



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

## COMPARACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE CALIDAD Y DE LIBERACIÓN *IN VITRO* DE FORMAS FARMACÉUTICAS DE MELOXICAM DE USO VETERINARIO DISPONIBLES EN EL MERCADO MEXICANO

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**SOLÍS CRUZ BRUNO**

TUTOR PRINCIPAL:

**DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO  
UNAM, FES-CAUTITLÁN**

COMITÉ TUTORAL:

**DRA. HELGI JUNG COOK  
UNAM, FACULTAD DE QUÍMICA**

**DRA. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA  
UNAM, FES-CAUTITLÁN**

MÉXICO, D. F.,

JUNIO 2014





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## RESUMEN

México, como otros países preocupado por la carga financiera que representan los servicios tanto de salud humana como en el ámbito de salud animal, ha buscado alternativas para disminuir estos costos y una alternativa ha sido la producción de medicamentos genéricos.

Sobre la base de la legislación sanitaria actual, los medicamentos de uso humano que se comercializan en nuestro país, tanto en el sector privado como en el sector salud, deben cumplir con los requisitos necesarios de calidad, seguridad y eficacia. Estas características de los medicamentos genéricos se demuestran mediante estudios de bioequivalencia que se realizan bajo las consideraciones estipuladas en la NOM-177-SSA1-2013. Sin embargo, en materia de regulación de productos farmacéuticos de uso veterinario todavía hay mucho por hacer.

En el presente trabajo se analizaron tres medicamentos de uso veterinario conteniendo Meloxicam como principio activo, utilizado como analgésico y antiinflamatorio para diversas especies animales. Se analizaron tres medicamentos cuya marca era diferente, los tres productos contenían el principio activo en la misma dosis y su uso estaba destinado a pequeñas especies.

Como no existe un criterio de selección del producto innovador o de referencia en cuanto a medicamentos de uso veterinario, se compararon todos los productos entre sí para determinar su equivalencia farmacéutica. Para ello se tomaron como base la NOM-177-SSA1-2013, la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) y la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (USP), así como diferentes normas internacionales.

Para evaluar la calidad de los productos se realizaron pruebas farmacotécnicas como la uniformidad de peso, diámetro y espesor, medición de la dureza, friabilidad, identificación del principio activo, valoración del principio activo y uniformidad de dosis. Se realizaron además los perfiles de disolución de cada producto, utilizando los Aparatos Farmacopéicos II y IV USP, con la finalidad de determinar cuál de los dos presenta un mayor poder de discriminación.

Todos los productos cumplieron satisfactoriamente con las pruebas de control de calidad, sin embargo, presentaron diferencias significativas en cuanto a su comportamiento de disolución. El Aparato IV USP resultó ser el más sensible para detectar diferencias en el comportamiento de disolución de los productos de Meloxicam evaluados.

Al realizar la caracterización fisicoquímica de los lotes de materia prima de Meloxicam con los que fueron fabricados cada uno de los productos analizados se encontraron diferencias en cuanto a la cristalinidad, comportamiento térmico y su velocidad de disolución.

## ABSTRACT

Mexico, like other countries, concerned about the financial burden of the services of both human health and the field of animal health, has sought ways to decrease these costs, an alternative has been the production of generic drugs.

Based on the current health legislation, the human medicines which are sold in our country, both in the private and the public health sector, must meet the requirements of quality, safety and efficacy. These characteristics of the generic drugs are demonstrated by bioequivalence studies carried out under the considerations specified in NOM-177-SSA1-2013. However, in the regulation of pharmaceutical products for veterinary use there is still much to do.

In the present work, three veterinary medicines containing meloxicam as active ingredient, used as an analgesic and anti-inflammatory for several animal species were analyzed. Three drugs were analysed, whose brand was different, all of them contained the active ingredient at the same dose and they were designed to be administered in small species.

Because there is no a criterion for selection of innovative or reference product for veterinary medicinal products, all products were compared among themselves to determine their pharmaceutical equivalence. For this, we based on NOM-177-SSA1-2013, the Pharmacopoeia of the United Mexican States (FEUM), the Pharmacopoeia of the United States (USP) and various international standards.

To evaluate the product quality, pharmacotechnical tests were conducted, like uniformity of mass, diameter and thickness, measurement of hardness, friability, identification of the active ingredient, assessment of the active ingredient and dose uniformity. Furthermore, the dissolution profiles of each product using the II and IV Pharmacopoeial apparatus were performed, in order to determine which of the two apparatus has a greater power of discrimination.

All the products met satisfactorily with the quality control tests, however, they showed significant differences in their dissolution behavior. The USP Apparatus IV was the most sensitive to detect differences in the dissolution behavior of Meloxicam products tested.

When the physicochemical characterization of the raw material batches of Meloxicam, with which were manufactured the products tested, was conducted, differences in crystallinity, thermal behavior and their dissolution rate were found.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	I
ABSTRACT.....	III
ÍNDICE.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABLAS .....	XI
LISTA DE GRÁFICOS .....	XIV
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS .....	XVII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVO GENERAL.....	4
OBJETIVOS PARTICULARES .....	4
III. MARCO DE REFERENCIA.....	6
1. Fase Biofarmacéutica.....	7
1.1. Etapas de la Fase Biofarmacéutica.....	7
1.1.1. Liberación del Fármaco .....	8
1.1.2. Disolución del Fármaco.....	9
1.1.3. Absorción del Fármaco.....	10
2. Aspectos Generales sobre la Disolución de Fármacos .....	12
2.1. Utilidad y Aplicaciones de las Pruebas de Disolución.....	12
3. Disolución de un Fármaco a partir de Formas Farmacéuticas Sólidas Simples Tradicionales.....	15
3.1. Factores que Afectan la Velocidad de Disolución del Fármaco en una Forma Farmacéutica Sólida.....	18
3.2. Pruebas de disolución <i>In Vitro</i> para Fármacos contenidos en diversas Formas Farmacéuticas .....	19
3.3. Características Generales de los Equipos de Disolución .....	23
3.3.1. Aparato de Disolución II (Paletas) .....	23
3.3.2. Aparato de Disolución IV (Celda de Flujo Continuo).....	25
4. Pruebas de Disolución <i>In Vitro</i> para Productos Farmacéuticos Veterinarios.....	29
4.1. Retos de las Pruebas de Liberación y Disolución <i>In Vitro</i> para Productos Farmacéuticos Veterinarios .....	30
4.1.1. Diferencias Fisiológicas Gastrointestinales.....	31
5. Bioequivalencia de Medicamentos Veterinarios .....	34
6. Validación de Métodos Analíticos.....	39

