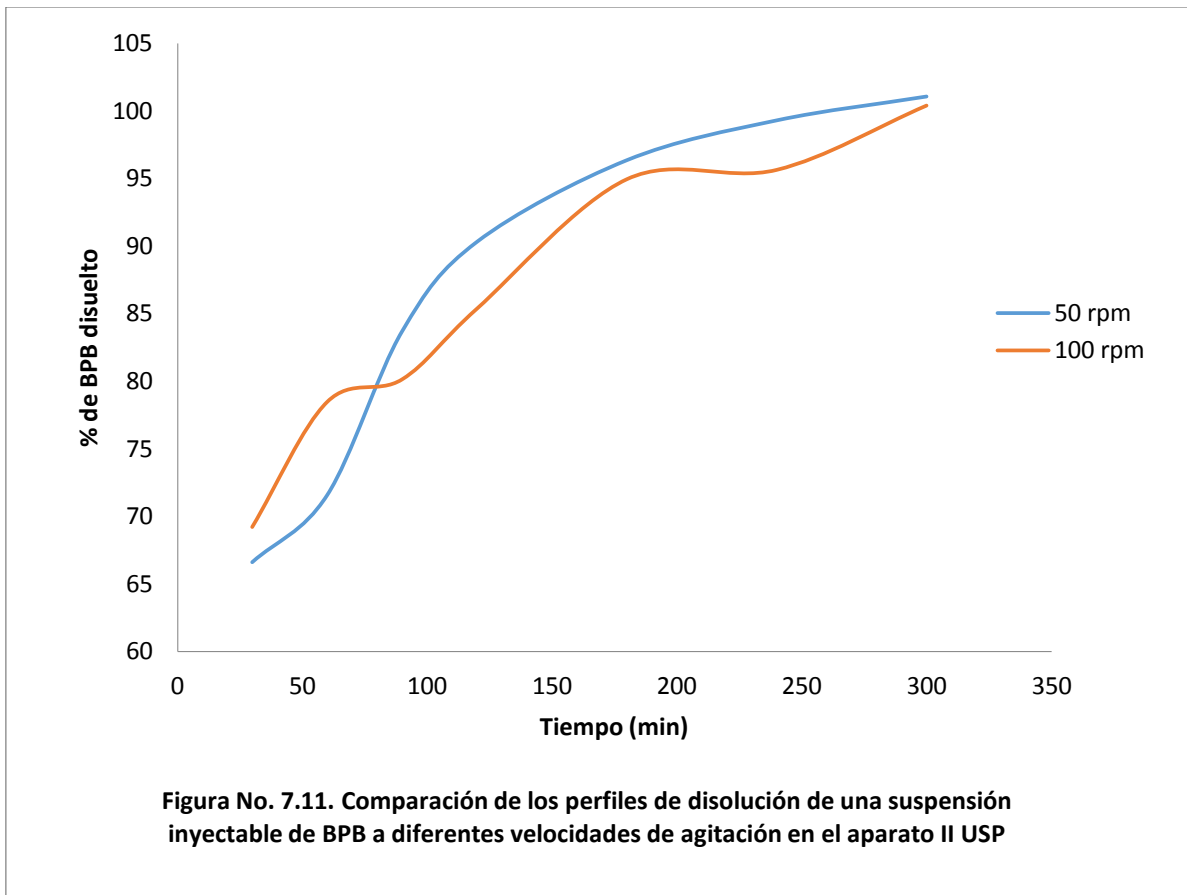
Tabla No. 7.35. % de BPB disuelto promedio de seis muestras de Prod ref a diferentes tiempos de muestreo en el aparato II USP

Tiempo (min)	50 rpm			100 rpm		
	% de BPB disuelto	S	CV	% de BPB disuelto	S	CV
30	66.5896	2.9499	4.4299	69.1836	3.0660	4.4317
60	71.5499	2.4656	3.4460	78.4493	2.0250	2.5813
90	83.6800	3.5464	4.2380	80.1222	3.4492	4.3050
120	90.3127	2.2343	2.4740	85.3620	2.9566	3.4635
180	96.3571	2.4533	2.5460	94.9527	3.3109	3.4869
240	99.3051	2.0544	2.0688	95.6460	2.4549	2.5667
300	101.0728	0.7107	0.7031	100.4119	1.1840	1.1791
		CV global	2.8437		CV global	3.1449

Dentro de las ventajas que ofrece el aparato II USP se pueden mencionar: un patrón de flujo más estable y por tanto una buena dispersión del sólido; también permite una buena inspección visual de la forma farmacéutica durante el tiempo de prueba (Rodríguez Cadena & Cortés Arroyo, 1996). Dichas ventajas hacen que el aparato II USP sea óptimo para llevar a cabo los perfiles de disolución de los productos, ya que se observa que las partículas tienen una buena dispersión permitiendo una mayor interacción con el disolvente lo cual mejora la humectación y por tanto la disolución. Una vez que se estableció la fracción de dosis que se someterá a prueba se evaluó la velocidad de agitación con la finalidad de obtener un comportamiento que caracterice el perfil de disolución de la mejor manera. Este parámetro guarda una relación con la velocidad de disolución que varía en forma considerable con el tipo de agitación, el grado de flujo (laminar y turbulento), entre otras. Para prevenir la turbulencia, que es esencial para obtener resultados confiables, ya sea la velocidad de agitación o la velocidad de flujo, según el tipo de aparato empleado, debe mantenerse con un nivel relativamente bajo (Gennaro A. , 1998). La FDA recomienda una velocidad de agitación de 50-75 rpm para el método de paletas.

En el Figura No. 7.11. se ilustran los perfiles de disolución del producto de referencia a diferentes velocidades de agitación, a 50 rpm se obtienen concentraciones por debajo del perfil a 100 rpm hasta los 60 minutos posteriormente las concentraciones son superiores, hasta los 300 minutos. Claramente se observa que la intensidad de agitación es determinante al inicio del perfil de disolución y además esto repercute el comportamiento en tiempos posteriores, ya que a 100 rpm la cantidad de fármaco disuelto fluctúa demasiado a lo largo del tiempo, mientras que a 50 rpm el

fármaco tiende a aumentar de forma gradual; esto se explica a partir de que a 100 rpm se puede presentar un flujo turbulento, donde las partículas se mueven de forma azarosa.

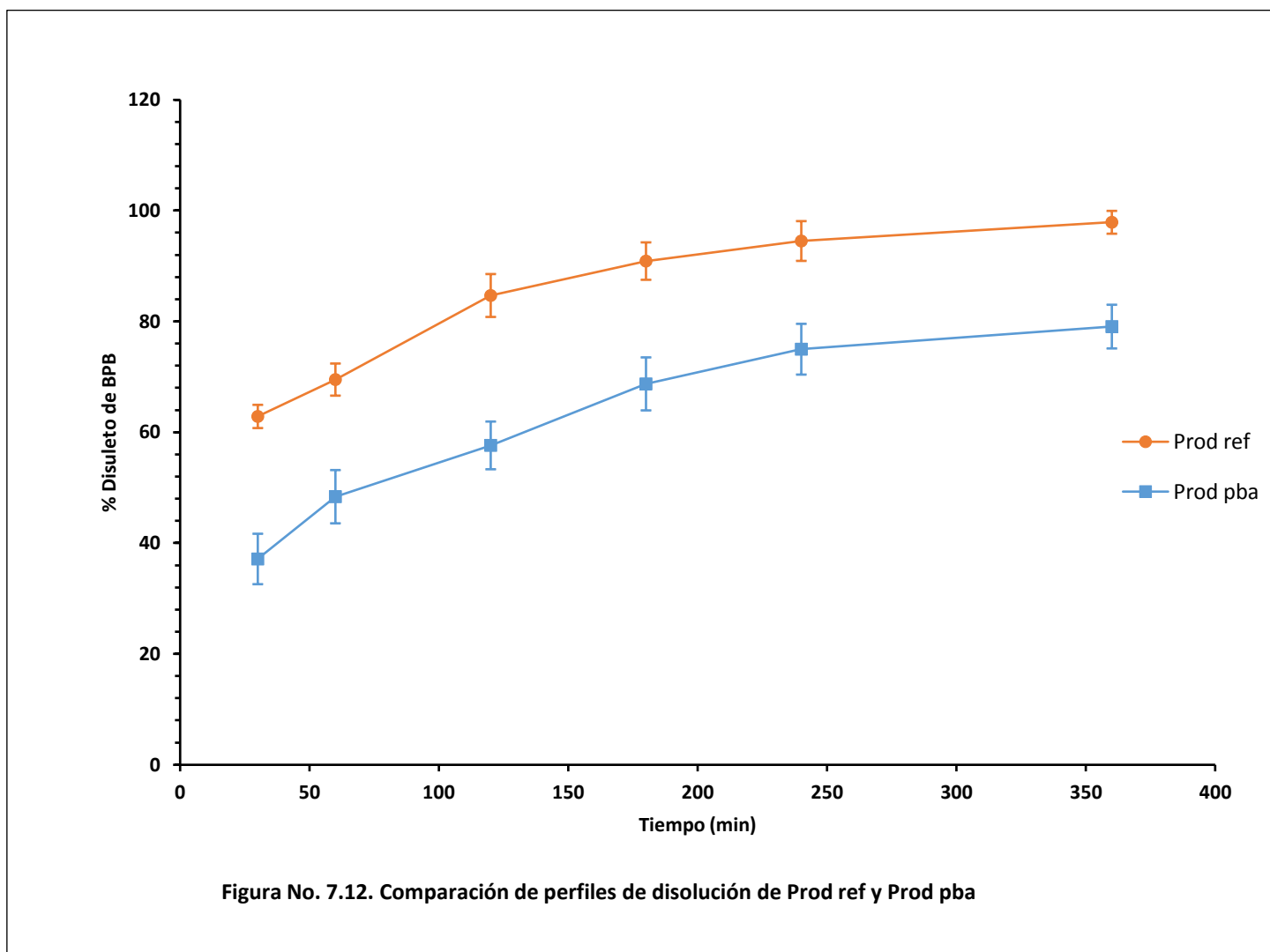


COMPARACIÓN DE PERFILES DISOLUCIÓN DEL PRODUCTO DE REFERENCIA Y PROD PBA EN EL APARATO II USP

Un perfil de disolución es una curva característica del proceso de disolución, esta se puede representar gráficamente como la cantidad, concentración o porcentaje de fármaco disuelto con respecto al tiempo, en este caso se realizó una prueba comparativa de perfiles de disolución entre dos productos (suspensión inyectable de BPB), en los cuales se utilizó el factor de similitud (f_2), el cual nos permite relacionar a través de una transformación logarítmica la semejanza entre los dos perfiles de disolución. En la Figura 7.12. se muestra que la disolución del producto de referencia es más rápida y completa en comparación del producto de prueba, en ambos productos se observa un CV mayor en el primer tiempo de muestreo con respecto a los restantes debido a que en este punto el sistema se equilibra a diferencia de los subsecuentes tiempos de muestreo.

Tabla No. 7.36. % disuelto de BPB individual de doce muestras de Prod ref en el aparato II USP																	
No. de Muestra																	
Tiempo (min)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Máx	Min	Promedio	s	CV
30	63.511	60.268	62.548	61.216	62.223	61.963	63.108	62.186	65.707	67.744	60.687	62.890	67.744	60.268	62.838	2.096	3.336
60	69.933	65.234	67.031	69.288	75.941	69.403	70.832	67.886	68.242	72.067	66.424	71.604	75.941	65.234	69.490	2.899	4.172
120	82.708	87.591	91.364	84.019	83.666	77.472	83.364	85.457	84.836	88.888	87.202	79.412	91.364	77.472	84.665	3.868	4.569
180	89.147	89.313	86.740	91.658	93.864	92.532	82.670	93.007	92.875	94.128	92.471	92.094	94.128	82.670	90.875	3.375	3.714
240	91.643	93.778	95.972	94.156	95.236	94.329	85.578	98.822	94.763	99.389	97.002	93.273	99.389	85.578	94.495	3.587	3.796
360	93.622	99.984	97.383	99.960	98.030	99.746	98.241	94.553	99.020	99.396	97.822	96.732	99.984	93.622	97.874	2.062	2.107

Tabla No. 7.37. % disuelto de BPB individual de doce muestras de Prod pba en el aparato II USP																	
No. de Muestra																	
Tiempo (min)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Máx	Min	Promedio	s	CV
30	37.704	37.601	29.056	37.382	41.711	43.450	38.094	43.667	30.063	35.435	35.481	35.783	43.667	29.056	37.119	4.550	12.258
60	42.896	42.793	44.835	42.888	43.264	52.053	48.694	55.607	54.368	49.895	52.051	50.945	55.607	42.793	48.358	4.807	9.941
120	56.782	59.213	60.167	54.132	55.837	57.466	53.128	62.814	56.148	66.573	50.647	58.464	66.573	50.647	57.614	4.305	7.473
180	65.197	64.349	68.104	65.963	64.531	75.873	64.020	70.269	66.399	71.525	69.371	78.972	78.972	64.020	68.715	4.781	6.958
240	67.268	74.473	76.858	78.513	74.064	79.394	73.465	81.141	71.007	74.761	68.121	80.593	81.141	67.268	74.971	4.580	6.108
360	78.954	79.142	77.993	81.299	78.284	87.494	75.852	83.207	77.855	76.136	71.784	80.643	87.494	71.784	79.054	3.941	4.985



Determinación del factor de similitud f_2

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \times \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

- log = logaritmo base 10
- n = número de tiempos de muestreo
- R_t = porcentaje disuelto promedio de la referencia a cada tiempo de muestreo t
- T_t = porcentaje disuelto promedio de prueba a cada tiempo de muestreo t

Tabla No. 7.38. Factor de similitud (f_2) de los perfiles de disolución de Prod ref y Prod pba

	Prod ref	Prod pba
Prod ref	100	32.2673

Los perfiles de disolución comparativos entre ambos productos no pueden considerarse similares ya que el factor de similitud global fue menor a 50 (32.2673), un valor entre 50 y 100 para f_2 considera perfiles de disolución similares. Como se puede observar en la Figura 7.13. se puede decir que entre los perfiles de disolución hay una diferencia de 20% aproximadamente.

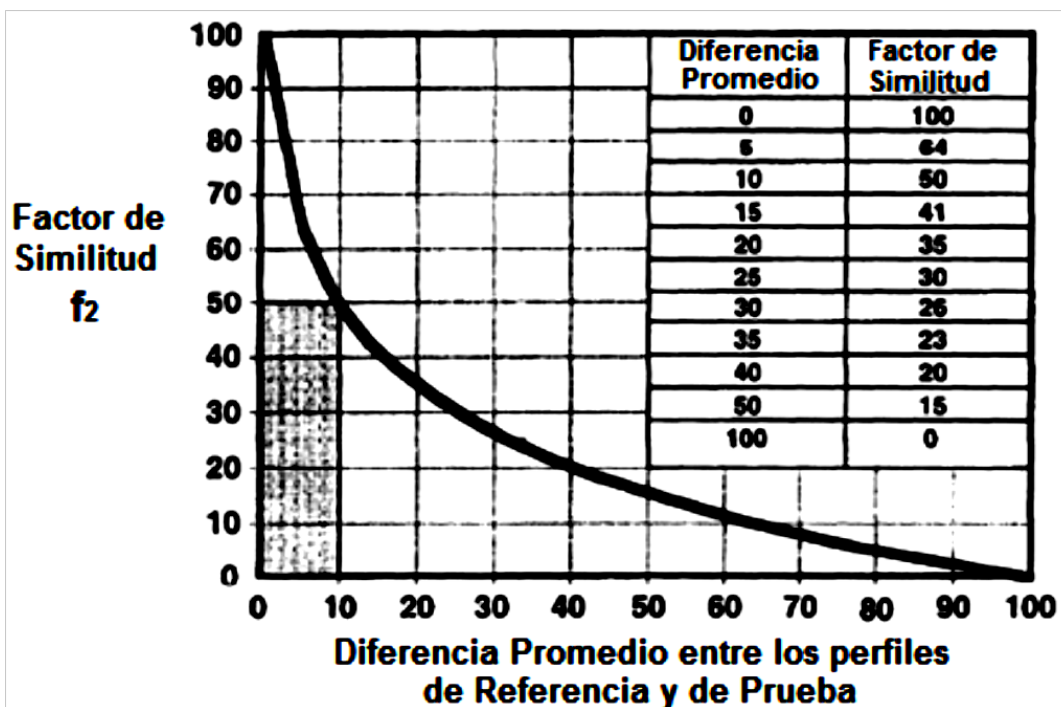


Figura 7.13. Relación de la diferencia promedio entre los perfiles de disolución de producto de prueba y de referencia y su factor de similitud

En la Figura No. 7.12. se puede observar claramente la marcada diferencia en cuanto a disolución de ambos productos pueden ser diversos los factores que están relacionados con esa diferencia en la velocidad de disolución, uno de ellos puede ser el tamaño de partícula.

CINÉTICA DE DISOLUCIÓN

La cinética de disolución es una herramienta que nos sirve para caracterizar el proceso de la disolución así como la velocidad de disolución de algún fármaco o medicamento, la velocidad de disolución no solo está condicionada por la solubilidad del fármaco sino también por la naturaleza física de la parte no soluble y de las uniones entre el soluto y algunos constituyentes insolubles en el disolvente.

La determinación de una cinética exige que el único parámetro variable sea la concentración, cantidad del producto liberado.

En el proceso de disolución de orden cero la tasa de cambio en la cantidad o concentración del medicamento es constante a lo largo del tiempo e independiente de su concentración y se puede expresar como:

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

Q= Cantidad de soluto

K= Constante de velocidad

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

$$(Q_{\infty} - Q) = -K(t - t_0) + Q_{\infty}$$

En el proceso de disolución de orden uno la velocidad es proporcional a la cantidad que permanece sin disolver; la liberación del soluto disminuye con el tiempo de manera exponencial lo que puede expresarse como:

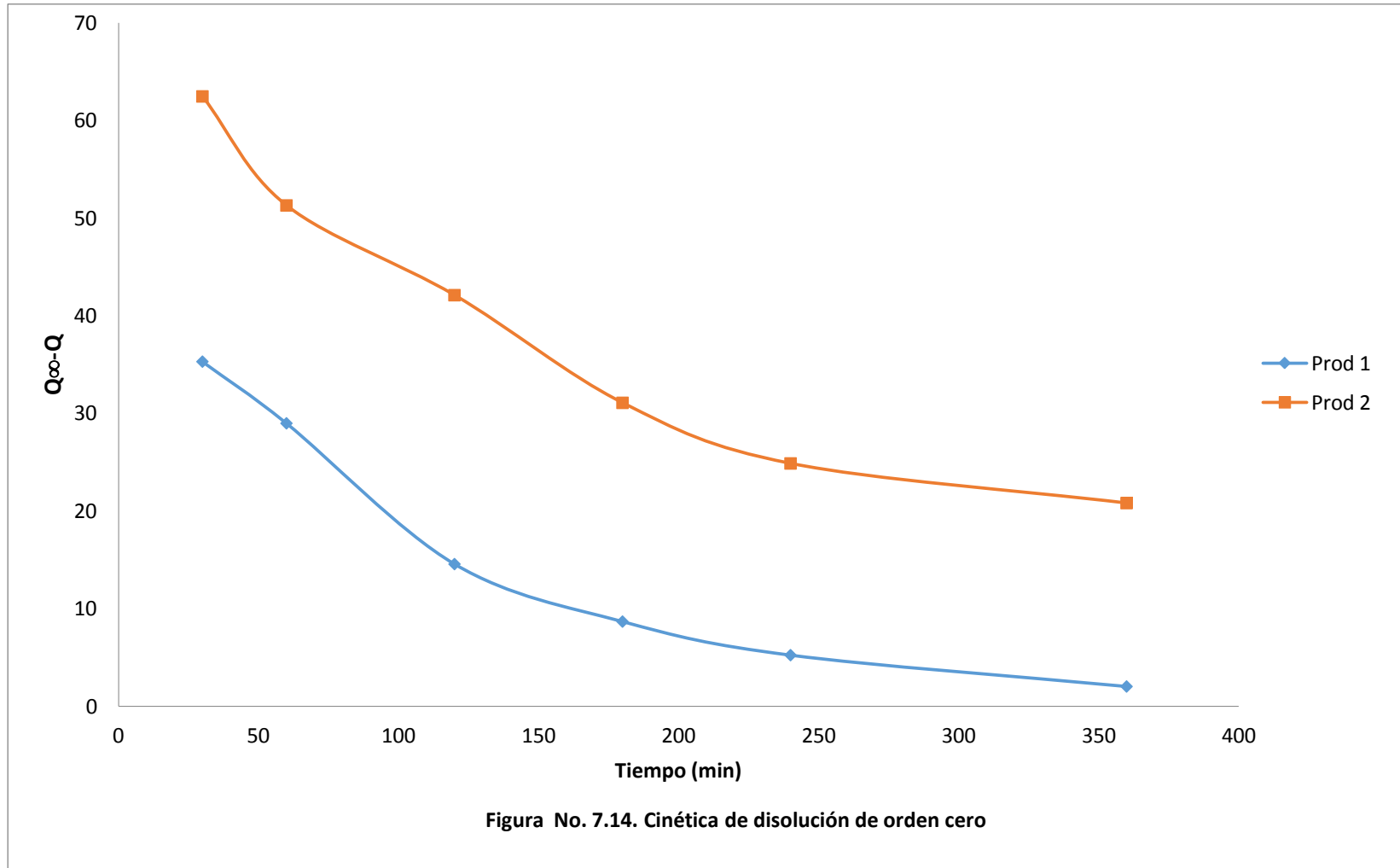
$$\ln(Q_{\infty} - Q) = \ln Q_{\infty} - K(t - t_0)$$

(Montejo Rubio, Aguilar Ros, Caamaño Somoza, & Martín Martín, 2008)

A continuación se muestran la cantidad (mg) disuelta a los diferentes tiempos de muestreo en los perfiles de disolución de ambos productos estudiados.

Tabla No. 7.39. Cantidad (mg) disuelta de BPB individual de doce muestras de Prod ref en el aparato II USP													
Tiempo (min)	No. de muestra												Promedio
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
30	60.67	57.54	59.76	58.32	59.01	58.81	59.82	59.07	62.13	63.70	57.69	59.48	59.67
60	66.81	62.28	64.04	66.01	72.01	65.87	67.14	64.48	64.53	67.77	63.14	67.73	65.98
120	79.01	83.62	87.29	80.04	79.34	73.53	79.02	81.18	80.22	83.59	82.89	75.11	80.40
180	85.16	85.27	82.87	87.32	89.01	87.82	78.36	88.35	87.82	88.52	87.90	87.11	86.29
240	87.54	89.53	91.69	89.70	90.31	89.52	81.12	93.87	89.60	93.46	92.21	88.22	89.73
360	89.43	95.46	93.04	95.23	92.96	94.66	93.12	89.82	93.63	93.47	92.99	91.49	92.94
Peso de la muestra equivalente a BPB (mg)	95.53	95.47	95.54	95.26	94.83	94.91	94.79	94.99	94.56	94.04	95.06	94.58	94.96

Tabla No. 7.40. Cantidad (mg) disuelta de BPB individual de doce muestras de Prod pba en el aparato II USP													
Tiempo (min)	No. de muestra												Promedio
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
30	37.43	37.49	28.82	37.04	41.59	43.13	37.87	43.14	29.93	35.28	35.36	35.36	36.87
60	42.58	42.67	44.48	42.49	43.14	51.67	48.40	54.93	54.12	49.67	51.88	50.34	48.03
120	56.37	59.05	59.69	53.63	55.67	57.04	52.81	62.05	55.89	66.28	50.48	57.77	57.23
180	64.72	64.17	67.56	65.35	64.34	75.31	63.64	69.42	66.10	71.21	69.14	78.04	68.25
240	66.78	74.26	76.25	77.79	73.85	78.81	73.02	80.16	70.69	74.43	67.89	79.64	74.46
360	78.38	78.92	77.37	80.55	78.05	86.85	75.40	82.20	77.50	75.80	71.54	79.69	78.52
Peso de la muestra equivalente a BPB (mg)	99.27	99.72	99.20	99.07	99.71	99.26	99.40	98.79	99.55	99.56	99.67	98.82	99.33



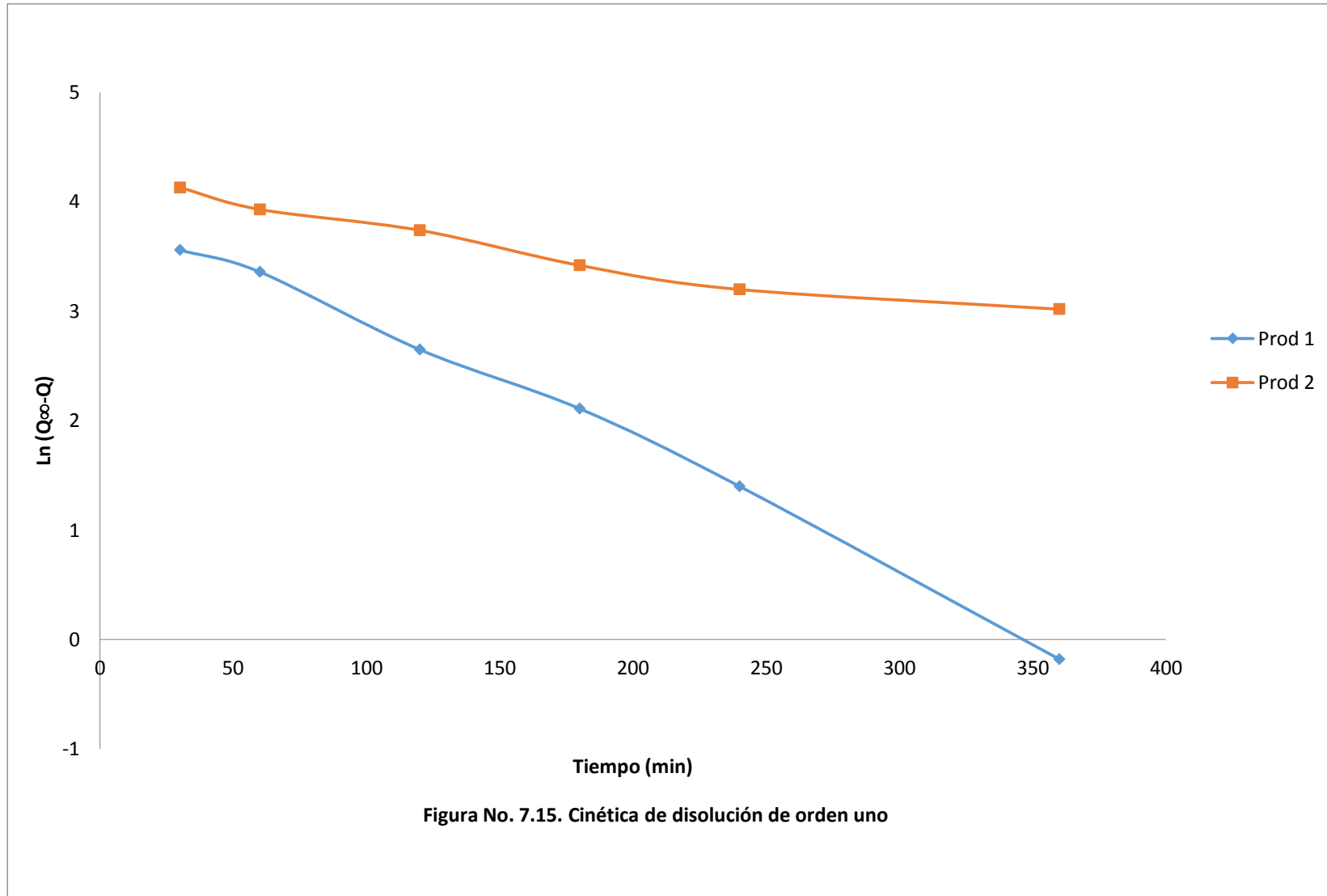


Figura No. 7.15. Cinética de disolución de orden uno

Tabla No. 7.41. Parámetros de regresión para la determinación de la cinética de disolución del Prod ref y el Prod pba		
Prod ref		
Parámetro	Cinética orden cero	Cinética orden uno
b	32.36238	4.01902
m	-0.10042	-0.01133
r	-0.91371	-0.99719
r²	0.83486	0.99439
Prod pba		
Parámetro	Cinética orden cero	Cinética orden uno
b	59.24597	4.14294
m	-0.12407	-0.00345
r	-0.94178	-0.97559
r²	0.88694	0.95178

Los parámetros de regresión sugieren que ambos productos se ajustan a una cinética de disolución de orden uno ya que su coeficiente de determinación (r^2) es mayor en ambos casos, y el ajuste a los modelos se ilustra en la Figura No. 7.14. y 7.15. Cabe mencionar que la cinética de disolución de orden uno la liberación del fármaco es proporcional a la cantidad del fármaco que permanece sin disolver, es decir, la velocidad de liberación disminuye con el tiempo, generalmente se ajustan a esta cinética medicamentos de acción retardada.

Tabla No. 7.42. Comparación de las constantes de velocidad de disolución del Prod ref y el Prod pba		
	K	Unidades
Prod ref	0.01133	min ⁻¹
Prod pba	0.00345	min ⁻¹

En la Tabla No. 7.48 se puede observar que la constante de velocidad de disolución es mayor en el producto de referencia.

ANÁLISIS DE PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS POLVOS

Para poder explicar las diferencias en la velocidad de disolución *in vitro* entre ambos productos, se llevó a cabo un análisis de las propiedades físicas de los polvos a través del análisis de la distribución y tamaño de partícula, difracción de rayos X, calorimetría diferencial de barrido y microscopía, ya que éstas nos brindan información de sus propiedades de superficie y termodinámicas; así mismo son herramientas clave para identificar polimorfos, los cuales son compuestos capaces de ser amorfos o bien una o más formas cristalinas, con disposiciones espaciales de las moléculas en la red cristalina. Dos polimorfos del mismo compuesto pueden ser tan diferentes en su estructura y propiedades como dos compuestos diferentes; los puntos de fusión, las densidades, solubilidades, forma de los cristales, propiedades eléctricas y los espectros de difracción de rayos X son características que pueden variar con la forma polimórfica . La naturaleza de la forma cristalina de un fármaco puede afectar a su estabilidad en estado sólido, sus propiedades de flujo y su disponibilidad biológica, la última principalmente a través del efecto de las propiedades del cristal en la velocidad de disolución (Florence & David , 2006). Es conocido que es preferible desarrollar productos con fármacos polimorfos termodinámicamente estables para asegurar la reproducibilidad en la biodisponibilidad del producto bajo condiciones de almacenamiento normales, aunque algunas veces son deseables productos con fármacos polimorfos metaestables o amorfos debido a su rápida velocidad de disolución, principalmente cuando se trata de fármacos con baja solubilidad (Shingal, 2004).

Tamaño de partícula

Se realizó la determinación de la distribución y tamaño de partícula de los dos productos estudiados (producto de referencia y producto de prueba) mediante la técnica de granulometría láser, el producto de referencia presentó un promedio del diámetro medio de 17.12 µm con un CV de 2.39% mientras que el producto de prueba presentó un promedio del diámetro medio de 21.30 µm con un CV de 0.87%, teniendo así el producto de referencia un menor tamaño de partícula que el producto de prueba, pero con una desviación estándar y un CV mayor indicándonos una mayor dispersión de los valores obtenido en cada determinación respecto al valor medio.

Tabla No. 7.43. Diámetro medio, al 10% , 50 % y 90 % del Prod ref y Prod pba				
Diámetro (µm)				
	Medio	10%	50%	90%
Prod ref				
\bar{x}	17.12	4.16	14.71	33.58
S	0.409	0.084	0.297	1.021
CV	2.39	2.03	2.02	3.04
Prod pba				
\bar{x}	21.30	4.85	17.67	42.29
S	0.1851	0.3637	0.6673	1.1635
CV	0.87	7.50	3.78	2.75

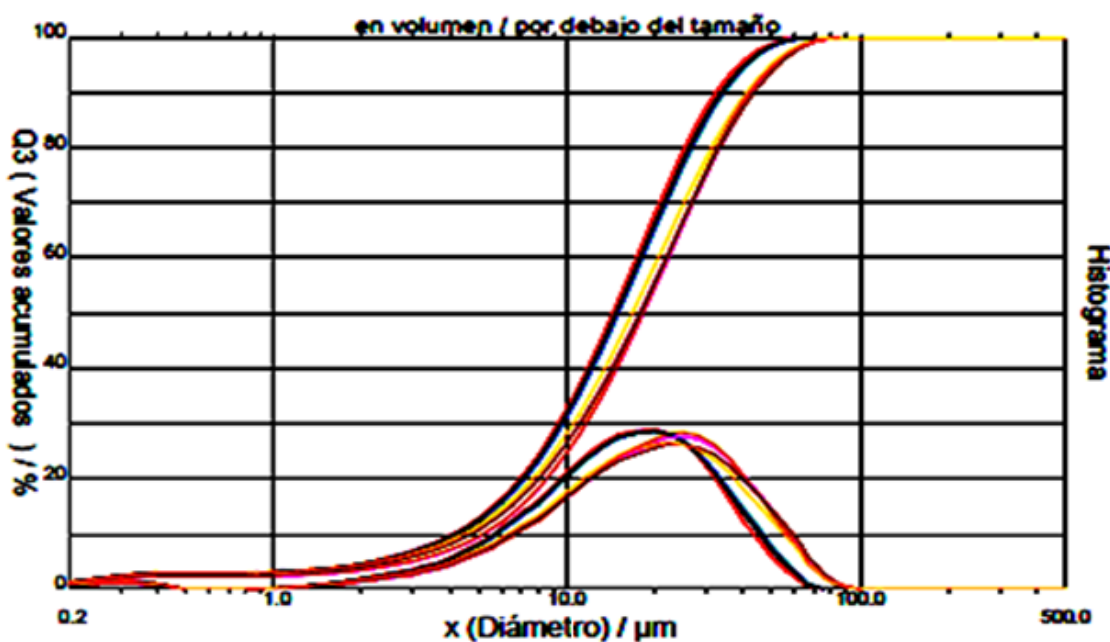


Figura No. 7.16 Curvas Unificadas de Prod ref y Prod pba

Se presentan las gráficas unificadas del producto de referencia en conjunto con del producto de prueba, se observa en el diagrama unificado de los dos productos (Fig. No. 7.19), que las curvas acumulativas y del histograma que se encuentran hacia la derecha corresponden al producto de prueba, ya que este presenta un mayor tamaño de partícula.

Como se sabe la ecuación de Noyes-Whitney nos muestra la relación directa entre el área superficial de una sustancia y la velocidad de disolución, en esta podemos observar que al aumentar el área superficial del fármaco aumenta la velocidad de disolución, y al ser el área superficial una función inversa del tamaño de partícula al disminuir el tamaño de partícula aumenta la velocidad de disolución del fármaco.

A través del estudio de la distribución y tamaño de partícula se logró determinar que los polvos tienen diferente tamaño de partícula: el producto de referencia tiene un tamaño de partícula promedio menor ($17.12 \mu\text{m}$) en comparación con el producto de prueba ($21.30 \mu\text{m}$), como consecuencia, de manera experimental se observaba que al realizar los perfiles de disolución el producto de prueba se sedimentaba conforme transcurría el tiempo mientras que en el producto de referencia la distribución del polvo en el medio de disolución era uniforme, lo que explica la notable diferencia en la disolución de ambos productos. Esto se puede apreciar en la Figura No. 7.17.