6.1. Parámetros de Validación .....	41
6.1.1. Adecuabilidad del Sistema .....	41
6.1.2. Especificidad .....	42
6.1.3. Precisión .....	42
6.1.4. Linealidad .....	43
6.1.5. Exactitud .....	44
6.1.6. Límite de Detección y Cuantificación .....	44
6.1.7. Robustez .....	45
6.1.8. Tolerancia .....	46
6.1.9. Rango .....	46
6.2. Métodos Analíticos para la Cuantificación del Meloxicam .....	47
7. Meloxicam .....	52
IV. JUSTIFICACIÓN .....	57
V. PARTE EXPERIMENTAL .....	59
1. Productos Estudiados .....	59
2. Sustancias, Reactivos y Equipo .....	60
2.1. Estándar de Referencia .....	60
2.2. Reactivos .....	61
2.3. Equipos .....	62
3. Diagrama de Flujo .....	63
4. Desarrollo Experimental .....	64
4.1. Desarrollo del Método Analítico .....	64
4.2. Validación del Método Analítico .....	64
4.2.1. Adecuabilidad del Sistema .....	64
4.2.2. Linealidad del Sistema .....	65
4.2.3. Precisión del Sistema .....	65
4.2.4. Especificidad del Método .....	66
4.2.5. Linealidad del Método .....	66
4.2.6. Precisión y Exactitud del Método .....	69
4.2.7. Repetibilidad y Reproducibilidad del Método .....	70
4.2.8. Estabilidad de la Muestra .....	70
4.2.9. Influencia del Filtro .....	71
4.3. Perfil de Solubilidad-pH del Meloxicam .....	71
4.4. Disolución Intrínseca y Aparente del Meloxicam .....	72

4.5.	Pruebas de Control de Calidad.....	73
4.5.1.	Peso Promedio.....	73
4.5.2.	Tamaño (Diámetro y Espesor).....	73
4.5.3.	Friabilidad.....	73
4.5.4.	Dureza.....	74
4.5.5.	Tiempo de Desintegración.....	74
4.5.6.	Identificación del Principio Activo .....	74
4.5.7.	Valoración del Principio Activo.....	75
4.5.8.	Uniformidad de Contenido .....	76
4.6.	Obtención de los Perfiles de Disolución .....	78
4.6.1.	Estudio de los Perfiles de Disolución en Aparato USP II (Paletas) Modificado para Pequeños Volúmenes .....	78
4.6.2.	Estudio de los Perfiles de Disolución en Aparato USP IV (Celdas de Flujo Continuo) .....	80
4.7.	Caracterización Fisicoquímica de la Materia Prima de Meloxicam .....	82
4.7.1.	Disolución Aparente del Meloxicam en Aparato IV USP.....	82
4.7.2.	Difracción de Rayos X .....	82
4.7.3.	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) .....	83
4.7.4.	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) .....	83
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	84
1.	Desarrollo del Método Analítico .....	84
1.1.	Selección de las condiciones óptimas de trabajo .....	84
2.	Validación del Método Analítico.....	90
2.1.	Adecuabilidad del Sistema .....	90
2.2.	Linealidad del Sistema .....	90
2.3.	Precisión del Sistema .....	93
2.4.	Especificidad del Método.....	94
2.5.	Linealidad del Método .....	95
2.6.	Precisión y Exactitud del Método .....	97
2.7.	Repetibilidad y Reproducibilidad del Método .....	98
2.8.	Estabilidad de la Muestra .....	101
2.9.	Influencia del Filtro.....	102
3.	Perfil de Solubilidad-pH del Meloxicam .....	103
4.	Disolución Intrínseca y Aparente del Meloxicam .....	105
5.	Análisis de los Atributos de Calidad de los Productos Bajo Estudio .....	107

5.1.	Identificación del Principio Activo .....	107
5.2.	Peso promedio .....	108
5.3.	Tamaño (Diámetro y Espesor) .....	110
5.4.	Dureza .....	113
5.5.	Friabilidad .....	114
5.6.	Tiempo de Desintegración .....	115
5.7.	Valoración del Principio Activo.....	117
5.8.	Uniformidad de Contenido.....	118
6.	Caracterización de los Perfiles de Disolución .....	121
6.1.	Estudio de los Perfiles de Disolución utilizando el Aparato II USP (Paletas Modificado para Pequeños Volúmenes .....	121
6.2.	Estudio de los Perfiles de Disolución utilizando el Aparato IV USP (Celdas de Flujo Continuo).....	129
6.3.	Comparación Estadística de los Perfiles de Disolución .....	136
7.	Caracterización Físicoquímica de la Materia Prima de Meloxicam .....	152
7.1.	Disolución Aparente del Meloxicam en Aparato IV USP .....	152
7.2.	Difracción de Rayos X .....	155
7.3.	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) .....	158
7.4.	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	159
VII.	CONCLUSIONES .....	161
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	163

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Etapas involucradas en la Fase Biofarmacéutica en relación con la actividad terapéutica del medicamento. La liberación o la disolución del fármaco contenido en la forma de dosificación pueden ser el paso limitante de la secuencia cinética. ....7
- Figura 2.** Etapas de la Fase Biofarmacéutica relacionadas con el efecto terapéutico de un medicamento y los factores generales relacionados. ....9
- Figura 3.** Esquema general de los fenómenos involucrados en los procesos de liberación y de disolución de un fármaco contenido en una forma farmacéutica sólida. Los tres procesos cinéticos son: velocidad de desintegración de la forma farmacéutica, velocidad de disolución del fármaco liberado y velocidad de absorción del mismo. Los procesos ocurren simultáneamente, con distinta intensidad cuantitativa. ....15
- Figura 4.** Interrelación limitante entre los procesos de desintegración de una forma farmacéutica sólida y la disolución del fármaco que contiene. En el primer caso, la desintegración debe ser rápida para evitar mayor retraso en la disolución del fármaco poco soluble. En el segundo caso, una inadecuada formulación de la forma sólida podría retardar el inicio de la disolución de un fármaco altamente soluble. ....17
- Figura 5.** Aparato de Disolución II USP (también llamado de paleta) y su elemento de agitación.....24
- Figura 6.** Aparato de Disolución IV USP, también llamado celda de flujo continuo.....27
- Figura 7.** Presentación comercial de los productos evaluados. ....59
- Figura 8.** Metodología seguida para evaluar la linealidad del método por adiciones patrón. Parte I.....67
- Figura 9.** Metodología seguida para evaluar la linealidad del método por adiciones patrón. Parte II.....68
- Figura 10.** Metodología seguida para evaluar la precisión y exactitud del método por adiciones patrón. Parte I.....69
- Figura 11.** Metodología seguida para evaluar la precisión y exactitud del método por adiciones patrón. Parte II. ....70
- Figura 12.** Vaso y paleta de dimensiones compendiales (Izquierda) y Vaso modificado para pequeños volúmenes con la paleta pequeña (derecha). ....78
- Figura 13.** (a) Cromatograma típico de la solución estándar de Meloxicam. (b) Cromatograma típico de la muestra de análisis de Meloxicam. ....89
- Figura 14.** Cromatogramas de la prueba de especificidad del método. (a) Solución blanco, buffer de fosfatos pH 7.5; (b) Solución estándar de Meloxicam 2.0 µg/mL; (c) Solución de Meloxicam 2.0 µg/mL preparada utilizando el producto Meloxi Pet's (S)<sup>®</sup>; (d) Solución de Meloxicam 2.0 µg/mL preparada utilizando el producto Doxo 10<sup>®</sup>; (e) Solución de Meloxicam 2.0 µg/mL preparada utilizando el producto Meloximax 1<sup>®</sup>; (f) Superposición de todos los cromatogramas. ....94