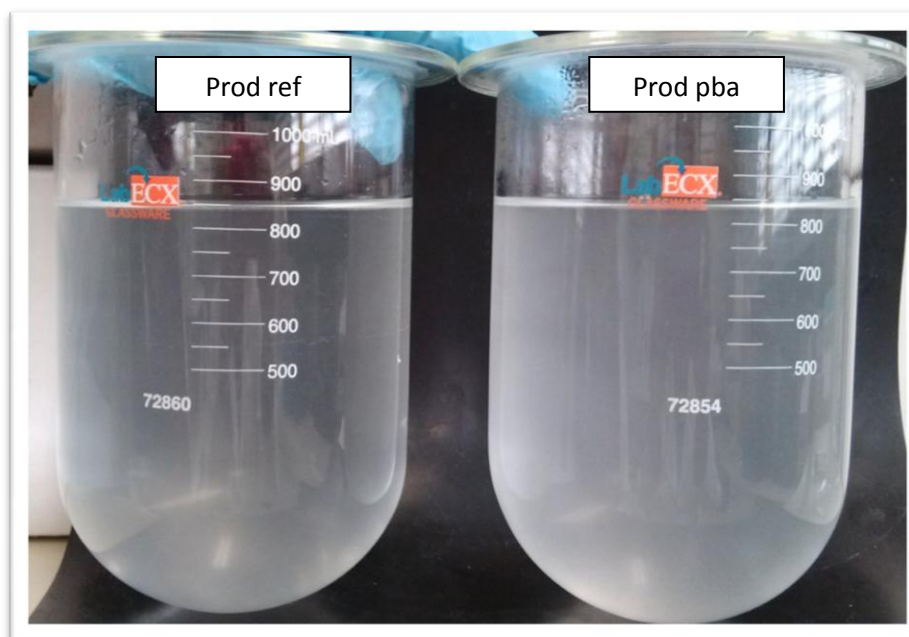


Figura No. 7.17. Comparación final en apariencia después de seis horas de disolución en ambos productos estudiados

Estas observaciones se pueden contrastar con los resultados experimentales obtenidos en cuando el porcentaje disuelto en ambos productos en los diferentes tiempos de muestreo.

Es el área superficial efectiva (porción de la superficie realmente en contacto con el disolvente) de la partícula de fármaco la que determina su velocidad de disolución, el área superficial efectiva se puede aumentar mediante la reducción física en el tamaño de partícula, mediante la adición de diluyentes hidrófilos a la forma de dosificación final, o mediante la adición de agentes tensoactivos al medio de disolución o de la forma de dosificación (S. Banker, Siepmann, & Rhodes, 2002), por lo tanto podemos decir que el producto de referencia tiene una mayor área superficial efectiva debido a su menor tamaño de partícula en comparación con el producto de prueba lo que se refleja en una mayor velocidad de disolución.

Cuanto menor sea el tamaño de partícula, mayor es el área de superficie efectiva exhibida por una masa dada de fármaco y mayor la velocidad de disolución (Aulton & Taylor, 2013)

Se recurre a la micronización de principios activos poco solubles, ya que esta aumenta el área de superficie expuesta al medio de disolución lo cual mejora la velocidad de disolución. Sin embargo una disminución de tamaño no asegura un aumento de la superficie de contacto en la magnitud esperada, pues a veces queda dificultada la humectación y solvatación de las partículas.

La disolución depende del área superficial del sólido a disolver y la solubilidad del fármaco teniendo en cuenta estos factores por separado, área de superficie es manipulado por el procesamiento y la solubilidad por la formulación del compuesto. La solubilidad es manipulada

principalmente por la estructura del fármaco. En general la solubilidad es inversamente proporcional al número y tipo de grupos lipofílicos dentro de la molécula, y la opresión del empaquetamiento del cristal en la molécula. (Mannhold, Kubinyi, & Folkers, 2012)

La capa límite hidrodinámica generada en la superficie de las partículas que se someten a un proceso de disolución depende del tamaño de partícula y la distribución del tamaño de partícula, sin embargo, el espesor de la capa límite hidrodinámico efectivo es contingente, de una manera interdependiente, en el diámetro de partícula.

Calorimetría diferencial de barrido

Los métodos de análisis térmico y, en particular, la calorimetría diferencial de barrido (DSC), han sido los principales métodos utilizados en los estudios de polimorfismo, ya que proporcionan datos útiles tanto para la identificación como para la caracterización de las especies polimórficas. (Prohens & Puigjaner, 2007). Esta técnica mide el flujo de calor, dq/dt , dentro y fuera de una celda de muestra con relación a una celda de referencia en una atmósfera controlada en un rango de temperatura definido dentro de un rango de entre -50 a $>300^{\circ}$ C. El cambio de capacidad calorífica a transición vítrea, y los cambios en la entalpía (cristalización exotérmica, fusión endotérmica y descomposición exotérmica). Cada estudio DSC debería incluir barridos en diferentes velocidades de calentamiento porque DSC es un método dinámico, y de transformaciones de estado sólido, mientras está siendo impulsado termodinámicamente, son controladas cinéticamente. Los barridos DSC serán diferentes si la muestra bajo estudio es estable o metaestable a temperatura ambiente (Stahl, 2011).

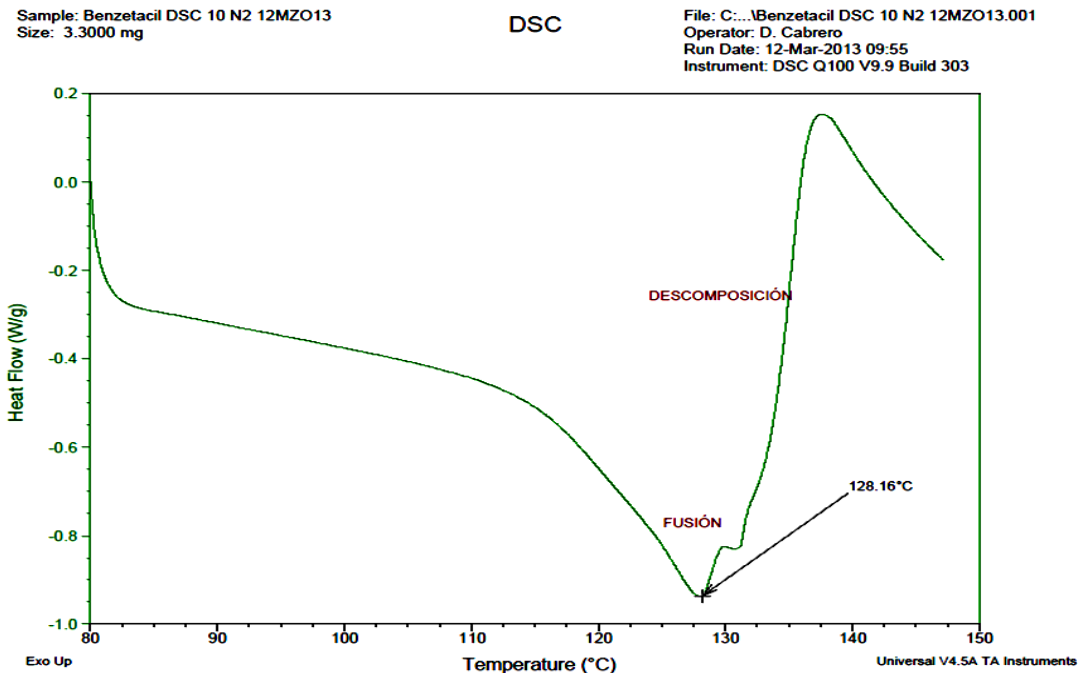


Figura No. 7.18. Termograma del Prod ref

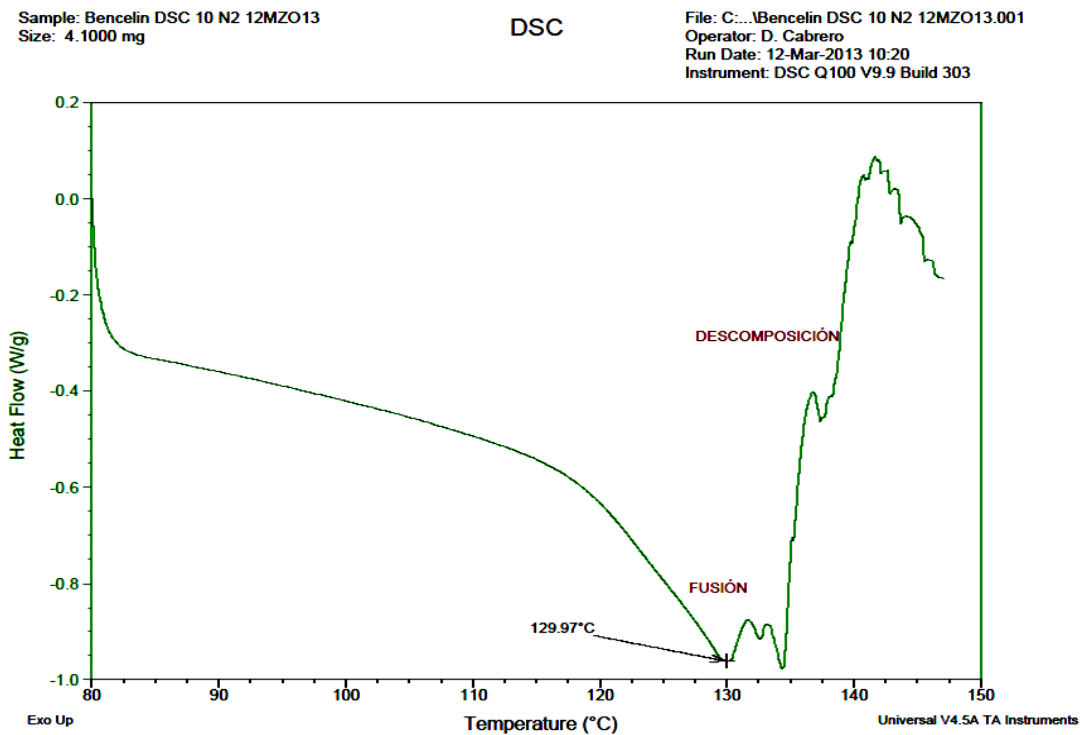


Figura No. 7.19. Termograma del Prod pba

Como se puede observar en la Figura No. 7.18. y 7.19. ambos polvos muestran claramente su punto de fusión seguido de una descomposición. El proceso endotérmico registrado de ambos productos difiere muy poco (129.97 °C para producto de prueba y 128.16 °C para el producto de referencia) infiriéndose de esta forma que ambos poseen sistemas cristalinos casi idénticos, evidentemente los termogramas no muestran un comportamiento clásico de polimorfismo, aunque la información que brinda el estudio de DSC no es suficiente para descartarlo y describir el tipo de sistema polimórfico al que pertenecen ambos polvos ya que se sabe que en los sistemas polimórficos puede haber diferentes tipos de formas cristalinas de una misma composición molecular, lo que varía es su habilidad para interconvertirse a diferentes temperaturas. La clasificación enantiotrópica/monotrópica se basa en la observación de que algunos sistemas pueden interconvertirse en forma reversible y otros no. En los sistemas enantiotrópicos es posible la interconversión reversible entre diferentes formas. Para los sistemas polimorfos monotrópicos la interconversión solo es posible en una dirección, desde la forma metaestable hacia la forma más estable (Gennaro A. R., 2003). De acuerdo a los resultados se puede tratar de sistemas enantiotrópicos donde una forma estable, que por razones cinéticas no se transforma a una forma metaestable y simplemente se fusiona o viceversa. O se puede tratar de un sistema monotrópico donde la forma estable únicamente se fusiona. Esta incertidumbre de cómo interpretar los resultados se puede resolver aplicando la regla de entalpía de fusión de Burger, la cual nos dice que si la forma que con el mayor punto de fusión tiene la entalpía de fusión más baja, ambas formas están relacionadas enantiotrópicamente. La solubilidad de los polimorfos está relacionada con su actividad termodinámica, a la tendencia de escape de sus moléculas, y por lo tanto a su punto de fusión. La forma termodinámicamente estable a una temperatura y presión dada es la forma con la más baja energía libre y por tanto solubilidad más baja. En el caso de enantiotropía hay un punto de transición en el cual la solubilidad de los dos polimorfos es idéntica. En el caso de monotropía, las curvas no se cruzan. Sin embargo, si se produce una transición mediada por un disolvente, daría lugar a la precipitación espontánea de la forma termodinámicamente estable. Independientemente el sistema polimórfico (Stahl, 2011), se observa que el producto de referencia tiene menor punto de fusión, por tanto se espera que tenga mayor solubilidad. Se reconoce que la formación y mantenimiento de formas polimórficas metaestables no es tarea fácil, aunque desde el punto de vista biofarmacéutico son deseables debido a su alta solubilidad y por tanto mayor biodisponibilidad.

De acuerdo a la literatura el producto de prueba puede que presente impurezas debido a que el endoterma presenta varias depresiones, ya que materiales puros generalmente producen picos de fusión muy estrechos, mientras que la introducción de impurezas solubles generalmente amplía el pico considerablemente mediante la reducción de la temperatura de inicio; este fenómeno se puede utilizar para cuantificar la cantidad de impureza presente en una muestra (Craig & Reading, 2007).

Difracción de rayos X

Con la finalidad de evaluar las diferencias en la estructura cristalina de los polvos de ambos productos se empleó la técnica de difracción de rayos X; esta importante técnica se utiliza para determinar el arreglo de los átomos en los compuestos sólidos y para medir las longitudes y los ángulos de enlace (Gennaro A. R., 2003). La información estructural que se obtiene mediante esta técnica se debe a que los cristales dispersan estos rayos dependiendo la ubicación de los átomos dentro del cristal. Para explicar esto se consideran las propiedades ondulatorias de los fotones. Se sabe que las ondas forman crestas y valles en determinados puntos en el espacio. Cuando dos ondas se encuentran en el mismo punto y la cresta de una se encuentra con el valle de la otra, las ondas se cancelan mutuamente. Sin embargo, si las ondas se encuentran cresta con cresta, se refuerzan mutuamente y la radiación producirá una señal detectable. Esta relación se cumple cuando los rayos X se dispersan en valores especiales del ángulo ϕ , el cual se relaciona con las distancias entre los átomos del sólido (Kotz, Treichel, & Weaver, 2005); en efecto, la difracción de rayos X de polvo toma una huella digital de la muestra.

De forma general se observa en la Figura No. 7.20. que al aumentar el ángulo de difracción disminuye la distancia de las capas de los átomos de la muestra para rayos X debido a que la diferencia de fase en la onda generada por dos electrones origina una interferencia parcialmente destructiva; el efecto neto de interferencia entre los rayos dispersados por todos los electrones en el átomo origina un descenso gradual en la intensidad dispersada al aumentar el ángulo 2θ . Objetivamente se observa que los patrones de difracción de ambos polvos son similares y a través de esto se puede decir que los cristales de ambos productos tienen los mismos sistemas cristalinos y así mismo esto representa evidencia de ausencia de polimorfismo, aunque de formas específicas el producto de prueba y/o sus excipientes son más cristalinos ya que presentan mayores cps (cuentas por segundo) con lo cual se infiere que los cristales producen mayor número de interferencias constructivas en los diferentes ángulos que se generan entre el haz incidente y los planos del cristal, eso a su vez se demuestra que hay un mayor número de rayos dispersados que se refuerzan mutuamente (Tabla No. 6.50.), esto puede representar de forma adicional una desventaja en cuanto la velocidad de disolución de BPB.

Esta técnica también se puede utilizar además para identificar el tamaño y la forma de la celda unitaria midiendo el espacio entre las líneas del patrón de difracción (Atkins & Jones, 2006). El estudio que se realizó a los polvos en estudio se limita a observar patrones de difracción aunque no se puede determinar el tipo de celda unitaria y sus dimensiones; y en su defecto a la posición de cada átomo en la molécula; para analizar los resultados del experimento de difracción de polvo es preciso conocer la ecuación central a la ecuación de Bragg:

$$2d \sin \theta = \lambda$$

La cual relaciona los ángulos θ (theta), con los cuales ocurre la interferencia constructiva con la distancia d , de las capas de los átomos de la muestra para rayos X de la longitud de onda λ (lambda). Los datos en crudo consisten en las intensidades de los rayos X en todas las combinaciones de ángulos del difractómetro. La tarea del ordenador es analizar estas medidas y

convertirlas en las ubicaciones de los átomos. El proceso de conversión se llama síntesis de Fourier y requiere largos cálculos que se llevan a cabo en un ordenador que es parte integral del difractor. El producto final es una descripción detallada de la ubicación de todos los átomos de la molécula, la longitud de los enlaces y los ángulos de estos (Atkins & Jones, 2006).

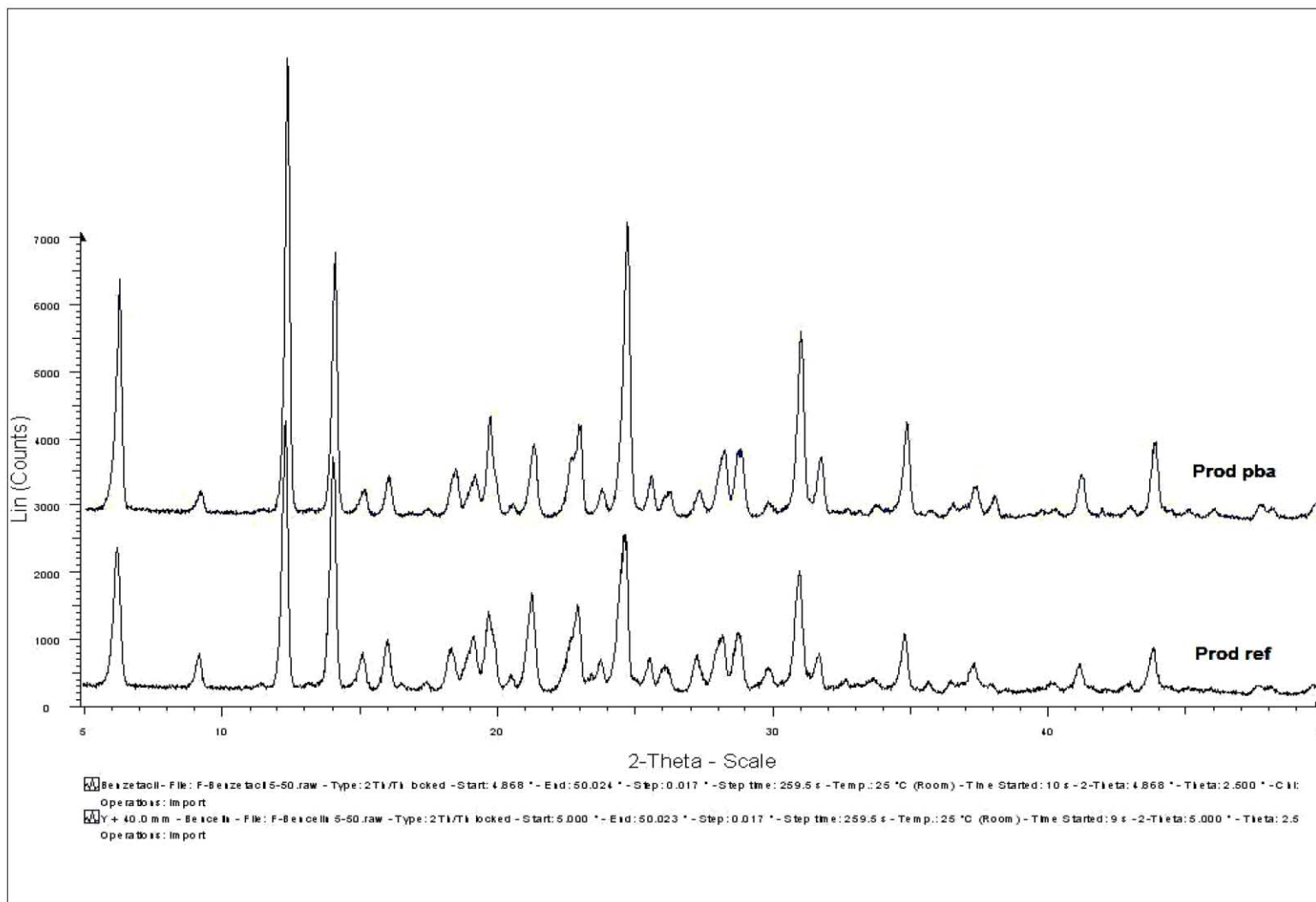


Figura 7.20. Difractogramas del Prod pba y Prod ref

Tabla No. 7.44. Resultados de la difracción de rayos X del Prod ref y Prod pba

d value Intensity (Angstrom)		Angle 2-Theta (°)		Count (cps)		Intensity (%)	
Prod ref	Prod pba	Prod ref	Prod pba	Prod ref	Prod pba	Prod ref	Prod pba
14.41500	14.20752	6.126	6.216	2354	3752	55.2	53.1
9.70615	9.62670	9.104	9.179	753	576	17.6	8.2
7.76916	7.17279	11.38	12.33	316	7062	7.4	100
7.21801	6.29386	12.252	14.06	4268	4147	100	58.7
6.74735	5.85310	13.111	15.125	325	588	7.6	8.3
6.32277	5.52507	13.995	16.028	3718	797	87.1	11.3
5.87633	5.07443	15.065	17.463	780	310	18.3	4.4
5.54327	4.80431	15.975	18.453	979	891	22.9	12.6
5.37574	4.62497	16.477	19.175	330	808	7.7	11.4
5.08994	4.50039	17.409	19.711	352	1697	8.2	24
4.84866	4.32466	18.282	20.52	846	370	19.8	5.2
4.64124	4.16672	19.107	21.307	1004	1280	23.5	18.1
4.51110	3.90985	19.664	22.725	1386	1096	32.5	15.5
4.33382	3.86991	20.476	22.963	456	1573	10.7	22.3
4.18218	3.73651	21.227	23.794	1673	595	39.2	8.4
3.92491	3.60013	22.637	24.71	1014	4602	23.8	65.2
3.88082	3.47906	22.897	25.584	1493	798	35	11.3
3.74529	3.39440	23.738	26.233	682	549	16	7.8
3.61359	3.26117	24.616	27.325	2549	579	59.7	8.2
3.48766	3.15707	25.52	28.245	698	1195	16.4	16.9
3.41643	3.09762	26.061	28.798	593	1185	13.9	16.8
3.27157	2.99087	27.237	29.85	740	414	17.3	5.9
3.16560	2.88006	28.167	31.026	1052	2962	24.6	41.9
3.10193	2.81558	28.757	31.755	1057	1088	24.8	15.4
2.99284	2.73446	29.829	32.723	558	304	13.1	4.3
2.88573	2.69919	30.964	33.163	2009	271	47.1	3.8
2.82252	2.64956	31.675	33.803	760	357	17.8	5.1
2.73873	2.56991	32.671	34.884	386	1615	9	22.9
2.65998	2.51009	33.667	35.743	406	271	9.5	3.8
2.57592	2.45584	34.8	36.56	1066	399	25	5.6
2.51398	2.40324	35.686	37.389	343	613	8	8.7
2.45996	2.36103	36.496	38.083	369	496	8.6	7
2.40741	2.26303	37.322	39.801	612	271	14.3	3.8
2.36873	2.23691	37.955	40.285	315	307	7.4	4.3
2.26789	2.18668	39.712	41.252	272	813	6.4	11.5
2.24346	2.15061	40.163	41.977	322	303	7.5	4.3
2.19071	2.10112	41.173	43.014	616	342	14.4	4.8
2.10370	2.05985	42.959	43.92	288	1296	6.7	18.4
2.06342	2.03396	43.84	44.509	862	287	20.2	4.1
2.04078	2.00716	44.352	45.136	284	284	6.7	4
2.00736	1.96840	45.131	46.075	257	304	6	4.3
1.90543	1.90236	47.69	47.772	307	362	7.2	5.1
1.88884	1.88700	48.135	48.185	295	304	6.9	4.3
1.83334	1.83081	49.69	49.763	331	372	7.8	5.3

Microscopía

Esta técnica suministra información sobre las formas de las partículas, así mismo se puede determinar si son de aspecto cristalino o amorfo y sus variantes, conocidos como polimorfos que surgen a través de empaquetamiento de las moléculas en matrices diferentes dentro del cristal o por diferencias en la orientación o conformación de las moléculas en sitios de la red. El componente básico del cristal es la celda o estructura unitaria, la repetición de la cual en tres dimensiones produce el cristal. Cada celda unitaria es del mismo tamaño para un cristal específico y contiene el mismo número de moléculas o iones dispuestos de manera similar. A pesar de que el tamaño y la forma del cristal de un compuesto dado pueden variar, los ángulos entre las caras de los cristales se mantienen constantes. Los cristales de una sustancia dada pueden variar en tamaño, el desarrollo relativo de las caras dado y el número y tipo de formas presentes, es decir, pueden tener diferentes hábitos de cristal. Tales hábitos incluyen agujas, tabular, ecuante, columnar y tipos laminares. La Figura No. 7.21. muestra los siete sistemas cristalinos, y los hábitos de cristal (Florence & David , 2006).

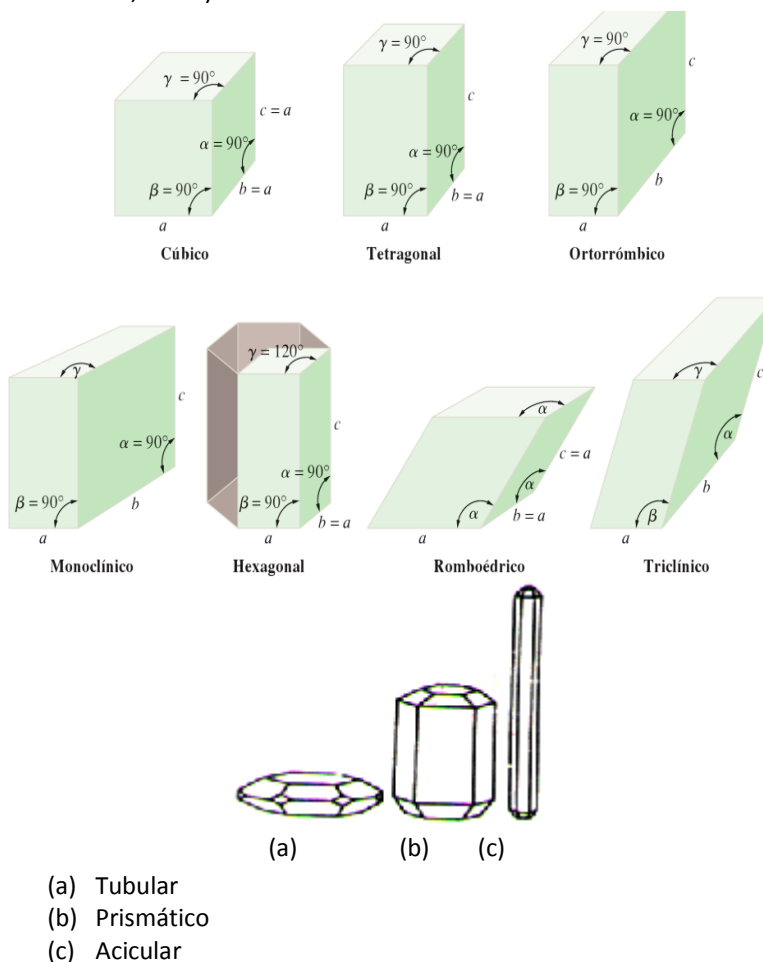


Figura No. 7.21. Representación de los siete sistemas cristalinos y los tres hábitos cristalinos

La forma cristalina esta descrito por dos términos: hábito y la combinación de formas cristalográficas. El hábito puede llevar todo tipo de cristales en términos bastante generales: acicular, prismática, piramidal, etc.; la combinación de las formas cristalográficas se refiere a las caras del cristal. Dos cristales con el mismo hábito pueden tener una combinación diferente de caras; la más obvia es la forma ortorrómbica se muestra en la Figura No. 7.22., donde la misma combinación de formas conduce a formas prismáticas, isométrica y tabular (Florence & David , 2006).

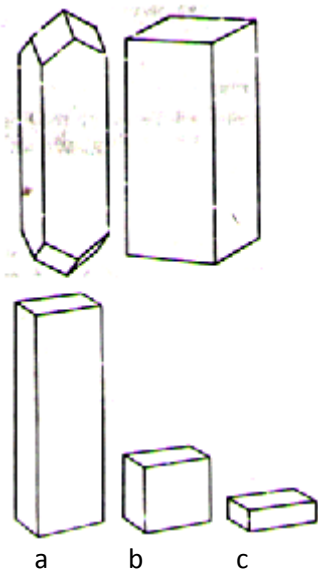
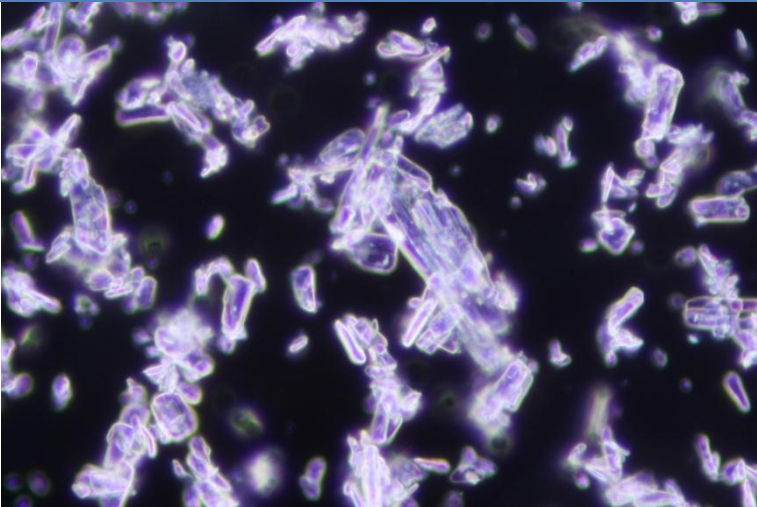
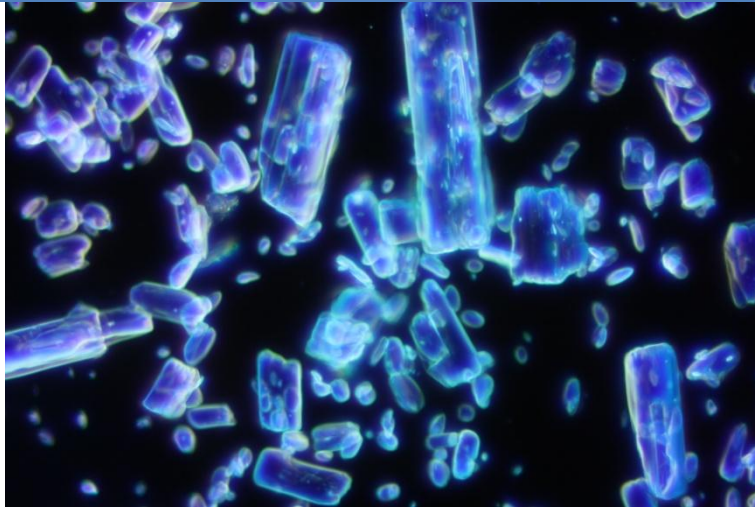
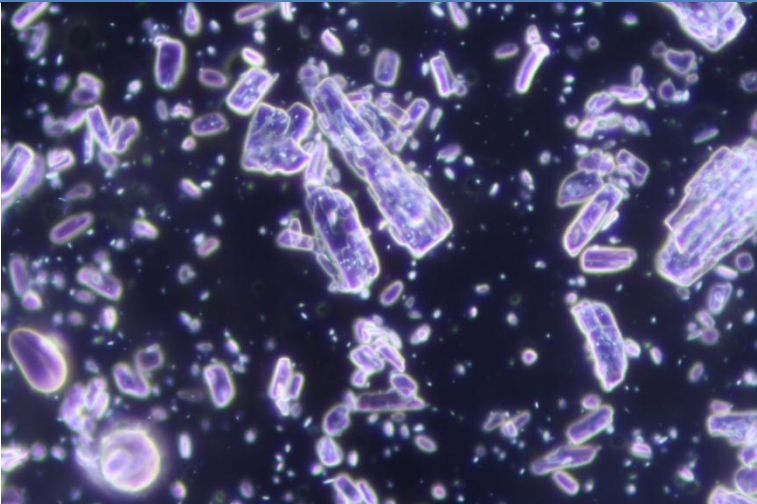
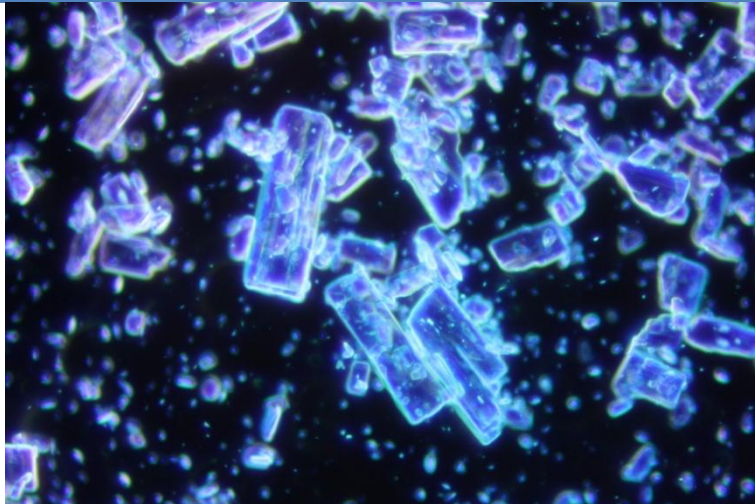
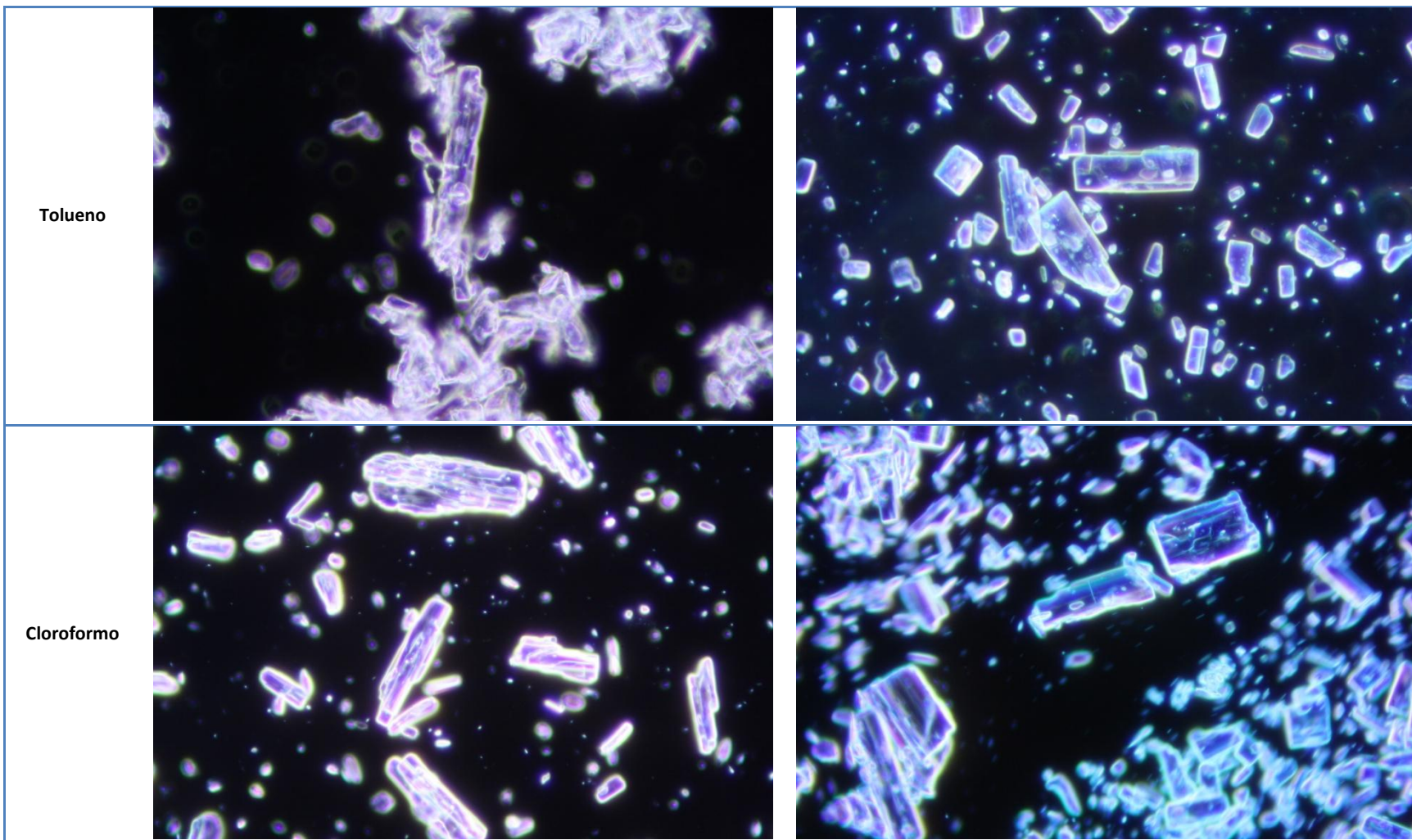