<b>Figura 15.</b> Equilibrio Prototrópico del Meloxicam.....	104
<b>Figura 16.</b> Espectro de Absorción Ultravioleta reportado en la literatura <sup>(Moffat, Osselton et al. 2004)</sup> en el intervalo 200 a 400 nm de una solución de Meloxicam (10 µg/mL).....	108
<b>Figura 17.</b> Diferencias en las dimensiones de diámetro y espesor de los diferentes productos evaluados.....	110
<b>Figura 18.</b> (a) Efecto "Coning" observado cuando se utilizó el Aparato II USP Modificado para Pequeños Volúmenes a velocidades de agitación de 75 y 100 rpm. (b) A velocidades de 150 y 190 rpm no se observa dicho efecto.....	123
<b>Figura 19.</b> Análisis visual de los comprimidos de la marca (a) Meloxi Pet's (S) <sup>®</sup> , (b) Doxo 10 <sup>®</sup> y (c) Meloximax 1 <sup>®</sup> después del ensayo de disolución utilizando el Aparato IV USP.....	131
<b>Figura 20.</b> Forma de los perfiles de disolución de los lotes de la marca Meloxi Pet's(S) <sup>®</sup> obtenidos con los Aparatos II (modificado) y IV USP.....	145
<b>Figura 21.</b> Forma de los perfiles de disolución de los lotes de la marca Doxo 10 <sup>®</sup> obtenidos con los Aparatos II (modificado) y IV USP. ....	146
<b>Figura 22.</b> Forma de los perfiles de disolución del lote de la marca Meloximax 1 <sup>®</sup> obtenidos con los Aparatos II (modificado) y IV USP.....	147
<b>Figura 23.</b> Diferencias entre los dos modelos utilizados del Aparato IV USP marca Sotax. (a) Modelo CE7Smart con bomba digital. (b) Modelo CE6 con bomba de pistones. ....	154
<b>Figura 24.</b> Patrones de Difracción de Rayos X en polvo de las materias primas de Meloxicam analizadas.....	155
<b>Figura 25.</b> Patrón de Difracción de Rayos X en polvo de (a) Meloxicam materia prima lote A1; (b) Forma polimórfica I del Meloxicam reportado en la literatura <sup>(Clavo, Coppi et al. 2003)</sup> .....	156
<b>Figura 26.</b> Patrón de Difracción de Rayos X en polvo de (a) Meloxicam materia prima lotes B1, C1 y C2; (b) Forma polimórfica III del Meloxicam reportado en la literatura <sup>(Clavo, Coppi et al. 2003)</sup> .....	156
<b>Figura 27.</b> Termogramas por DSC de los lotes de materia prima del Meloxicam analizados. .....	158
<b>Figura 28.</b> Imágenes de los lotes de materia prima de Meloxicam obtenidas mediante Microscopía Electrónica de Barrido a diferentes aumentos. ....	160

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Parámetros de validación recomendados por la VICH <sup>(VICH 1998)</sup> .....	40
<b>Tabla 2.</b> Parámetros de validación recomendados por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México <sup>(CNQFB)</sup> .....	41
<b>Tabla 3.</b> Métodos analíticos por espectrofotometría reportados para la determinación de Meloxicam. ....	48
<b>Tabla 4.</b> Método cromatográfico descrito en la USP 35 para la valoración de Meloxicam en comprimidos. ....	49
<b>Tabla 5.</b> Métodos analíticos por CLAR reportados para la determinación de Meloxicam. ....	50
<b>Tabla 6.</b> Cantidad de medicamentos veterinarios destinados a cada especie. ....	55
<b>Tabla 7.</b> Cantidad de medicamentos veterinarios por forma farmacéutica. ....	56
<b>Tabla 8.</b> Metodología empleada para la valoración de Meloxicam contenido en comprimidos de 1 mg. ....	75
<b>Tabla 9.</b> Metodología empleada para la Valoración individual de los comprimidos de Meloxicam. ....	76
<b>Tabla 11.</b> Condiciones de operación de la prueba de disolución en el Aparato USP II modificado para pequeños volúmenes. ....	79
<b>Tabla 12.</b> Condiciones de operación de la prueba de disolución en el Aparato USP IV. ....	80
<b>Tabla 12.</b> Especificaciones del Método por CLAR desarrollado. ....	88
<b>Tabla 13.</b> Resultados de la adecuabilidad del sistema. ....	90
<b>Tabla 14.</b> Resultados de la linealidad del sistema. ....	91
<b>Tabla 15.</b> Parámetros estadísticos obtenidos del análisis de regresión para determinar la linealidad del sistema. ....	91
<b>Tabla 16.</b> Resultados de la precisión del sistema. ....	93
<b>Tabla 17.</b> Concentraciones adicionadas, concentraciones recuperadas y porcentajes de recobro de los cinco niveles de concentración de Meloxicam utilizados para evaluar la linealidad del método. ....	95
<b>Tabla 18.</b> Parámetros estadísticos del análisis de regresión para determinar la linealidad del método. ....	96
<b>Tabla 19.</b> Porcentajes de recobro obtenidos para evaluar la precisión y exactitud del método. ....	97
<b>Tabla 20.</b> Parámetros estadísticos del análisis de regresión para determinar la exactitud del método. ....	97
<b>Tabla 21.</b> Parámetros determinados para evaluar la precisión del método. ....	98
<b>Tabla 22.</b> Resultados de los porcentajes de recobro obtenidos para evaluar la repetibilidad y reproducibilidad del método. ....	99
<b>Tabla 23.</b> Análisis de Varianza Anidado para evaluar la repetibilidad y reproducibilidad del método considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ . ....	100