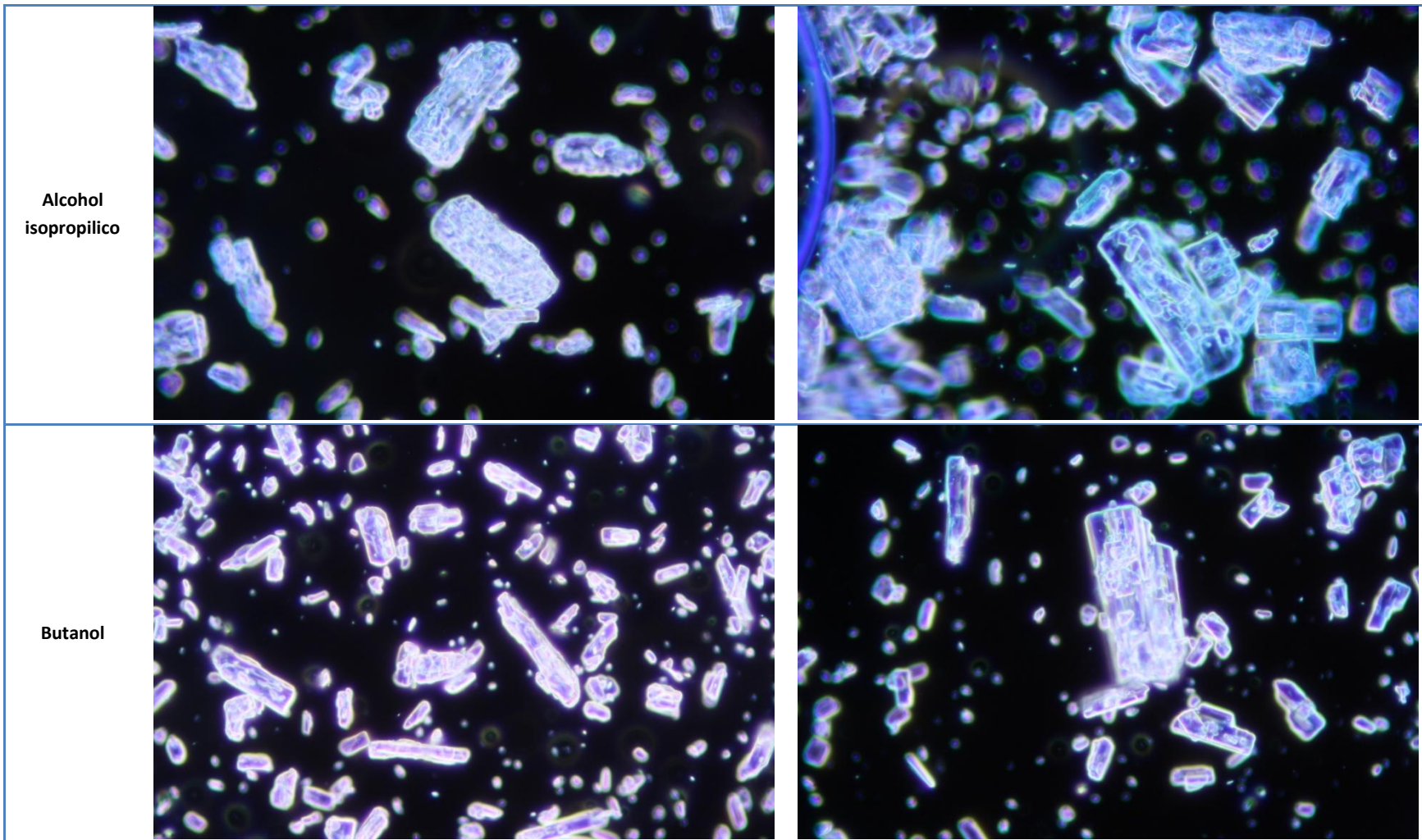
Figura 7.22. Posibles sistemas cristalinos (Arriba se muestran dos cristales ortorrómbicos con el mismo hábito pero diferente combinación de formas. Y abajo se ilustra tres cristales ortorrómbicos con la misma combinación de formas pero diferentes hábitos: prismático (a), isométrico (b) y tabular (c)).

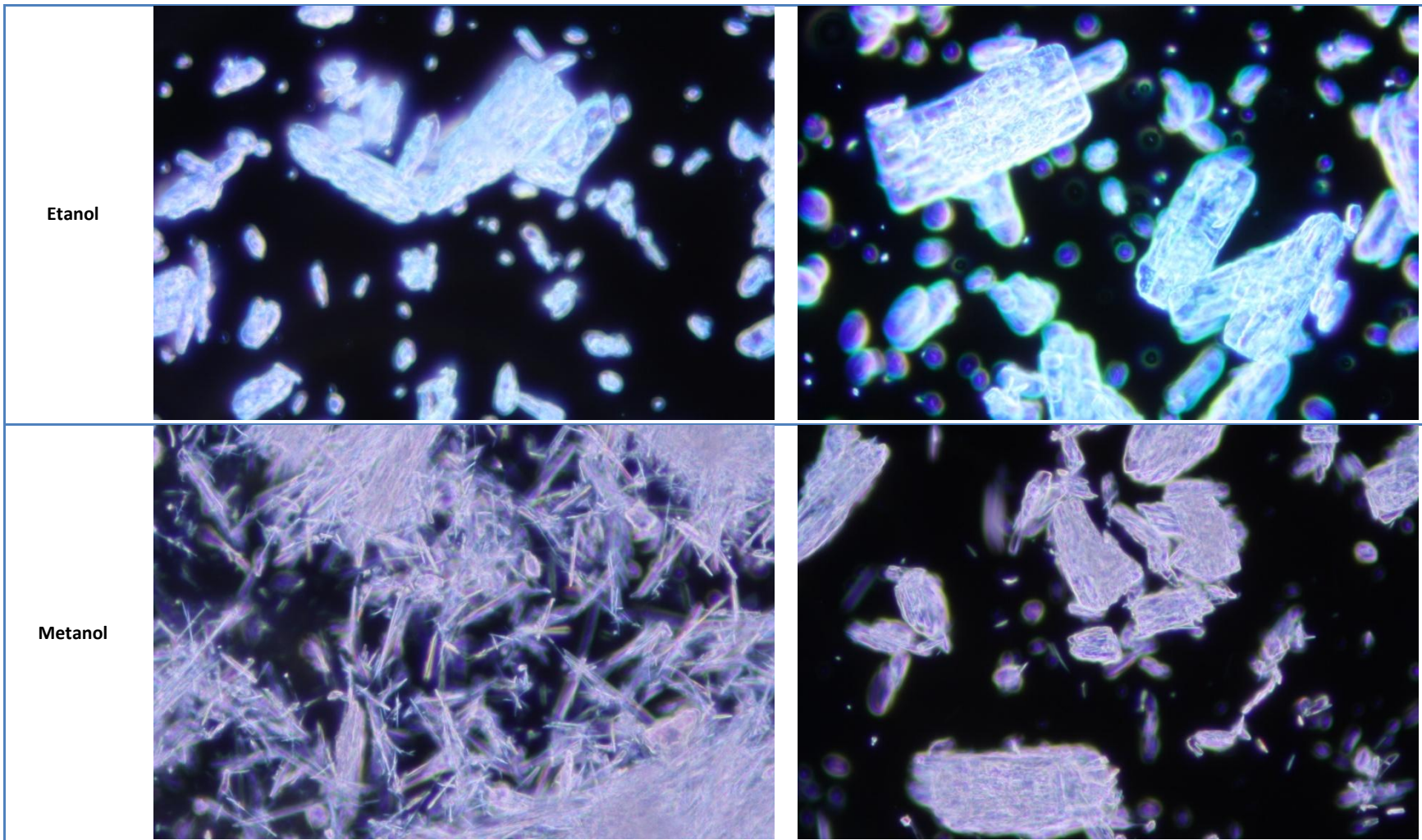
A partir de las microfotografías que se muestran en la Tabla No. 7.51. se puede apreciar que los cristales del producto de referencia y producto de prueba poseen diferentes formas y tamaños, aunque claramente el producto de prueba tiene sistemas cristalinos más definidos y de mayor tamaño. Para ambos casos los sistemas cristalinos se asemejan a los sistemas tetragonal, ortorrómbico o monoclinico con hábitos cristalinos prismáticos o aciculares. No hay suficiente diferencia entre la morfología cristalina de los polvos de ambos productos por tanto se puede descartar la presencia de polimorfismo.

Tabla No. 7.45. Microfotografías del Prod ref y Prod pba en diferentes disolventes

	Prod ref	Prod pba
Piridina		
Xileno		







VIII. CONCLUSIONES

De forma integral se logró comparar el proceso de la disolución de suspensiones inyectables de BPB comerciales a través de perfiles de disolución realizados en el aparato II USP, encontrándose en primera instancia que la velocidad de disolución aparente del producto de referencia es tres veces mayor que la del producto de prueba (0.01133 min^{-1} y 0.00345 min^{-1} , respectivamente) y en consecuencia el porcentaje disuelto de BPB del producto de referencia al término del perfil es mayor (97.874 %) con respecto al producto de prueba (79.054 %); demostrándose a través de un modelo matemático independiente conocido como factor de similitud (f_2) que ambos perfiles no son similares, hallándose una diferencia de 20% pese a que el producto de prueba posee mayor contenido químico (98.6406 %) con respecto al producto de referencia (94.3205 %). Cabe mencionar que ambos productos exhiben una cinética de disolución de primer orden, en la cual la velocidad de disolución es proporcional a la cantidad que permanece sin disolver; la liberación del soluto disminuye con el tiempo de manera exponencial. Dicho comportamiento es típico de medicamentos de acción retardada. Esta evidente diferencia analítica y también visual son a su vez resultado de las diferencias en las propiedades físicas de ambos polvos, principalmente en el tamaño de partícula, ya que el producto de referencia presentó un promedio del diámetro medio menor ($17.12 \mu\text{m}$) en comparación con el producto de prueba ($21.30 \mu\text{m}$), lo cual explica de forma razonable lo anterior conforme a lo establecido por la ecuación de Noyes-Whitney, que menciona que las partículas pequeñas de sólido se disuelven más rápidamente que las grandes, ya que las primeras presentan mayor área disponible para interactuar con el disolvente. Además se encontraron diferencias en el punto de fusión, cristalinidad, hábito y sistemas cristalinos, las cuales repercuten de alguna forma en la solubilidad del fármaco, el cual es el factor más importante en la velocidad de disolución según la ecuación de Noyes y Whithney, que asegura que la velocidad de disolución es directamente proporcional a la solubilidad; de forma general se encontró que el producto de referencia es más soluble ya que es más puro y menos cristalino. Así mismo dichas diferencias no son prueba suficiente para asegurar la presencia de polimorfismo.

Para poder llevar a cabo la ejecución de perfiles de disolución que permitieran discriminar cualquier diferencia en la formulación de las suspensiones de BPB comerciales de forma previa y satisfactoria se desarrolló, válido y revalidó, empleando la técnica espectrofotométrica UV-Visible, dos métodos analíticos, uno para valorar el contenido químico y el otro para determinar la cantidad disuelta de BPB en ambos productos; dichos métodos cumplen con las especificaciones de los parámetros de desempeño que señala la Guía de Validación de Métodos Analíticos editado por Colegio de QFB A.C. de México, la NOM-177-SSA1-1998 y las guías ICH (Q2 y Q4), para el caso del segundo método se utilizó el método de adiciones patrón para evaluar la linealidad, exactitud y repetibilidad con la finalidad de cuantificar de forma más semejante la cantidad del fármaco disuelto que se esperaría en una muestra real.

CONCLUSIONES

Para el desarrollo de ambos métodos analíticos se realizó una búsqueda bibliográfica de los métodos instrumentales reportados, así como las propiedades fisicoquímicas de la BPB que nos permitieran una eficiente preparación, separación y detección del mismo (pKa, solubilidad y estabilidad del fármaco en solución). Cabe mencionar que algunas de estas propiedades se evaluaron experimentalmente en condiciones de interés, como es el caso de la solubilidad y estabilidad, ensayadas en solución amortiguadora de fosfatos a varias temperaturas. A partir del método de valoración se logró determinar que el contenido químico de ambos productos difiere en un 4.3201%, lo cual nos permitió realizar una sucesiva comparación de su proceso de disolución aplicando el método para determinar cantidad disuelta a través de la evaluación de perfiles de disolución cuyas condiciones óptimas del proceso de disolución son los siguientes: aparato de disolución, aparato II USP; medio de disolución, solución amortiguadora de fosfatos pH= 6.8; volumen de medio de disolución, 900 mL; velocidad de agitación, 50 rpm; filtro, papel Whatman No. 542; tiempo y método de muestreo, manual de 30 a 360 minutos y sometiendo a análisis 10% de una unidad de dosis (100 mg).

De antemano sabemos que la BPB en suspensión inyectable en estudio requiere prueba de bioequivalencia para evaluar su biodisponibilidad, pero en este caso decidimos crear y aplicar un ensayo in vitro de liberación y posterior disolución como una herramienta de regulación para evaluar la calidad del producto innovador (producto de referencia) con respecto a uno genérico intercambiable (producto de prueba), tomando en cuenta que ambos fenómenos son pasos cruciales para la actividad terapéutica del medicamento y que cualquier diferencia entre dichas formulaciones a través de éste estudio será evidente.

IX. REFERENCIAS

- A. Hanson, W. (1991). *Handbook of dissolution Testing*. USA: Aster Publishing Corporation.
- Aiache, J. M., & Devissaguet, J. P. (1983). *Biofarmacia*. México: Manual moderno.
- Asociación Española de Farmacéuticos de la industria (AEFI). (2001). *Validación de Métodos Analíticos*. Comisión de normas de buena fabricación y control de calidad.
- Atkins, P., & Jones, L. (2006). *Principios de Química: los caminos del descubrimiento* (3 ed.). New York: Médica Panamericana.
- Aulton, M. E., & Taylor, K. M. (2013). *Aulton's Pharmaceutics, The desing and Manufacturing of medicines* (Fourth edition ed.). China: Elsevier.
- Barrera, A. G. (2005). *Desarrollo y validación de un método analítico para perfiles de disolución de Lisinopril e Hidroclorotiazida*. Estado de México, México: FESC.
- Chen, Y. (2008). *Journal of chromatografy*.
- Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. (CNQFB). (2002). *Guía de Validación de Métodos Analíticos*.
- Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (CPFEUM). (2009). *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* (9º ed.).
- Compañó, R., & Rios, A. (2002). *Garantía de Calidad en los Laboratorios Analíticos*. España: Síntesis.
- Craig, D., & Reading, M. (2007). *Thermal Analysis of Pharmceuticals*. Florida, USA: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Cruz Mendiola, M. C. (2010). *Desarrollo y Validación de un método analítico para cuantificar por espectrofotometría UV, un fármaco para el tratamiento de enfermedades respiratorias*. México, D.F.: Facultad de Química, UNAM.
- Díaz Rodríguez, A. (2011). *Desarrollo y validación de métodos analíticos para la determinación de contenido químico y cantidad disuelta en perfiles de disolución de una suspension oral de nimesulida, por espectrofotometría ultravioleta*. Estado de México, México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- Florence, A., & David , A. (2006). *Physicochemical Principles of Pharmacy*. London, England: Pharmaceutical Press.

- Gennaro, A. (1998). *Remintong Farmacia* (19 ed., Vol. 2). Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana.
- Gennaro, A. R. (2003). *Remington Farmacia* (Tercera edición ed., Vol. I). Argentina, Buenos aires : Panamericana.
- Guerrero Barrera, A. (2005). *Desarrollo y Validación de un método analítico para perfiles de disolución de lisinoprol e hidroclorotiazona en tabletas*. Estado de México, México: UNAM: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
- Guideline, I. H. (s.f.). *Validation of Analytical Procedures: Definitions and Methodology*.
- Harris, D. (2007). *Análisis Químico*. México: Reverte.
- Harvey, D. (2002). *Química Analítica Moderna*. España: McGrawHill.
- Hernández, B. C. (1997). Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Revista Cubana Farmacéutica*.
- Hernández, D., & Solís, B. (2011). *Desarrollo y validación de un método analítico por adiciones patrón para evaluar y comparar perfiles de disolución de cinco marcas diferentes de tabletas de metoprolol en equipos II y IV USP*. México: Facultad de estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- Idabe, S., & Aramendia, P. (2006). *Química II*. Colihue SRL.
- Kotz, J., Treichel, P., & Weaver, G. (2005). *Química y Reactividad Química*. Thomson.
- Llamas Borrajo, J. M. (S/A). *Quimiometría y Métodos Instrumentales*. Madrid, España: Universidad Politécnica de Madrid.
- López Arellano, R., & Gómez Almaraz, L. (2005). *Bioequivalencia*. México: UNAM.
- Mannhold, R., Kubinyi, H., & Folkers, G. (2012). *Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Desing* (Third Edition ed.). WILEY-VCH.
- Miller, J. C., & Miller, J. N. (1993). *Estadística para química analítica* (Segunda edición ed.). Estados Unidos: Addison-Wesley Iberoamericana.
- Montejo Rubio, M. C., Aguilar Ros, A., Caamaño Somoza, M., & Martín Martín, F. R. (2008). *Biofarmacia y farmacocinetica*. España: Elsevier.
- Mutavdzic, P., D., B., S., H., & J.A., K.-M. (2007). *Sample preparation in analysis of pharmaceuticals, trends in analytical chemistry*.