<b>Tabla 24.</b> Estabilidad de una solución de Meloxicam (2.0 µg/mL) a temperatura ambiente y a 37°C. ....	101
<b>Tabla 25.</b> Análisis de Varianza para evaluar la estabilidad de las muestras de Meloxicam a diferentes temperaturas considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ . ....	101
<b>Tabla 26.</b> Resultados del Área de Pico Cromatográfico utilizando los dos tipos de filtro con tres niveles de concentración de Meloxicam: 0.1, 1.0 y 2.0 µg/mL. ....	102
<b>Tabla 27.</b> Valores promedio de la Solubilidad acuosa del Meloxicam a diferentes valores de pH, (n=3). ....	103
<b>Tabla 28.</b> Constante de Velocidad de Disolución Intrínseca del Meloxicam en diferentes Medios de Disolución (Promedio $\pm$ DE, n=3). ....	105
<b>Tabla 29.</b> Variación de peso de los comprimidos de Meloxicam evaluadas. ....	109
<b>Tabla 30.</b> Evaluación del diámetro de los comprimidos de Meloxicam. ....	111
<b>Tabla 31.</b> Evaluación del espesor de los comprimidos de Meloxicam. ....	111
<b>Tabla 32.</b> Evaluación de la dureza de los comprimidos de Meloxicam. ....	113
<b>Tabla 33.</b> Porcentaje de Friabilidad de los comprimidos de Meloxicam. ....	114
<b>Tabla 34.</b> Tiempo de desintegración en minutos de los comprimidos de Meloxicam. ....	115
<b>Tabla 35.</b> Resultados de la valoración del principio activo de los comprimidos de Meloxicam analizados. ....	117
<b>Tabla 36.</b> Porcentaje de Meloxicam en cada uno de los comprimidos analizados para evaluar la Uniformidad de Contenido. ....	118
<b>Tabla 37.</b> Valores de Aceptación para evaluar la uniformidad de contenido, calculados para cada uno de los productos y lotes analizados. ....	119
<b>Tabla 38.</b> Impacto del tamaño de partícula sobre las características del producto <sup>(Martinez, Augsburg et al. 2002)</sup> . ....	120
<b>Tabla 39.</b> Promedio de la relación ( $\theta_{Prom}$ ) y Factor de Similitud ( $f_2$ ) del porcentaje disuelto entre el Aparato II USP Modificado para Pequeños Volúmenes y el Aparato II USP sin modificaciones a diferentes velocidades de agitación. ....	124
<b>Tabla 40.</b> Valores promedio del porcentaje de Meloxicam disuelto de los productos evaluados utilizando el Aparato II USP modificado para pequeños volúmenes (n =6). ....	125
<b>Tabla 41.</b> Valores promedio del porcentaje de Meloxicam disuelto de los productos evaluados utilizando el Aparato IV USP (n =6). ....	129
<b>Tabla 42.</b> Valores promedio del porcentaje de Meloxicam disuelto de los productos evaluados utilizando el Aparato IV USP utilizando buffer pH 1.2 durante 30 minutos y buffer pH 7.5 durante 60 minutos (n =6). ....	133
<b>Tabla 43.</b> Valores de $f_2$ obtenidos de la comparación de todos los productos y lotes evaluados utilizando el Aparato II USP (modificado). Las columnas indican el producto considerado el medicamento de referencia y las filas el medicamento de prueba. ....	137

<b>Tabla 44.</b> Valores de $f_2$ obtenidos de la comparación de todos los productos y lotes evaluados utilizando el Aparato IV USP. Las columnas indican el producto considerado el medicamento de referencia y las filas el medicamento de prueba.....	138
<b>Tabla 45.</b> Valores promedio del Área Bajo la Curva, Eficiencia de Disolución y Tiempo Medio de Disolución obtenidos a partir de los perfiles de disolución de los productos evaluados en el Aparato II USP (modificado para pequeños volúmenes).....	139
<b>Tabla 46.</b> Valores promedio del Área Bajo la Curva, Eficiencia de Disolución y Tiempo Medio de Disolución obtenidos a partir de los perfiles de disolución de los productos evaluados en el Aparato IV USP. ....	139
<b>Tabla 47.</b> Análisis de Varianza para la comparación del Área Bajo la Curva (ABC) de los perfiles de disolución de los productos analizados en los Aparato II (modificado) y IV USP. ....	140
<b>Tabla 48.</b> Análisis de Varianza para la comparación de la Eficiencia de Disolución (ED) en los perfiles de disolución de los productos analizados en los Aparato II (modificado) y IV USP.....	140
<b>Tabla 49.</b> Análisis de Varianza para la comparación del Tiempo Medio de Disolución (TMD) de los perfiles de disolución de los productos analizados en los Aparato II (modificado) y IV USP. ....	140
<b>Tabla 50.</b> Criterios calculados para la selección del mejor modelo cinético de disolución. ....	143
<b>Tabla 51.</b> Valores de los parámetros estimados con el modelo de Weibull calculados a partir de los datos de disolución de los productos analizados en los Aparatos II (modificado) y IV USP (Promedio $\pm$ DE, n=6). ....	144
<b>Tabla 52.</b> Porcentaje de variación explicado por los primeros cinco PC.....	149

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Espectro de Absorción en el intervalo 200 – 400 nm para una solución de Meloxicam (10 µg/mL) en diferentes medios. ....	85
<b>Gráfico 2.</b> Respuesta analítica (Área de pico) obtenida con diferentes volúmenes de inyección de una solución estándar de Meloxicam a tres niveles de concentración. ...	86
<b>Gráfico 3.</b> Curva de calibración de Meloxicam en diferente medio de disolución.....	87
<b>Gráfico 4.</b> Intervalos de confianza de la pendiente de las diferentes curvas de calibración para evaluar la influencia del medio en que se encontraba soluble la muestra de Meloxicam analizada. ....	87
<b>Gráfico 5.</b> Curva de calibración de Meloxicam para evaluar la linealidad del sistema.....	92
<b>Gráfico 6.</b> Concentración adicionada y recuperada de Meloxicam en cinco niveles de concentración mediante el método de adiciones patrón para evaluar linealidad del método. ....	96
<b>Gráfico 7.</b> Perfil de pH-Solubilidad del Meloxicam, (Promedio ± DE, n=3). ....	103
<b>Gráfico 8.</b> Velocidad de Disolución Intrínseca del Meloxicam a diferentes valores de pH (Promedio ± DE, n=3). ....	105
<b>Gráfico 9.</b> Velocidad de Disolución Aparente del Meloxicam a diferentes valores de pH (Promedio ± DE, n=3). ....	106
<b>Gráfico 10.</b> Espectro de Absorción Ultravioleta en el intervalo 200 – 400 nm de una solución de Meloxicam (10 µg/mL) y de los productos evaluados. ....	108
<b>Gráfico 11.</b> Valores promedio del peso de los comprimidos de las diferentes marcas y lotes evaluados, (DE, n=20). ....	110
<b>Gráfico 12.</b> Valores promedio del diámetro y espesor de los comprimidos de las diferentes marcas y lotes evaluados (Promedio ± DE, n=20).....	112
<b>Gráfico 13.</b> Valores promedio y desviación estándar de la dureza de los comprimidos de las diferentes marcas y lotes evaluados, (DE, n=10). ....	113
<b>Gráfico 14.</b> Evaluación de la friabilidad los comprimidos de las diferentes marcas y lotes evaluados (n=10). La línea punteada indica el criterio máximo de aceptación. ....	114
<b>Gráfico 15.</b> Tiempo de desintegración los comprimidos de las diferentes marcas y lotes evaluados (n=6). La línea punteada indica el criterio máximo de aceptación. ....	115
<b>Gráfico 16.</b> Valoración de principio activo de los comprimidos de las diferentes marcas y lotes evaluados. Las líneas punteadas de color rojo indican los límites de aceptación farmacopéicos <sup>(USP 35 2012)</sup> . ....	117
<b>Gráfico 17.</b> Perfiles de Disolución de comprimidos de Meloxicam lote MP186 obtenidos con el Aparato II USP sin modificaciones (Sin Mod) y modificado para pequeños volúmenes (Mod), con diferentes volúmenes de medio de disolución y velocidades de agitación (Promedio ± DE, n=3). ....	122

<b>Gráfico 18.</b> Perfiles de Disolución de los comprimidos de Meloxicam (1 mg) analizados, en buffer de fosfatos pH 7.5 utilizando el Aparato II USP modificado para pequeños volúmenes (Promedio $\pm$ DE, n=6). Las líneas punteadas indican la especificación de Q requerida en la monografía farmacopéica.....	126
<b>Gráfico 19.</b> Perfiles de Disolución de los comprimidos de la marca Meloxi Pet's (S) <sup>®</sup> , en buffer de fosfatos pH 7.5 utilizando el Aparato II USP modificado para pequeños volúmenes (Promedio $\pm$ DE, n=6). .....	127
<b>Gráfico 20.</b> Perfiles de Disolución de los comprimidos de la marca Doxo 10 <sup>®</sup> , en buffer de fosfatos pH 7.5 utilizando el Aparato II USP modificado para pequeños volúmenes (Promedio $\pm$ DE, n=6). .....	128
<b>Gráfico 21.</b> Perfil de Disolución de comprimidos de la marca Meloximax 1 <sup>®</sup> , en buffer de fosfatos pH 7.5 utilizando el Aparato II USP modificado para pequeños volúmenes (Promedio $\pm$ DE, n=6). .....	128
<b>Gráfico 22.</b> Perfiles de Disolución de los comprimidos de Meloxicam (1 mg) analizados, en buffer de fosfatos pH 7.5 utilizando el Aparato IV USP (Promedio $\pm$ DE, n=6). Las líneas punteadas indican la especificación de Q requerida en la monografía farmacopéica.....	129
<b>Gráfico 23.</b> Perfiles de Disolución de los comprimidos de la marca Meloxi Pet's (S) <sup>®</sup> , en buffer de fosfatos pH 7.5 utilizando el Aparato IV USP (Promedio $\pm$ DE, n=6). .....	132
<b>Gráfico 24.</b> Perfiles de Disolución de los comprimidos de la marca Doxo 10 <sup>®</sup> , en buffer de fosfatos pH 7.5 utilizando el Aparato IV USP (Promedio $\pm$ DE, n=6).....	132
<b>Gráfico 25.</b> Perfil de Disolución de comprimidos de la marca Meloximax 1 <sup>®</sup> , en buffer de fosfatos pH 7.5 utilizando el Aparato IV USP (Promedio $\pm$ DE, n=6).....	133
<b>Gráfico 26.</b> Perfiles de Disolución de los comprimidos de Meloxicam (1 mg) analizados, en buffer pH 1.2 durante 30 minutos y buffer pH 7.5 durante 60 minutos, utilizando el Aparato IV USP (Promedio $\pm$ DE, n=6). .....	134
<b>Gráfico 27.</b> Valores del Factor de Similitud ( $f_2$ ) calculados con los datos generados en los Aparatos II y IV USP a partir de la disolución de Meloxicam de los productos analizados. La línea punteada indica el criterio de decisión del Factor de Similitud. 138	
<b>Gráfico 28.</b> Intervalos de Confianza utilizando el método de Intervalos de Confianza con Desviación Estándar Individual para el Área Bajo la Curva (ABC) de los perfiles de disolución de los productos analizados en los Aparato II y IV USP ( $\alpha=0.05$ , n=6)...	141
<b>Gráfico 29.</b> Intervalos de Confianza utilizando el método de Intervalos de Confianza con Desviación Estándar Individual para la Eficiencia de Disolución (ED) en los perfiles de disolución de los productos analizados en los Aparato II y IV USP ( $\alpha=0.05$ , n=6). .....	141
<b>Gráfico 30.</b> Intervalos de Confianza utilizando el método de Intervalos de Confianza con Desviación Estándar Individual para el Tiempo Medio de Disolución (TMD) de los perfiles de disolución de los productos analizados en los Aparato II y IV USP ( $\alpha=0.05$ , n=6).....	142

<b>Gráfico 31.</b> Intervalos de Confianza utilizando el método de Intervalos de Confianza con Desviación Estándar Individual para el Factor de Forma ( $\beta$ ) de los perfiles de disolución de los productos analizados en los Aparato II y IV USP ( $\alpha=0.05$ , $n=6$ )...147	
<b>Gráfico 32.</b> Intervalos de Confianza utilizando el método de Intervalos de Confianza con Desviación Estándar Individual para el Tiempo de Disolución ( $T_d$ ) de los perfiles de disolución de los productos analizados en los Aparato II y IV USP ( $\alpha=0.05$ , $n=6$ )...148	
<b>Gráfico 33.</b> Gráficos de scores obtenidos mediante el PCA para la comparación de los perfiles de disolución obtenidos con el Aparato II USP (modificado para pequeños volúmenes).....150	
<b>Gráfico 34.</b> Gráficos de scores obtenidos mediante el PCA para la comparación de los perfiles de disolución obtenidos con el Aparato IV USP. ....150	
<b>Gráfico 35.</b> Velocidad de Disolución Aparente de las materias primas de Meloxicam obtenidos con el Aparato IV USP (Promedio $\pm$ DE, $n=3$ ).....152	
<b>Gráfico 36.</b> Intervalos de Confianza utilizando el método de Intervalos de Confianza con Desviación Estándar Individual para los valores del % de Meloxicam disuelto a los 30 minutos de los lotes de Materia Prima A1, B1, C1 y C2 ( $\alpha=0.05$ , $n=3$ ).....153	

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

A1	Estándar de Referencia del Meloxicam Lote CML20110307
ABC	Área Bajo la Curva
AIC	Criterio de Información de Akaike
AINE	Antiinflamatorio No Esteroideo
ANOVA	Análisis de Varianza
b	Intercepto
B1	Materia Prima de Meloxicam Lote 1208000124
C1	Materia Prima de Meloxicam Lote MP-0S1-09
cm	Centímetros
Cmáx	Concentración Máxima
CNQFB	Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A.C.
CV	Coeficiente de Variación
CVMP	Committee for Medicinal Products for Veterinary Use
D1	Materia Prima de Meloxicam Lote ALC/MLX/111206
D2	Materia Prima de Meloxicam Lote ALG/MLX/111101
DE	Desviación Estándar
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
DX008	Producto de la marca Doxo 10® Lote V855JN008
DX009	Producto de la marca Doxo 10® Lote V855KN009
ED	Eficiencia de Disolución
EMA	European Medicines Agency
f2	Factor de Similitud
FDA	Food and Drug Administration
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
k	Constante de Velocidad de Disolución
K'	Factor de Capacidad
m	Pendiente
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MM170	Producto de la marca Meloximax 1® Lote F-12170
MP186	Producto de la marca Meloxi Pet's (S)® Lote 126186
MP375	Producto de la marca Meloxi Pet's (S)® Lote 1111375

MP391	Producto de la marca Meloxi Pet's (S) <sup>®</sup> Lote 1212391
MSC	Criterio de Selección del Modelo
N	Normalidad
nm	Nanómetros
NOM	Norma Oficial Mexicana
NPT	Número de Platos Teóricos
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
PC	Componente Principal
PCA	Análisis de Componentes Principales
pKa	Logaritmo negativo de la Constante de Disociación Ácida
$r^2$	Coefficiente de Determinación
$r^2_{\text{Ajust}}$	Coefficiente de Determinación Ajustado
rpm	Revoluciones por minuto
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SCB	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
Std	Estándar
t	Tiempo
T	Factor de Coleo
TMD	Tiempo Medio de Disolución
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
UV	Ultravioleta
VICH	International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products
$\mu\text{g}$	Microgramos
$\mu\text{L}$	Microlitros
$\mu\text{m}$	Micrometros

## I. INTRODUCCIÓN

Ya en el siglo VI a.C., Theophrastus observó que la calidad de las sustancias de origen vegetal, empleadas con fines medicinales, estaba en relación con el origen geográfico, variedad, edad y parte de la planta utilizada como remedio. No obstante, a principios del siglo XIX, el concepto de calidad de un medicamento se limitaba a la identificación fisicoquímica de algunas sustancias<sup>(Lasagna 1969)</sup>.