- Nielsen, C., & Birger, B. (2010). *Molecular Biopharmaceutics, Aspects of drug characterization drug delivery and dosage form evaluation*. London, Chicago: Pharmaceutical Press.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (9 de Febrero de 2012). *Solicitud Productos Biologicos*. Obtenido de <http://www.rr-americas.oie.int/es/proyectos/Camevet/fichas/farmacos/BENCILPENICILINA.htm>
- Osol, A. P. (1973). *The United States Dispensatory*. Philadelphia, USA: Lippincott Company.
- Prohens, R., & Puigjaner, C. (2007). Polimorfismo en la Industria Farmacéutica. *El Farmacéutico*(373), 58-68.
- Qiu, Y., Chen, Y., & Zhang, G. (2009). *Developing Solid Oral Dosage Forms Pharmaceutical Theory and Practice*. United States of America: Elsevier.
- Quattrocchi, O. A. (1992). *Introducción al HPLC. Aplicación y Práctica*. Buenos Aires, México: Artes Gráficas Farro.
- Rodríguez Cadena, H., & Cortés Arroyo, A. (1996). *Aspectos biofarmaceuticos de la evaluación de medicamentos*. México, DF: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Rozet, E. (2007). Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *Journal of chromatography A*, 111.
- Rubinson, J. (2000). *Química Analítica Contemporánea*. México: Pearson Educación.
- S. Banker, G., Siepmann, J., & Rhodes, C. (2002). *Modern Pharmaceutical* (Fourth edition ed.). CRC Press.
- S/N. (s.f.).
- Secretaría de Salud. (22 de Julio de 2013). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos. México.
- Secretaría de Salud. (s.f.). Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, 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 de intercambiabilidad. México.
- Shargel, L., & Yu, A. (1993). *Applied Biofarmaceutics and Pharmacokinetics* (3 ed.). USA: McGraw-Hill.
- Shingal, D. (2004). Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*(56), 335-347.
- Skoog, D. A. (2005). *Fundamentos de Química Analítica* (8 ed.). México: Thomson.

- Stahl, H. (2011). *Handbook of Pharmaceutical Salts Properties, Selection and Use* (2 ed.). Switzerland: Verlag Helvetica Chimica Acta.
- The International Conference on Harmonisation (ICH). (2005). *Q2B: Guideline Validation of Analytical Methods*.
- Thornton Morrison, R., & Neilson Boyd, R. (1998). *Química Orgánica* (Quinta edición ed.). México: Pearson educación.
- U.S. Pharmacopeial Convention (USP). (2006). *United State Pharmacopea 30-National Formulary 25* (Vol. 1). Rockville, MD, Estados Unidos de América: Port City Press.
- Vázquez Miranda, J. (2002). *Calidad en las organizaciones (Empresas e instituciones de producción de servicios) Validación de métodos analíticos como parte de un sistema de administración de calidad*. Estado de México, México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- Velandia, C. J. (2008). *Validación del Método Analítico para la Cuantificación de Bacitracina en el Laboratorio de Control de Calidad de una Industria Farmacéutica Veterinaria*. Bogotá D.C. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- Vila Jato, J. L. (2001). *Tecnología Farmaceutica, Aspectos fundamentales de los sistemas farmaceuticos y operaciones basicas* (Vol. I). España: Sintesis.

X. ANEXOS

Estabilidad del STD 1

Tabla No. 10.1. Resultados de la evaluación espectrofotométrica de estabilidad de BPB a temperatura ambiente (24 y 25 °C) en Solns de 20 y 40 µg/mL de STD 1				
HR (%)	Temperatura (°C)	Concentración de BPB (µg/mL)	Tiempo (min)	205 nm
37	24	20	0	1.112
			30	1.1232
			60	1.1170
			90	1.1112
35	25	20	120	1.1136
			150	1.1111
			180	1.1272
			$\overline{x Abs}$	1.1165
			S	0.0064
			CV	0.5730
			$DA = \frac{\%cuantificado_{final} - \%cuantificado_{inicial}}{\%cuantificado_{inicial}}$	1.37
34	24	40	0	2.0127
			29	2.0014
			59	1.9866
			89	2.0034
			120	1.9904
			149	1.9987
33	25	40	179	2.0029
			$\overline{x Abs}$	1.9994
			S	0.0087
			CV	0.4353
			$DA = \frac{\%cuantificado_{final} - \%cuantificado_{inicial}}{\%cuantificado_{inicial}}$	0.49

Tabla No. 10.2. Resultados de la evaluación espectrofotométrica de estabilidad de BPB a 40 °C en Solns de 20 y 40 µg/mL de STD 1					
HR (%)	Temperatura (°C)	Concentración de BPB (µg/mL)	Tiempo (min)	205 nm	
37	40	20	0	1.2098	
			29	1.1955	
			60	1.1841	
93			1.2121		
124			1.193		
155			1.2145		
35		20	184	1.1822	
			$\bar{x} Abs$	1.1987	
			S	0.0134	
CV			1.1195		
$DA = \overline{\%cuantificado}_{final} - \overline{\%cuantificado}_{inicial}$			2.28		
34			40	0	2.0767
	29	2.072			
	59	2.0687			
	93	2.0714			
	124	2.0677			
	155	2.0743			
33	40	184	2.0561		
$\bar{x} Abs$		2.0696			
S		0.0067			
CV		0.3230			
$DA = \overline{\%cuantificado}_{final} - \overline{\%cuantificado}_{inicial}$			0.99		

Tabla No. 10.3. Resultados de la evaluación espectrofotométrica de estabilidad de BPB a 4 °C en Solns de 20, 40 y 100 µg/mL de STD 1				
HR (%)	Temperatura (°C)	Concentración de BPB (µg/mL)	Tiempo (min)	205 nm
37	4	20	0	1.0764
			41	1.0592
			72	1.0612
101			1.0664	
132			1.0432	
161			1.0269	
35		20	192	1.0651
			$\bar{x} Abs$	1.0569
			S	0.0166
CV			1.5686	
DA = $\frac{\% \text{cuantificado}_{\text{final}} - \% \text{cuantificado}_{\text{inicial}}}{\% \text{cuantificado}_{\text{inicial}}}$			1.05	
34			40	0
	40	1.9873		
	72	1.9878		
	100	1.9968		
	131	1.9873		
	161	1.9818		
33	40	192	1.9654	
$\bar{x} Abs$		1.9875		
S		0.0126		
CV		0.6343		
DA = $\frac{\% \text{cuantificado}_{\text{final}} - \% \text{cuantificado}_{\text{inicial}}}{\% \text{cuantificado}_{\text{inicial}}}$		2.03		

Evaluación de posibles interferencias e interacciones de la matriz del producto de referencia

Tabla No. 10.4. Datos obtenidos de la balanza METTLER TOLEDO AB204-S para la determinación de polvo contenido en una unidad de dosis de Prod ref		
	Peso del frasco vial vacío (g)	Peso del frasco vial con Prod ref (g)
	13.3735	14.2974
	13.3851	14.5105
	13.2509	14.5344
\bar{x}	13.3365	14.4474
s	0.0743	0.1304
C.V	0.5575	0.9031
Peso del polvo en el frasco vial (g)	1.1109	

Tabla No. 10.5. Datos obtenidos de la balanza OHAUS para la determinación de polvo contenido en una unidad de dosis de Prod ref		
	Peso del frasco vial vacío (g)	Peso del frasco con Prod ref (g)
	13.3735	14.2980
	13.3854	14.5112
	13.2510	14.5351
\bar{x}	13.3366	14.4481
s	0.0744	0.1305
C.V	0.5579	0.9035
Peso del polvo en el frasco vial (g)	1.1115	

Tabla No. 10.6. Proporción de los componentes de la formulación de una unidad de dosis de Prod ref						
Producto	Especificación de BPB en etiqueta (UI**)	Masa* de polvo por frasco (g)	Contenido de BPB por frasco		Contenido de excipientes por frasco	
			(g)	(%)	(g)	(%)
Producto 1	1200000	1.1112	0.9909	89.1754	0.1203	10.8246
* se consideró la masa promedio de tres frascos de cada producto						
**1211 UI de BPB = 1 mg						

Tabla No. 10.7. Proporción de los excipientes de la formulación de una unidad de dosis de Prod ref

	g excipientes	% de excipientes
Excipiente 1	0.1082	9.7422
Excipiente 2	0.0096	0.8660
Excipiente 3	0.0024	0.2165

Tabla No. 10.8. Comparación de curvas de calibración sin y con excipientes en una proporción baja (0.6µg/ml) y alta (3.6µg/ml)

Concentración de BPB (µg/ml)	Sin excipientes		Con excipientes			
	Abs(205)	ε (mL/µg*cm)	Proporción baja (0.6µg/mL)		Proporción alta (3.6µg/mL)	
			Abs(205)	ε (mL/µg*cm)	Abs(205)	ε (mL/µg*cm)
10.1526	0.5368	0.0529	0.5389	0.0531	0.5573	0.0549
15.2289	0.8219	0.0540	0.8250	0.0542	0.8616	0.0566
20.3052	1.1054	0.0544	1.1128	0.0548	1.1520	0.0567
25.3815	1.3815	0.0544	1.3530	0.0533	1.4014	0.0552
30.4578	1.6029	0.0526	1.5951	0.0524	1.6363	0.0537
10.1526	0.5725	0.0564	0.5552	0.0547	0.5883	0.0579
15.2289	0.8472	0.0556	0.8362	0.0549	0.8896	0.0584
20.3052	1.1447	0.0564	1.1334	0.0558	1.1179	0.0551
25.3815	1.3952	0.0550	1.3726	0.0541	1.3770	0.0543
30.4578	1.5994	0.0525	1.6373	0.0538	1.5942	0.0523
10.1526	0.6039	0.0595	0.5568	0.0548	0.5637	0.0555
15.2289	0.8601	0.0565	0.8331	0.0547	0.8605	0.0565
20.3052	1.0999	0.0542	1.0972	0.0540	1.1198	0.0552
25.3815	1.3421	0.0529	1.3463	0.0530	1.3671	0.0539
30.4578	1.5842	0.0520	1.5897	0.0522	1.5947	0.0524

Optimización del tiempo de agitación (producto de referencia) (15 y 30 min de agitación, con 15 mL de metanol)

Tabla No. 10.9. Método analítico de contenido químico de BPB contenida en Prod ref empleando 15 min de agitación magnética						
Mtra	Peso (g)	Abs (205 nm)	Concentración de BPB ($\mu\text{g/mL}$)	Cantidad de BPB (mg)	% de BPB	
1	0.0711	0.7100	13.4342	67.1711	94.5357	
		0.7107	13.4474	67.2368		
		0.7107	13.4474	67.2368		
		\bar{x}	13.4430	67.2149		
		s	0.0076	0.0380		
		C.V	0.0565	0.0565		
2	0.0712	0.7122	13.4762	67.3810	94.8618	
		0.7108	13.4492	67.2462		
		0.7158	13.5426	67.7130		
		\bar{x}	13.4893	67.4467		
		s	0.0480	0.2402		
		C.V	0.3562	0.3562		
3	0.0711	0.7108	13.4492	67.2462	94.1201	
		0.7034	13.3108	66.5539		
		0.7077	13.3916	66.9580		
		\bar{x}	13.3839	66.9194		
		s	0.0696	0.3478		
		C.V	0.5197	0.5197		
					\bar{x}	94.5059
					s	0.3718
					C.V	0.3934

Tabla No. 10.10. Método analítico de contenido químico de BPB contenida en Prod ref empleando 30 min de agitación magnética						
Mtra	Peso (g)	Abs (205 nm)	Concentración de BPB ($\mu\text{g/mL}$)	cantidad de BPB (mg)	% de BPB	
4	0.0711	0.7085	13.4054	67.0269	94.7678	
		0.7113	13.4580	67.2901		
		0.7169	13.5645	67.8227		
		\bar{x}	13.4760	67.3799		
		s	0.0811	0.4054		
		C.V	0.6017	0.6017		
5	0.0711	0.7154	13.5363	67.6817	94.5570	
		0.7065	13.3678	66.8390		
		0.7130	13.4906	67.4530		
		\bar{x}	13.4649	67.3246		
		s	0.0872	0.4358		
		C.V	0.6473	0.6473		
6	0.0711	0.7076	13.3897	66.9486	94.2714	
		0.7127	13.4856	67.4279		
		0.7050	13.3409	66.7043		
		\bar{x}	13.4054	67.0269		
		s	0.0736	0.3681		
		C.V	0.5492	0.5492		
					\bar{x}	94.5320
					s	0.2492
					C.V	0.2636

Evaluación de especificidad

Tabla No. 10.11. Resultados de la determinación de la especificidad del método analítico para la determinación de contenido químico de BPB en Prod ref y Prod pba

Peso (mg)	Abs (205 nm)	Cantidad (mg) de BPB cuantificado
Prod ref		
70.65	Sol B	
	0.7094	67.1147
	0.7181	67.9292
	0.7180	67.9229
	Sol AB	
	0.8213	77.6284
	0.8270	78.1673
	0.8263	78.1015
	Sol B-A	
	0.7079	66.9706
	0.7136	67.5094
	0.7129	67.4436
Prod pba		
70.55	Sol B	
	0.7877	74.4737
	0.7864	74.3515
	0.7837	74.0977
	Sol AB	
	0.8938	84.4486
	0.8992	84.9530
	0.8973	84.7776
	Sol B-A	
	0.7804	73.7907
	0.7858	74.2951
	0.7839	74.1197

Linealidad del método

En la Tabla No.10.12 se presenta la composición de los placebos cargados que representan los cinco niveles de porción del analito en la muestra (80-110%).

Tabla No. 10.12. Composición de placebos cargados							
	% Teórico		mg pesados			% Experimental	
	BPB	EXCP	BPB	EXCP	Total	BPB	EXCP
110	99	1	1147.052	18.790	1165.842	98.388	1.612
107	96.5	3.5					
100	90	10	1042.804	121.480	1164.284	89.566	10.434
90	81	19	938.074	227.850	1165.924	80.458	19.542
80	72	28	833.875	337.300	1171.175	71.200	28.800

Tabla No. 10.13. Resultados de linealidad al aplicar el ensayo analítico a los placebos cargados (80-110%)										
Mtra	% BPB	Peso de la mtra (mg)	%BPB	%EXCP	Abs (205nm)	Concentración de BPB (µg/mL)	Cantidad de BPB (mg) adicionada	Cantidad de BPB (mg) recuperada	A/R	%recobro
1	110	73.36	98.388	1.612	0.7960	14.5274	72.1776	72.6369	0.9937	100.6362
2	110	73.05	98.388	1.612	0.7918	14.4501	71.8726	72.2505	0.9948	100.5257
3	110	73.09	98.388	1.612	0.7893	14.4035	71.9120	72.0173	0.9985	100.1464
1	107.2	70.32	96.5077	0	0.7584	13.8398	67.8642	69.1988	0.9807	101.9665
2	107.2	70.08	96.5077	0	0.7515	13.7136	67.6326	68.5682	0.9864	101.3833
3	107.2	70.21	96.5077	0	0.7575	13.8248	67.7581	69.1238	0.9802	102.0156
1	100	70.41	89.566	10.434	0.6920	12.6280	63.0635	63.1400	0.9988	100.1213
3	100	70.16	89.566	10.434	0.6824	12.4526	62.8396	62.2630	1.0093	99.0824
5	100	70.34	89.566	10.434	0.6856	12.5112	63.0008	62.5560	1.0071	99.2940
1	90	70.08	80.458	19.542	0.6185	11.2873	56.3847	56.4364	0.9991	100.0917
2	90	70.18	80.458	19.542	0.6070	11.0772	56.4651	55.3860	1.0195	98.0889
3	90	70.38	80.458	19.542	0.6111	11.1522	56.6260	55.7611	1.0155	98.4726
1	80	70	71.200	28.800	0.5430	9.9098	49.8399	49.5492	1.0059	99.4168
2	80	70.06	71.200	28.800	0.5465	9.9739	49.8826	49.8696	1.0003	99.9739
3	80	70.3	71.200	28.800	0.5591	10.2024	50.0535	51.0122	0.9812	101.9154
1	SR1	10.17	100	0	0.8916	16.2720				

Exactitud y repetibilidad

Tabla No. 10.14. Resultados de exactitud y repetibilidad al aplicar el ensayo analítico al placebo cargado al 100 %

Mtra	% BPB	Peso de la mtra (mg)	%BPB	%EXCP	Abs (205nm)	Concentración de BPB (µg/mL)	Cantidad de BPB (mg) adicionada	Cantidad de BPB (mg) recuperada	A/R	%recobro
1	100	70.41	89.57	10.43	0.6920	12.6280	63.0635	63.1400	0.9988	100.1213
2	100	70.32	89.57	10.43	0.6824	12.4526	62.9829	62.2630	1.0116	98.8570
3	100	70.16	89.57	10.43	0.6856	12.5112	62.8396	62.5560	1.0045	99.5487
4	100	70.6	89.57	10.43	0.6837	12.4763	63.2337	62.3816	1.0137	98.6525
5	100	70.34	89.57	10.43	0.6846	12.4929	63.0008	62.4647	1.0086	99.1491
6	100	70.34	89.57	10.43	0.6820	12.4459	63.0008	62.2295	1.0124	98.7758
1	SR1	10.17	100	0	0.8916	16.2720	63.0635	63.1400	0.9988	100.1213

Precisión intermedia (producto de referencia)