En 1938, a raíz de la muerte de varias personas debido al empleo de dietilenglicol como disolvente para un elíxir de sulfanilamida, se generó en EUA la primera legislación específica sobre seguridad de medicamentos<sup>(Glasser 1987, Ritschel 1987)</sup>. Años después, otro grave problema, derivado del uso de la talidomida, obligó a la revisión y establecimiento de una nueva legislación respecto a la seguridad y eficacia de los medicamentos.

Durante años anteriores a la década de los 60, pero particularmente durante ésta, se observaron variaciones en la respuesta clínica a un mismo fármaco, cuando se administraba a través de medicamentos provenientes de dos o más fabricantes distintos. En el inicio de la década de los 70, este fenómeno de bioequivalencia clínica fue reconocido por compendios y agencias regulatorias (oficiales) en EUA<sup>(Osol and Hoover 1975)</sup>. En Enero de 1977, y posteriormente, en Julio de 1981 se publicaron en el Federal Register de EUA, los requerimientos de Biodisponibilidad y Bioequivalencia para medicamentos<sup>(Code of Federal Regulations Title 21 1992)</sup>. Legislaciones semejantes existen a la fecha en Canadá, Francia, Holanda, Bélgica y otros países de la Unión Europea. En México, esta legislación existe desde 1998, aunque menos detallada en comparación a la de otras naciones<sup>(SSA 1990)</sup>.

Un medicamento veterinario corresponde a toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales. Se consideran también medicamentos veterinarios todas las composiciones que puedan administrarse al animal con el fin de establecer un diagnóstico médico o de restablecer, corregir o modificar las funciones fisiológicas del animal<sup>(Europea 2001)</sup>. Cuando un producto farmacéutico es aprobado para su uso veterinario, se debe

confirmar su efectividad y seguridad para cada especie animal incluida en la etiqueta del producto<sup>(FD&C 2006)</sup>.

Un medicamento está compuesto por principios activos y excipientes. Un principio activo corresponde a la sustancia o mezcla de ellas responsables del efecto farmacológico específico, o bien, que sin poseer actividad farmacológica, al ser administrada al organismo adquiere dicha propiedad. Los excipientes corresponden a cualquier materia prima utilizada en la manufactura de los medicamentos. Comúnmente, los medicamentos se comercializan como formas farmacéuticas, correspondiendo éstas al estado físico o forma en la cual se presenta un medicamento para facilitar su fraccionamiento, dosificación o empleo.

El rol que cumplen los excipientes en la forma farmacéutica, entre otros, es determinar el comportamiento farmacocinético del principio activo en términos de absorción, es decir, puede determinar el grado de disolución del principio activo desde la forma farmacéutica<sup>(González-Canga, Sahagún-Prieto et al. 2009)</sup>, entre otras consecuencias. Si el excipiente no permite la liberación del principio activo, éste verá su efecto terapéutico limitado o incluso anulado, haciendo la terapia inefectiva, persistiendo el cuadro clínico e incluso agravándolo. Por el contrario, es posible que la liberación del principio activo sea más rápida que la esperada, existiendo el riesgo que su concentración en plasma sea superior al rango terapéutico<sup>(Toutain and Bousquet-MéLou 2004)</sup>, causando intoxicaciones con un curso clínico aún más complicado que la patología original.

Así como desde el punto de vista farmacológico, es importante contar con agentes terapéuticos eficaces que no establezcan al mismo tiempo riesgos innecesarios y tengan un mínimo de efectos secundarios, desde el punto de vista biofarmacéutico y farmacoterapéutico, una vez que ese principio activo ha sido formulado en una forma farmacéutica, ésta debe permitir la liberación del mismo hacia el sitio de acción en una cantidad y a una velocidad adecuadas para lograr la respuesta farmacológica deseada, es decir, sin manifestaciones de ineficacia o de toxicidad. Esta idea es el fundamento del concepto denominado biodisponibilidad de un principio activo a partir de la forma farmacéutica.

La biodisponibilidad de un fármaco corresponde a la velocidad y cantidad total de principio activo que llega a la circulación general y, por lo tanto, al receptor a partir de la forma farmacéutica administrada<sup>(CPMP 2001)</sup>. La información de los estudios de biodisponibilidad para un determinado principio activo proporciona una estimación de la fracción de la dosis administrada que alcanza la circulación sistémica al compararla con otras formas de administración del mismo principio activo. Provee información relacionada con el efecto de los nutrientes en la absorción del fármaco y el tipo de cinética que tiene el mismo, pudiendo ser ésta saturable o no<sup>(FDA 2003)</sup>. En estos estudios, la fisiología del animal (edad, sexo, ingesta de alimentos) y las posibles patologías (sistemas afectados, severidad) toman importancia al ser factores que pueden afectar la biodisponibilidad de un fármaco.

Actualmente, se han establecido cuatro criterios de calidad que debe cumplir todo medicamento, sea de uso humano o de uso veterinario: identificación del principio activo, cuantificación del mismo, pureza de los componentes y seguridad del medicamento; durante el período útil o fecha de caducidad del medicamento. Aunado a esto, y debido al gran avance en las disciplinas farmacéuticas aplicadas para el óptimo cuidado de la salud, el objetivo es que todo medicamento, durante su período útil, conserve su Calidad Biofarmacéutica es decir, que sea un medicamento seguro, eficaz y con una biodisponibilidad adecuada, de acuerdo con su acción farmacológica.

## II. OBJETIVO GENERAL

Evaluar las propiedades de calidad y de liberación *in vitro* de formas farmacéuticas de Meloxicam de uso veterinario disponibles en el mercado mexicano para determinar cuáles pueden ser considerados equivalentes farmacéuticos.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Desarrollar y validar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para cuantificar Meloxicam en las diferentes formas farmacéuticas que pueda ser utilizado para realizar las evaluaciones de calidad, de liberación y disolución.
- Realizar las evaluaciones correspondientes a las propiedades de calidad de los productos evaluados, identificación del principio activo, uniformidad de peso, dureza, friabilidad, desintegración, contenido químico y uniformidad de contenido.
- Determinar la constante de velocidad de disolución intrínseca del Meloxicam en diferentes medios de disolución utilizando el Aparato de Wood, así como la velocidad de disolución aparente del Meloxicam en diferentes medios de disolución utilizando la celda para polvos en el Aparato IV USP.
- Optimizar las condiciones de operación de los métodos de disolución para evaluar la liberación y disolución *in vitro* del Meloxicam contenido en las diferentes formas farmacéuticas utilizando los Aparatos II y IV USP.

- Realizar el Estudio de Disolución aparente con las formas farmacéuticas para obtener sus perfiles de disolución con los Aparatos II y IV USP y realizar la comparación mediante diferentes pruebas estadísticas.
- Realizar la caracterización fisicoquímica de la materia prima de Meloxicam con la que fueron fabricados los productos evaluados para determinar si existen diferencias polimórficas, en el hábito cristalino, tamaño de partícula o grado de hidratación.

### III. MARCO DE REFERENCIA

Los medicamentos genéricos son formulaciones del mismo principio activo con un precio inferior a los medicamentos “innovadores” que ya no están protegidos por derechos de patente, siendo ésta la principal justificación de su existencia.

La seguridad y eficacia de un nuevo medicamento está sustentada en los Estudios Preclínicos y Clínicos. Los medicamentos innovadores realizan esta investigación clínica y básica, la cual es muy costosa y prolongada. La investigación básica y/o preclínica se desarrolla en laboratorios de investigación con el objetivo de elucidar mecanismo de acción, eficacia y efectos adversos, en especial durante el embarazo y lactancia en embriones, fetos y descendencia en diversos modelos animales, así como la investigación en líneas celulares *in vitro*. Por otro lado, la investigación clínica se enfoca al comportamiento del fármaco en el humano, como lo es la evaluación de la absorción, determinación de los niveles en sangre, su eliminación y metabolismo, determinación de la dosis, así como su eficacia en pacientes localizados en diversos centros de investigación distribuidos en el mundo, así como la recopilación cuidadosa de los efectos adversos documentados a nivel internacional.

En el caso de los medicamentos genéricos solo requieren demostrar que su formulación es segura y eficaz al comparar que el perfil farmacocinético es similar estadísticamente respecto al innovador, para ello se realizan los estudios de Bioequivalencia. Lo anterior basado en que el laboratorio que cuenta con el registro del medicamento innovador ya ha demostrado la eficacia y seguridad de la molécula como tal, siendo la única variante la formulación del medicamento genérico.

## 1. Fase Biofarmacéutica

Esta fase es la primera de las todas aquellas que conducen al efecto terapéutico. Esta etapa es crítica para el desarrollo de las etapas farmacocinética y farmacodinámica ya que, aunque estas fases están en función básicamente de la interacción entre el fármaco y el organismo, la correcta administración del principio activo en función de sus características fisicoquímicas, cantidad, velocidad y periodicidad, permitirán la adecuada modulación de la actividad, y por tanto, la respuesta terapéutica adecuada en el organismo.

Lo anterior puede lograrse sólo si la vía de administración, la forma farmacéutica y el régimen de dosificación son adecuados. Es decir, estos son los tres factores susceptibles de ser controlados tanto por el farmacéutico formulador y fabricante de medicamentos como por el farmacéutico clínico, según sea el caso.

### 1.1. Etapas de la Fase Biofarmacéutica

Para que un fármaco sea absorbido, llegue a circulación general y eventualmente a su sitio de acción, debe estar como fármaco libre disuelto. Así, la fase biofarmacéutica puede ser descrita por tres etapas: liberación, disolución y absorción del principio activo.



**Figura 1.** Etapas involucradas en la Fase Biofarmacéutica en relación con la actividad terapéutica del medicamento. La liberación o la disolución del fármaco contenido en la forma de dosificación pueden ser el paso limitante de la secuencia cinética.

### 1.1.1. Liberación del Fármaco

La liberación del fármaco consiste en que los excipientes contenidos en la forma farmacéutica, no interfieran en el proceso de entrega o paso del fármaco hacia los fluidos biológicos del sitio en que fue depositado el medicamento. Por tanto, la liberación puede ser más o menos compleja según el tipo de forma farmacéutica y lugar de administración<sup>(Aulton 2004)</sup>.

La liberación del fármaco se efectúa bajo la influencia del medio biológico y de las condiciones mecánicas del lugar de administración. Como el tipo y volumen de fluidos, peristaltismo intestinal y movimiento muscular, entre otras.

Los factores de formulación del medicamento que pueden interferir o favorecer la liberación del principio activo contenido en el medicamento son variados y deben ser correctamente empleados por un buen farmacéutico formulador.

La liberación puede ser un proceso complejo que puede incluir etapas de desintegración, disgregación o fusión de la forma farmacéutica, con posterior disolución y difusión de las moléculas solubilizadas, a través del vehículo (excipientes) hacia el medio externo: fluidos biológicos *in vivo*, o medio de disolución *in vitro*. Cuando un medicamento está formulado de tal modo que la afinidad del fármaco por el vehículo es mayor en comparación a su afinidad a los fluidos biológicos, o no se favorece la desintegración de la forma de dosificación, la liberación de las moléculas de fármaco hacia el medio externo, es deficiente.

La etapa de liberación del fármaco a partir de la forma farmacéutica en que está contenido, debe ser rápida y completa, a fin de favorecer el inicio e intensidad del efecto terapéutico planeados. La excepción a lo anterior, es el caso de los medicamentos diseñados específicamente para la liberación modificada o controlada del principio activo.