Tabla No. 10.15. Resultados obtenidos de la evaluación de la precisión intermedia método para determinar contenido químico de BPB (Prod ref), realizada por el Analista 1 el día 1

	Peso (mg)	Abs (205 nm)	Concentración (µg/mL) BPB	mg de BPB	% de BPB	\bar{x} % de BPB
1	71.00	0.7096	13.4267	67.1335	94.5542	94.5586
		0.7097	13.4286	67.1429	94.5674	
		0.7096	13.4267	67.1335	94.5542	
2	71.30	0.7177	13.5789	67.8947	95.2240	95.1889
		0.7175	13.5752	67.8759	95.1977	
		0.7171	13.5677	67.8383	95.1449	
3	70.00	0.7015	13.2744	66.3722	94.8174	95.0412
		0.7049	13.3383	66.6917	95.2739	
		0.7031	13.3045	66.5226	95.0322	
					\bar{x}	94.9295
					S	0.3296
					CV	0.3473

Tabla No. 10.16. Resultados obtenidos de la evaluación de la precisión intermedia método para determinar contenido químico de BPB (Prod ref), realizada por el Analista 2 el día 1						
Peso (mg)	Abs (205 nm)	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$) BPB	mg de BPB	% de BPB	\bar{x} % de BPB	
1	70.6	0.7007	13.2594	66.2970	93.9051	94.0027
		0.7013	13.2707	66.3534	93.9850	
		0.7023	13.2895	66.4474	94.1181	
2	70.3	0.6902	13.0620	65.3102	92.9021	93.0046
		0.6911	13.0789	65.3947	93.0224	
		0.6916	13.0883	65.4417	93.0892	
3	70.5	0.6969	13.1880	65.9398	93.5317	93.5628
		0.6971	13.1917	65.9586	93.5584	
		0.6974	13.1974	65.9868	93.5984	
				\bar{x}	93.5234	
				S	0.5002	
				CV	0.5349	

Tabla No. 10.17. Resultados obtenidos de la evaluación de la precisión intermedia método para determinar contenido químico de BPB (Prod ref), realizada por el Analista 1 el día 2						
Peso (mg)	Abs (205 nm)	Concentración (mg/mL) BPB	mg de BPB	% de BPB	\bar{x} % de BPB	
1	70.20	0.7069	13.3753	66.8766	95.2658	95.1661
		0.7070	13.3784	66.8922	95.2881	
		0.7045	13.3302	66.6510	94.9444	
2	70.97	0.7171	13.5677	67.8383	95.5874	95.0944
		0.7128	13.4868	67.4342	95.0179	
		0.7102	13.4386	67.1930	94.6780	
3	70.92	0.7080	13.3966	66.9831	94.4488	94.0910
		0.7017	13.2776	66.3878	93.6095	
		0.7062	13.3634	66.8170	94.2147	
				\bar{x}	94.7838	
				S	0.6011	
				CV	0.6342	

Tabla No. 10.18. Resultados obtenidos de la evaluación de la precisión intermedia método para determinar contenido químico de BPB (Prod ref), realizada por el Analista 2 el día 2						
Peso (mg)	Abs (205 nm)	Concentración (mg/mL) BPB	mg de BPB	% de BPB	\bar{x} % de BPB	
1	70.38	0.7010	13.2644	66.3221	94.2342	94.2313
		0.7002	13.2506	66.2531	94.1363	
		0.7016	13.2769	66.3847	94.3233	
2	70.57	0.7026	13.2945	66.4724	94.1936	93.9273
		0.7006	13.2569	66.2845	93.9273	
		0.6986	13.2193	66.0965	93.6609	
3	70.38	0.6985	13.2180	66.0902	93.9048	93.6600
		0.6960	13.1711	65.8553	93.5710	
		0.6955	13.1617	65.8083	93.5042	
				\bar{x}	93.9395	
				S	0.2858	
				CV	0.3043	

Determinación de contenido químico de BPB en producto de referencia y producto de prueba

Tabla No. 10.19. Resultados de la determinación contenido químico de BPB en Prod ref y Prod pba					
Prod ref					
Peso (mg)	Abs (205 nm)	Concentración (µg/mL)	cantidad (mg) de BPB	% de BPB	
70.25	0.7012	13.2697	66.3485	94.4463	94.6529
	0.7032	13.3073	66.5365	94.7139	
	0.7039	13.3192	66.5960	94.7986	
70.59	0.7035	13.3117	66.5584	94.2887	93.9766
	0.7005	13.2565	66.2827	93.8982	
	0.6994	13.2346	66.1731	93.7428	
70.39	0.7016	13.2766	66.3830	94.3074	94.3319
	0.6986	13.2202	66.1010	93.9068	
	0.7050	13.3399	66.6994	94.7569	
				\bar{x} de % global de BPB	94.3205
				S	0.3383
				CV	0.3587
Prod pba					
Peso (mg)	Abs (205 nm)	Concentración (µg/mL)	cantidad (mg)	% de BPB	\bar{x} de % de BPB
70.62	0.7413	14.0232	70.1159	99.2862	99.1694
	0.7373	13.9480	69.7400	98.7539	
	0.7427	14.0489	70.2444	99.4681	
70.31	0.7300	13.8108	69.0539	98.2135	98.1659
	0.7290	13.7907	68.9536	98.0709	
	0.7300	13.8108	69.0539	98.2135	
70.42	0.7357	13.9173	69.5865	98.8163	98.5865
	0.7300	13.8095	69.0476	98.0511	
	0.7363	13.9279	69.6397	98.8920	
				\bar{x} de % global de BPB	98.6406
				S	0.5039
				CV	0.5109

Determinación de solubilidad del STD 2 en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 a 37 °C.

Tabla No. 10.20. Resultados de la determinación de solubilidad de BPB en Sol amortiguadora de fosfatos pH=6.8 a 37 °C			
STD 2	Peso (g)	Abs (205 nm)	Concentración de BPB (mg/mL)
1	0.72085	0.9510	0.3593
		0.9519	0.3596
		0.9600	0.3627
2	0.72588	0.9622	0.3635
		0.9559	0.3611
		0.9535	0.3602
3	0.72176	0.9638	0.3641
		0.9592	0.3624
		0.9642	0.3642
		\bar{x}	0.3619
		S	0.0019
		CV	0.5260

Elección de la dilución el perfil de disolución en el aparato II USP (producto de referencia)

Tabla No. 10.21. Abs de las muestras del perfil de disolución del Prod ref con una dilución 2/10 mL			
		Vaso	
Peso (mg)	70.0	70.3	70.3
Tiempo (min)	1	2	3
		Abs	
30	0.7351	0.6722	0.6863
60	0.7658	0.8012	0.7647
120	0.8871	0.8535	0.9427
180	0.9188	0.8699	0.9275
240	0.8672	0.8327	0.8814

Tabla No. 10.22. Abs de las muestras del perfil de disolución del Prod ref con una dilución 5/25 mL

Vaso			
Peso (mg)	70.0	70.3	70.3
Tiempo (min)	1	2	3
Abs			
30	0.6759	0.6777	0.7222
60	0.7709	0.8126	0.7708
120	0.8980	0.8879	0.9018
180	0.9386	0.8805	0.9340
240	0.8711	0.8394	0.9093

Tabla No. 10.23. Concentración de BPB ($\mu\text{g}/\text{mL}$) disueltos de tres muestras de suspensión inyectable de BPB (Prod ref) a diferentes tiempos de muestreo en el aparato II con una dilución 2/10 mL

Tiempo (min)	1	2	3	\bar{x}	S	CV
30	69.5332	63.6153	64.9467	66.0317	3.1046	4.7016
60	72.4154	75.7456	72.3120	73.4910	1.9532	2.6578
120	83.8189	80.6548	89.0445	84.5061	4.2369	5.0137
180	86.7982	82.1992	87.6128	85.5368	2.9189	3.4125
CV _{global}						3.9464

Tabla No. 10.24. Concentración de BPB ($\mu\text{g}/\text{mL}$) disueltos de tres muestras de suspensión inyectable de BPB (Prod ref) a diferentes tiempos de muestreo en el aparato II con una dilución 5/25 mL

Tiempo (min)	1	2	3	\bar{x}	S	CV
30	63.9662	64.1385	68.3177	65.4741	2.4641	3.7635
60	72.8916	76.8139	72.8853	74.1970	2.2664	3.0545
120	84.8371	83.8941	85.2005	84.6439	0.6743	0.7966
180	88.6591	83.1955	88.2237	86.6928	3.0366	3.5027
CV _{global}						2.7793

Evaluación de influencia del filtro

Tabla No. 10.25. Concentración de BPB ($\mu\text{g}/\text{mL}$) durante la evaluación de dos filtros Wathman No. 542 ($2.7\mu\text{m}$)			
STD1			
Peso (mg)		10.15	
Abs		Cantidad mg	
sin filtrar	2.7 mm	sin filtrar	2.7 μm
1.2153	1.2164	191.0975	191.2698
1.2173	1.2189	191.4213	191.6667
1.2159	1.2243	191.1915	192.5073
1.2134	1.2265	190.8060	192.8580
1.2144	1.2245	190.9620	192.5440
1.2167	1.2257	191.3220	192.7320
	\bar{x}	191.1334	192.2630
	%	100	100.5910
DA = $\overline{\% \text{ sol filtrada}} - \overline{\% \text{ sol sin filtrar}}$		0.5910	

Estabilidad de la muestra (producto de referencia y producto de prueba)

Tabla No. 10.26. Evaluación de la estabilidad de la muestra (Prod ref y Prod pba)				
Prod ref				
Tiempo (min)	Concentración de BPB ($\mu\text{g/mL}$)			
	1	2	3	\bar{x}
30	100.6391	101.5890	100.8615	101.0299
60	100.7550	100.0132	99.5708	100.1130
120	100.8835	100.3202	99.9248	100.3761
180	101.2531	101.1034	99.9655	100.7740
1440	101.5476	101.3947	100.3383	101.0936
DA = $\text{Con. cuantificado}_{\text{final}} - \text{Con. cuantificado}_{\text{inicial}}$				0.0637
Prod pba				
Tiempo (min)	Concentración de BPB ($\mu\text{g/mL}$)			
	1	2	3	\bar{x}
30	75.5764	76.1372	74.3803	75.3647
60	73.8722	74.7619	73.6253	74.0865
120	73.9004	74.8183	74.4555	74.3914
180	73.8471	75.2600	74.8565	74.6546
1440	75.0031	75.2193	74.8816	75.0347
DA = $\text{Con. cuantificado}_{\text{final}} - \text{Con. cuantificado}_{\text{inicial}}$				-0.3300

Linealidad del método (producto de referencia)

Tabla No. 10.27. Concentraciones de los niveles para la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod ref)									
Peso de STD 2 (g)	Pureza (%)	BPB (g)	BPB (mg)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$) en 50 mL	Concentración ($\mu\text{g/mL}$) en 200 mL				
					2 mL	4 mL	6 mL	8 mL	10 mL
0.02509	96.5077	0.2421	24.2138	484.2756	4.8428	9.6855	14.5283	19.3710	24.2138
					Concentración ($\mu\text{g/mL}$) en 25 mL				
					Nivel				
					1	2	3	4	5
					10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
					1.9371	3.8742	5.8113	7.7484	9.6855

Tabla No. 10.28. Curva de Calibración de STD 2 BPB empleada para la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod ref)

Concentración de BPB (µg/mL)	Abs (205 nm)	Abs (205 nm)/ Concentración de BPB (µg/mL)
1.9371	0.1063	0.0549
1.9371	0.1076	0.0555
1.9371	0.1057	0.0546
3.8742	0.2104	0.0543
3.8742	0.2109	0.0544
3.8742	0.2088	0.0539
5.8113	0.3175	0.0546
5.8113	0.3154	0.0543
5.8113	0.3155	0.0543
7.7484	0.4173	0.0539
7.7484	0.4168	0.0538
7.7484	0.4147	0.0535
9.6855	0.5204	0.0537
9.6855	0.5202	0.0537
9.6855	0.5230	0.0540
	\bar{x}	0.0542
	S	0.0005
	CV	0.9884
	β_0	0.0034
	β_1	0.0535
	r	0.9999
	r^2	0.9999

Para conocer la cantidad de BPB que hay en la muestra se colocó 10 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 en un matraz volumétrico de 25 mL y aforando con las soluciones A, B y C.

Tabla No. 10.29. Determinación de la concentraciones de las Solns (A, B y C) utilizadas para la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod ref)

Sol	Abs (205 nm)	Concentración (µg/mL)	$\bar{x}_{concentracion} (\frac{\mu g}{mL})$
A	0.7626	14.2031	14.1548
	0.7610	14.1719	
	0.7566	14.0896	
B	0.8564	15.9571	16.0066
	0.8621	16.0631	
	0.8587	15.9995	
C	0.8837	16.4678	16.5245
	0.8872	16.5333	
	0.8893	16.5725	

Tabla No. 10.30. Resultados obtenidos de la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod ref)

Soln	[BPB]($\mu\text{g/mL}$)	A (205 nm)	Soln	[BPB]($\mu\text{g/mL}$)	A (205 nm)	Soln	[BPB]($\mu\text{g/mL}$)	A (205 nm)	Soln	[BPB]($\mu\text{g/mL}$)	A (205 nm)	Soln	[BPB]($\mu\text{g/mL}$)	A (205 nm)
1	0	0.1063	2	0	0.2104	3	0	0.3175	4	0	0.4173	5	0	0.5204
A1	14.1548	0.8523	A2	14.1548	0.9611	A3	14.1548	1.0544	A4	14.1548	1.1768	A5	14.1548	1.2770
B1	16.0066	0.9573	B2	16.0066	1.0621	B3	16.0066	1.1721	B4	16.0066	1.2784	B5	16.0066	1.3671
C1	16.5245	1.0107	C2	16.5245	1.0825	C3	16.5245	1.2017	C4	16.5245	1.3071	C5	16.5245	1.3937
	β_1	0.1043		β_1	0.2106		β_1	0.3156		β_1	0.4171		β_1	0.5212
	β_0	0.0538		β_0	0.0530		β_0	0.0532		β_0	0.0538		β_0	0.0530
	r	0.9995		r	1.0000		r	0.9997		r	1.0000		r	1.0000
	β_0/β_1	1.9395		β_0/β_1	3.9740		β_0/β_1	5.9343		β_0/β_1	7.7537		β_0/β_1	9.8367
	[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	1.9371		[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	3.8742		[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	5.8113		[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	7.7484		[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	9.6855
	%	100.1263		%	102.5756		%	102.1169		%	100.0677		%	101.5615
1	0	0.1076	2	0	0.2109	3	0	0.3154	4	0	0.4168	5	0	0.5202
A1	14.1548	0.8571	A2	14.1548	0.9617	A3	14.1548	1.0587	A4	14.1548	1.1713	A5	14.1548	1.2806
B1	16.0066	0.9612	B2	16.0066	1.0672	B3	16.0066	1.1700	B4	16.0066	1.2785	B5	16.0066	1.3693
C1	16.5245	1.0081	C2	16.5245	1.0810	C3	16.5245	1.2031	C4	16.5245	1.3109	C5	16.5245	1.3898
	β_1	0.1060		β_1	0.2111		β_1	0.3139		b	0.4159		β_1	0.5215
	β_0	0.0538		β_0	0.0530		β_0	0.0534		m	0.0539		β_0	0.0530
	r	0.9997		r	0.9999		r	0.9998		r	0.9999		r	0.9999
	β_0/β_1	1.9719		β_0/β_1	3.9786		β_0/β_1	5.8826		b/m	7.7223		β_0/β_1	9.8399
	[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	1.9371		[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	3.8742		[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	5.8113		[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	7.7484		[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	9.6855
	%	101.7948		%	102.6952		%	101.2276		%	99.6631		%	101.5944
1	0	0.1057	2	0	0.2088	3	0	0.3155	4	0	0.4147	5	0	0.5230
A1	7.7720	0.8566	A2	14.1548	0.9608	A3	14.1548	1.0563	A4	14.1548	1.1842	A5	14.1548	1.2839
B1	11.7323	0.9565	B2	16.0066	1.0654	B3	16.0066	1.1691	B4	16.0066	1.2777	B5	16.0066	1.3732
C1	15.3678	1.0079	C2	16.5245	1.0720	C3	16.5245	1.1995	C4	16.5245	1.3087	C5	16.5245	1.3918
	β_1	0.1042		β_1	0.2095		β_1	0.3140		β_1	0.4151		β_1	0.5243
	β_0	0.0538		β_0	0.0529		β_0	0.0532		β_0	0.0541		β_0	0.0530
	r	0.9996		r	0.9998		r	0.9998		r	1.0000		r	0.9998
	β_0/β_1	1.9384		β_0/β_1	3.9617		β_0/β_1	5.9018		β_0/β_1	7.6757		β_0/β_1	9.8931
	[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	1.9371		[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	3.8742		[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	5.8113		[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	7.7484		[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	9.6855
	%	100.0671		%	102.2593		%	101.5568		%	99.0621		%	102.1429

Linealidad del método (producto de prueba)

Tabla No. 10.31. Concentraciones de los niveles para la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod pba)

Peso de STD 2 (g)	Pureza (%)	BPB (g)	BPB (mg)	Concentración (µg/mL) en 50 mL	Concentración (µg/mL) en 200 mL				
					2 mL	4 mL	6 mL	8 mL	10 mL
0.02511	96.5077	0.2423	24.2331	484.6617	4.8466	9.6932	14.5399	19.3865	24.2331
					Concentración (µg/mL) en 25 mL				
					Nivel				
					1	2	3	4	5
					10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
1.9386	3.8772	5.8159	7.7545	9.6932					

Tabla No. 10.32. Concentraciones de los niveles para la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod pba)

Concentración de BPB (µg/mL)	Abs (205 nm)	ϵ (mL/µg*cm)
1.9386	0.1125	0.0580
1.9386	0.1135	0.0586
1.9386	0.1122	0.0579
3.8773	0.2189	0.0565
3.8773	0.2194	0.0566
3.8773	0.2183	0.0563
5.8159	0.3329	0.0572
5.8159	0.3294	0.0566
5.8159	0.3308	0.0569
7.7546	0.4434	0.0572
7.7546	0.4414	0.0569
7.7546	0.4420	0.0570
9.6932	0.5523	0.0570
9.6932	0.5519	0.0569
9.6932	0.5502	0.0568
	\bar{x}	0.0571
	S	0.0006
	CV	1.0830
	β_1	0.0568
	β_0	0.0010
	r	0.9999
	r^2	0.9998

Para conocer la cantidad de BPB que hay en la muestra se colocó 10 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH=6.8 en un matraz volumétrico de 25 mL y aforando con las soluciones A, B y C.

Tabla No. 10.33. Determinación de la concentraciones de las Solns (A, B y C) utilizadas para la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod pba)

Sol	Abs (205 nm)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	\bar{X} concentración ($\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$)
A	0.4734	8.3188	8.3033
	0.4741	8.3317	
	0.4700	8.2595	
B	0.6129	10.7759	10.8111
	0.6124	10.7671	
	0.6194	10.8903	
C	0.6806	11.9674	11.9735
	0.6867	12.0754	
	0.6755	11.8778	

Tabla No. 10.34. Resultados obtenidos de la evaluación de la linealidad del método analítico para determinar cantidad disuelta de BPB por adiciones patrón (Prod pba)														
Soln	[BPB]($\mu\text{g/mL}$)	A (205 nm)	Soln	[BPB]($\mu\text{g/mL}$)	A (205 nm)	Soln	[BPB]($\mu\text{g/mL}$)	A (205 nm)	Soln	[BPB]($\mu\text{g/mL}$)	A (205 nm)	Soln	[BPB]($\mu\text{g/mL}$)	A (205 nm)
1	0	0.1125	2	0	0.2189	3	0	0.3329	4	0	0.4434	5	0	0.5523
A1	8.3033	0.5650	A2	8.3033	0.6937	A3	8.3033	0.7929	A4	8.3033	0.8908	A5	8.3033	1.0278
B1	10.8111	0.7220	B2	10.8111	0.8347	B3	10.8111	0.9441	B4	10.8111	1.0577	B5	10.8111	1.1446
C1	11.9735	0.7841	C2	11.9735	0.8894	C3	11.9735	1.0058	C4	11.9735	1.1055	C5	11.9735	1.2490
	β_1	0.0561		β_1	0.0564		β_1	0.0563		b	0.0558		β_1	0.0569
	β_0	0.1097		β_0	0.2207		β_0	0.3315		m	0.4407		β_0	0.5515
	r	0.9997		r	0.9998		r	0.9999		r	0.9993		r	0.9987
	β_0/β_1	1.9549		β_0/β_1	3.9114		β_0/β_1	5.8895		b/m	7.8977		β_0/β_1	9.6977
	[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	1.9386		[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	3.8773		[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	5.8159		[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	7.7546		[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	9.6932
	%	100.8398		%	100.8805		%	101.2645		%	101.8453		%	100.0458
1	0	0.1135	2	0	0.2194	3	0	0.3294	4	0	0.4414	5	0	0.5519
A1	8.3033	0.5677	A2	8.3033	0.6991	A3	8.3033	0.7929	A4	8.3033	0.8900	A5	8.3033	1.0326
B1	10.8111	0.7279	B2	10.8111	0.8351	B3	10.8111	0.9414	B4	10.8111	1.0531	B5	10.8111	1.1420
C1	11.9735	0.7909	C2	11.9735	0.8870	C3	11.9735	1.0075	C4	11.9735	1.1067	C5	11.9735	1.2489
	β_1	0.0566		β_1	0.0563		β_1	0.0566		β_1	0.0559		β_1	0.0568
	β_0	0.1103		β_0	0.2226		β_0	0.3280		β_0	0.4386		β_0	0.5522
	r	0.9996		r	0.9996		r	0.9999		r	0.9995		r	0.9983
	β_0/β_1	1.9498		β_0/β_1	3.9529		β_0/β_1	5.7976		β_0/β_1	7.8496		β_0/β_1	9.7161
	[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	1.9386		[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	3.8773		[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	5.8159		[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	7.7546		[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	9.6932
	%	100.5757		%	101.9497		%	99.6854		%	101.2247		%	100.2362
1	0	0.1122	2	0	0.2183	3	0	0.3308	4	0	0.4420	5	0	0.5502
A1	8.3033	0.5607	A2	8.3033	0.7012	A3	8.3033	0.8074	A4	8.3033	0.8909	A5	8.3033	1.0359
B1	10.8111	0.7256	B2	10.8111	0.8422	B3	10.8111	0.9401	B4	10.8111	1.0514	B5	10.8111	1.1392
C1	11.9735	0.7849	C2	11.9735	0.8856	C3	11.9735	1.0076	C4	11.9735	1.1038	C5	11.9735	1.2479
	β_1	0.0563		β_1	0.0566		β_1	0.0565		β_1	0.0556		β_1	0.0569
	β_0	0.1084		β_0	0.2219		β_0	0.3323		β_0	0.4397		β_0	0.5514
	r	0.9994		r	0.9993		r	0.9999		r	0.9996		r	0.9980
	β_0/β_1	1.9257		β_0/β_1	3.9210		β_0/β_1	5.8805		β_0/β_1	7.9049		β_0/β_1	9.6983
	[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	1.9386		[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	3.8773		[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	5.8159		[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	7.7546		[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	9.6932
	%	99.3307		%	101.1273		%	101.1100		%	101.9387		%	100.0520

Reproducibilidad intralaboratorio (producto de referencia)

Tabla No. 10.35. Resultados de reproducibilidad intralaboratorio			
Prod ref			
Analista 1		Analista 2	
Peso de mtra (mg)	100.7	Peso de mtra (mg)	101.3
Abs (205 nm)	Concentración de BPB (µg/mL)	Abs (205 nm)	Concentración de BPB (µg/mL)
1.0793	101.8807	1.0698	100.9900
1.0795	101.9016	1.0745	101.4317
Prod pba			
Analista 1		Analista 2	
Peso de mtra (mg)	101.9	Peso de mtra (mg)	100.42
Abs (205 nm)	Concentración de BPB (µg/mL)	Abs (205 nm)	Concentración de BPB (µg/mL)
0.7970	75.3477	0.7882	74.5175
0.7975	75.3947	0.7825	73.9818

Evaluación de la velocidad de agitación para la elaboración de los perfiles de disolución en el aparato II USP

Tabla No. 10.36. Abs de las Solns obtenidas del perfil de disolución del Prod ref con una agitación de 50 rpm

Vaso						
Peso (mg)	101.28	101.22	100.25	100.78	100.71	99.7
Tiempo (min)	1	2	3	4	5	6
30	0.7489	0.7118	0.76623	0.7136	0.7300	0.7849
60	0.8225	0.7686	0.79497	0.7789	0.7949	0.8336
90	0.9391	0.8761	0.98300	0.9336	0.9344	0.9624
120	0.9812	1.0389	0.99617	1.0297	1.0083	1.0368
180	1.0575	1.0593	1.11287	1.0919	1.0973	1.0980
240	1.0875	1.1128	1.12047	1.1464	1.1366	1.1236
300	1.1468	1.1458	1.12543	1.1531	1.1443	1.1398

Tabla No. 10.37. Abs de las Solns obtenidas del perfil de disolución del Prod ref con una agitación de 100 rpm

Vaso						
Peso (mg)	100.41	100.35	100.70	100.67	100.68	101.3
Tiempo (min)	1	2	3	4	5	6
30	0.7724	0.8178	0.7943	0.7519	0.7706	0.7248
60	0.8672	0.9061	0.8502	0.8551	0.8924	0.8924
90	0.8712	0.8534	0.8627	0.9609	0.9106	0.9201
120	0.9059	1.0097	0.9699	0.9477	0.9481	0.9625
180	1.0244	1.1098	1.1224	1.0562	1.0484	1.0584
240	1.0981	1.0590	1.1134	1.0957	1.0586	1.0444
300	1.1208	1.1196	1.1396	1.1218	1.1490	1.1626

Tabla No. 10.38. % de BPB disuelto de seis muestras de Prod ref a diferentes tiempos de muestreo en el aparato II a 50 rpm									
Vaso									
Tiempo (min)	1	2	3	4	5	6	\bar{x}	S	CV
30	66.7315	63.4811	68.9648	63.9155	65.4203	71.0243	66.5896	2.9499	4.4299
60	73.1703	68.4606	71.5066	69.6676	71.1353	75.3591	71.5499	2.4656	3.4460
90	83.2683	77.7675	87.9535	83.1219	83.2843	86.6842	83.6800	3.5464	4.2380
120	86.8747	91.7106	89.0921	91.3942	89.6484	93.1563	90.3127	2.2343	2.4740
180	93.3305	93.4377	99.0677	96.6774	97.2186	98.4108	96.3571	2.4533	2.5460
240	95.8337	97.9144	99.7098	101.2605	100.5265	100.5856	99.3051	2.0544	2.0688
300	100.7345	100.6460	100.1244	101.8170	101.1665	101.9485	101.0728	0.7107	0.7031
								CV global	2.8437

Tabla No. 10.39. % de BPB disuelto de seis muestras de Prod ref a diferentes tiempos de muestreo en el aparato II a 100 rpm									
Vaso									
Tiempo (min)	1	2	3	4	5	6	\bar{x}	S	CV
30	69.4027	73.5044	71.1591	67.3972	69.0562	64.5819	69.1836	3.0660	4.4317
60	77.7814	81.3049	76.0791	76.4884	79.7878	79.2545	78.4493	2.0250	2.5813
90	78.1307	76.6999	77.1704	85.7069	81.3700	81.6551	80.1222	3.4492	4.3050
120	81.1237	90.2052	86.3962	84.5673	84.6018	85.2779	85.3620	2.9566	3.4635
180	91.2398	98.7533	99.3765	93.8089	93.1417	93.3961	94.9527	3.3109	3.4869
240	97.4538	94.4657	98.6139	97.1285	93.9942	92.2200	95.6460	2.4549	2.5667
300	99.3459	99.5230	100.7972	99.3022	101.5139	101.9893	100.4119	1.1840	1.1791
								CV global	3.1449

Comparación de perfiles disolución de producto de referencia y producto de prueba en el aparato II USP

Tabla No. 10.40. Cantidad de polvo (mg) de Prod ref pesados para la elaboración de perfiles de disolución en el aparato II USP

No. de vaso	Polvo (mg)
1	101.28
2	101.22
3	101.29
4	101.00
5	100.54
6	100.62
7	100.50
8	100.71
9	100.25
10	99.70
11	100.78
12	100.28

Tabla No. 10.41. Cantidad de polvo (mg) de Prod pba pesados para la elaboración de perfiles de disolución en el aparato II USP

No. de vaso	Polvo (mg)
1	100.64
2	101.09
3	100.57
4	100.44
5	101.08
6	100.63
7	100.77
8	100.15
9	100.92
10	100.93
11	101.04
12	100.18

Tabla No. 10.42. Abs de las doce muestras de Prod ref muestreadas durante el perfil de disolución realizado en el aparato II USP												
	No. de Muestra											
Tiempo (min)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
30	0.7289	0.6918	0.7181	0.7010	0.7092	0.7068	0.7189	0.7100	0.7462	0.7649	0.6936	0.7149
60	0.8025	0.7486	0.7694	0.7932	0.8651	0.7915	0.8066	0.7749	0.7750	0.8136	0.7589	0.8137
120	0.9612	1.0189	1.0632	0.9743	0.9648	0.8944	0.9615	0.9883	0.9762	1.0168	1.0097	0.9135
180	1.0375	1.0393	1.0084	1.0646	1.0848	1.0717	0.9533	1.0773	1.0705	1.0780	1.0719	1.0623
240	1.0675	1.0928	1.1191	1.0944	1.1011	1.0931	0.9879	1.1466	1.0929	1.1401	1.1259	1.0763
360	1.1045	1.1820	1.1498	1.1786	1.1483	1.1722	1.1540	1.1082	1.1577	1.1538	1.1494	1.1312

Tabla No. 10.43. Abs de las doce muestras de Prod pba muestreadas durante el perfil de disolución realizado en el aparato II USP												
	No. de Muestra											
Tiempo (min)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
30	0.4534	0.4542	0.3514	0.4488	0.5027	0.5210	0.4586	0.5211	0.3645	0.4279	0.4289	0.4289
60	0.5152	0.5163	0.5391	0.5142	0.5213	0.6234	0.5849	0.6625	0.6545	0.6005	0.6269	0.6085
120	0.6901	0.7229	0.7317	0.6566	0.6809	0.6963	0.6456	0.7573	0.6837	0.8109	0.6168	0.7065
180	0.7937	0.7864	0.8293	0.8020	0.7884	0.9230	0.7799	0.8487	0.8103	0.8721	0.8483	0.9579
240	0.8195	0.9131	0.9383	0.9580	0.9077	0.9668	0.8977	0.9835	0.8678	0.9125	0.8327	0.9780
360	0.9784	0.9838	0.9640	1.0049	0.9726	1.0817	0.9389	1.0214	0.9658	0.9410	0.8895	0.9903

Tabla No. 10.44. Curva de calibración utilizada para la estimación de las concentraciones de los perfiles de disolución de BPB Prod ref y Prod pba

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Abs	Factor de respuesta
5.00	0.2729	0.0546
5.00	0.2679	0.0536
5.00	0.2742	0.0548
10.00	0.5444	0.0544
10.00	0.5394	0.0539
10.00	0.5369	0.0537
15.00	0.8140	0.0543
15.00	0.8240	0.0549
15.00	0.8210	0.0547
20.00	1.0905	0.0545
20.00	1.0786	0.0539
20.00	1.0866	0.0543
25.00	1.3289	0.0532
25.00	1.3394	0.0536
25.00	1.3299	0.0532
	\bar{x}	0.0541
	S	0.0006
	C.V	1.0720
	r	0.9997
	r^2	0.9994
	β_0	0.0533
	β_1	0.0098

Cinética de disolución del producto de referencia y producto de prueba

Tabla No. 10.45. Cinética de disolución de orden cero de Prod ref

Q ∞ -Q													
Tiempo (min)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Promedio
30	34.86	37.93	35.78	36.95	35.82	36.10	34.97	35.92	32.43	30.33	37.37	35.10	35.30
60	28.72	33.19	31.50	29.26	22.82	29.04	27.65	30.51	30.03	26.27	31.92	26.86	28.98
120	16.52	11.85	8.25	15.22	15.49	21.38	15.77	13.81	14.34	10.45	12.17	19.47	14.56
180	10.37	10.20	12.67	7.95	5.82	7.09	16.43	6.64	6.74	5.52	7.16	7.48	8.67
240	7.98	5.94	3.85	5.57	4.52	5.38	13.67	1.12	4.95	0.57	2.85	6.36	5.23
360	6.09	0.02	2.50	0.04	1.87	0.24	1.67	5.17	0.93	0.57	2.07	3.09	2.02
												b	32.36238
												m	-0.10042
												r	-0.91371
												r²	0.83486

Tabla No. 10.46. Cinética de disolución de orden uno de Prod ref

Ln Q ∞ -Q													
Tiempo (min)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Promedio
30	3.55	3.64	3.58	3.61	3.58	3.59	3.55	3.58	3.48	3.41	3.62	3.56	3.56
60	3.36	3.50	3.45	3.38	3.13	3.37	3.32	3.42	3.40	3.27	3.46	3.29	3.36
120	2.80	2.47	2.11	2.72	2.74	3.06	2.76	2.63	2.66	2.35	2.50	2.97	2.65
180	2.34	2.32	2.54	2.07	1.76	1.96	2.80	1.89	1.91	1.71	1.97	2.01	2.11
240	2.08	1.78	1.35	1.72	1.51	1.68	2.62	0.11	1.60	-0.55	1.05	1.85	1.40
360	1.81	-4.16	0.92	-3.28	0.62	-1.42	0.51	1.64	-0.08	-0.57	0.73	1.13	-0.18
												b	4.01902
												m	-0.01133
												r	-0.99719
												r²	0.99439

Tabla No. 10.47. Cinética de disolución de orden cero de Prod pba

Q ∞ -Q													
Tiempo (min)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Promedio
30	61.84	62.22	70.38	62.04	58.12	56.13	61.53	55.65	69.62	64.28	64.30	63.46	62.47
60	56.69	57.04	54.73	56.58	56.57	47.59	51.00	43.85	45.43	49.88	47.79	48.48	51.30
120	42.90	40.67	39.52	45.44	44.03	42.22	46.59	36.74	43.65	33.28	49.19	41.05	42.11
180	34.55	35.55	31.64	33.72	35.36	23.95	35.76	29.37	33.45	28.35	30.53	20.78	31.08
240	32.49	25.45	22.96	21.29	25.86	20.45	26.38	18.63	28.86	25.13	31.77	19.18	24.87
360	20.89	20.80	21.83	18.53	21.65	12.41	24.00	16.59	22.04	23.76	28.12	19.13	20.81
												b	59.24597
												m	-0.12407
												r	-0.94178
												r²	0.88694

Tabla No. 10.48. Cinética de disolución de orden uno de Prod pba

Ln Q ∞ -Q													
Tiempo (min)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Promedio
30	4.12	4.13	4.25	4.13	4.06	4.03	4.12	4.02	4.24	4.16	4.16	4.15	4.13
60	4.04	4.04	4.00	4.04	4.04	3.86	3.93	3.78	3.82	3.91	3.87	3.88	3.93
120	3.76	3.71	3.68	3.82	3.78	3.74	3.84	3.60	3.78	3.50	3.90	3.71	3.74
180	3.54	3.57	3.45	3.52	3.57	3.18	3.58	3.38	3.51	3.34	3.42	3.03	3.42
240	3.48	3.24	3.13	3.06	3.25	3.02	3.27	2.92	3.36	3.22	3.46	2.95	3.20
360	3.04	3.03	3.08	2.92	3.08	2.52	3.18	2.81	3.09	3.17	3.34	2.95	3.02
												b	4.14294
												m	-0.00345
												r	-0.97559
												r²	0.95178