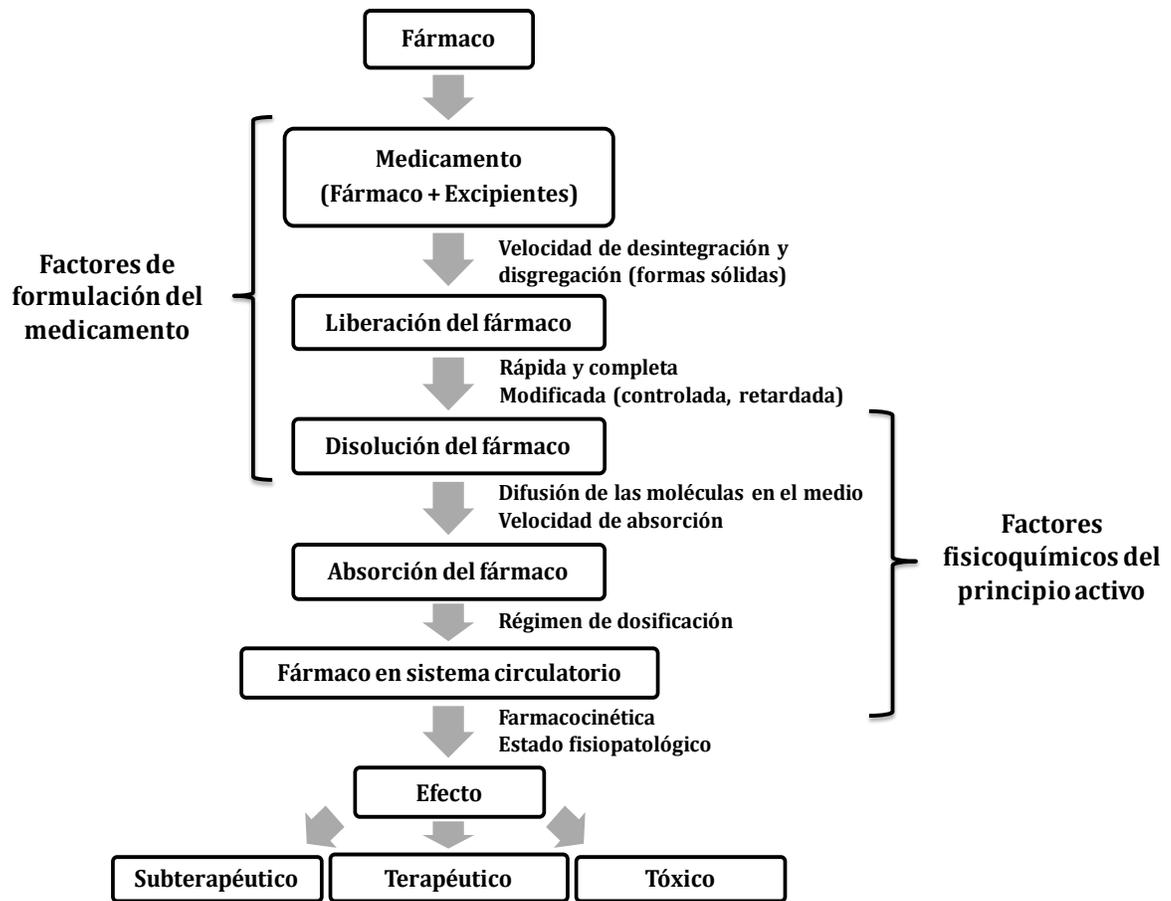


Figura 2. Etapas de la Fase Biofarmacéutica relacionadas con el efecto terapéutico de un medicamento y los factores generales relacionados.

### 1.1.2. Disolución del Fármaco

Para que un fármaco pueda ejercer su efecto, debe encontrarse en estado molecular libre y disuelto. Cuando un fármaco tiene baja disolución intrínseca (por sus propias características), la disolución es el paso limitante o más lento de la cadena de eventos cinéticos. Debe recordarse que el fenómeno de disolución de un fármaco *in vivo* es un fenómeno un tanto complejo e interesante, ya que está en función del pH del medio, tamaño de partícula, estado cristalino, etc. <sup>(Aulton 2004)</sup>.

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 caso de la disolución sólido en líquido, el producto a disolver (sólido) pasa al disolvente para dar origen a una solución (dispersión molecular homogénea). Lo anterior involucra una transferencia de masa o materia, generalmente a través de un proceso de difusión. 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 el sólido y el líquido<sup>(Hanson 1991)</sup>. El aspecto cuantitativo del fenómeno, se expresa a través de modelos matemáticos que incluyen una constante de velocidad de disolución.

La cuantificación de los cambios de concentración del soluto en la solución respecto al tiempo, representa un proceso cinético denominado “velocidad de disolución”. Este proceso está caracterizado por una constante de velocidad que puede ser de orden diverso (cero, primero o segundo), según el modelo o tipo de cinética que se haya presentado.

### 1.1.3. Absorción del Fármaco

El proceso de absorción del principio activo constituye el final de la fase biofarmacéutica y el principio de la fase farmacocinética. Algunos autores<sup>(Aiache, Devisasaguet et al. 1983)</sup> consideran que “la absorción es la verdadera entrada del principio activo en el organismo”. La absorción del fármaco está en función de tres grupos de variables:

A. Propiedades fisicoquímicas intrínsecas del fármaco, principalmente:

- Su solubilidad en el medio o fluido que irriga la membrana
- Sus características de absorbabilidad, es decir, su potencial para ser absorbido
- La absorbabilidad de un fármaco es función de sus características fisicoquímicas propias o intrínsecas como son: coeficiente de reparto entre la membrana y el medio que la rodea, grado de disociación molecular (pK) del fármaco y pH del medio circundante, tamaño molecular, estabilidad fisicoquímica en el medio.

- B. Factores biofarmacéuticos: liberación y disolución, que en un momento dado pueden ser las limitantes, puesto que no se puede absorber más principio activo que aquel liberado y disuelto a partir de la forma farmacéutica.
- C. Factores fisiopatológicos del sitio de aplicación del medicamento como pueden ser entre otros: inestabilidad del fármaco a ese pH fisiológico, presencia o ausencia de enzimas capaces de biotransformar el principio activo, grado de irrigación sanguínea, etc. (Hernández-Herrero, Moreno-Gonzalez et al. 2010).

## 2. Aspectos Generales sobre la Disolución de Fármacos

El efecto terapéutico de un medicamento es la suma de dos aspectos o factores complementarios: la calidad biofarmacéutica uniforme y reproducible del producto y el estado fisiopatológico del organismo que lo recibe.

Para cuantificar la relación anterior, se requieren indicadores que correlacionen estudios del medicamento *in vitro* con resultados, sea de biodisponibilidad o de efecto farmacológico. En la actualidad se tienen pocos estudios de correlación en comparación a la gran cantidad de agentes terapéuticos existentes. En esto han influido muchos factores: éticos, económicos, de tecnología (técnicas analíticas, diversidad de equipos para disolución) y diseño experimental, entre otros.

Sin embargo, desde hace muchos años se ha intentado establecer correlaciones directas entre los resultados de pruebas *in vitro* aplicadas a los medicamentos, respecto al comportamiento o resultado terapéutico de los mismos.

En la actualidad se hacen necesarios los estudios de liberación *in vitro* en las etapas de Investigación-Desarrollo y control de calidad de medicamentos; en esta fase se realizan los perfiles de disolución y se obtienen las curvas de porcentaje de liberación contra tiempo las cuales deben ser similares a las curvas obtenidas para los correspondientes medicamentos innovadores cuya eficacia y seguridad ha sido demostrada<sup>(FID 1995, FDA 1997)</sup>.

### 2.1. Utilidad y Aplicaciones de las Pruebas de Disolución

Actualmente las pruebas de disolución farmacopéicas pueden ser aplicadas tanto para formas farmacéuticas sólidas, ya sean unidosis o de liberación modificada, como para sistemas de entrega novedosos como los oculares y transdérmicos. Lo anterior, con el objetivo primario de asegurar de modo reproducible, un adecuado perfil de liberación del

fármaco *in vitro*, como un punto de partida estándar para el tratamiento médico del paciente.

Las pruebas de disolución se han convertido en una muy importante herramienta en el ámbito farmacéutico, esto ha sido en base al hecho de que para que un fármaco se absorba y se encuentre biodisponible en la circulación sistémica, previamente debe ser solubilizado.

La prueba de disolución de un fármaco a partir de la forma farmacéutica o sistema de entrega que lo contiene, establece la denominada “velocidad aparente de disolución” (a diferencia de la velocidad de disolución intrínseca del fármaco puro), y es importante desde varios puntos de vista:

- **Como prueba fisicoquímica rutinaria de control de calidad**

Es un indicador sencillo y eficaz de las Buenas Prácticas de Manufactura (GMP's). La prueba de disolución puede indicar, en un momento dado, si la materia prima, o el proceso de producción están fuera de control.

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 un solo punto o dato, que no proporciona por lo tanto, una idea del proceso global de disolución a través del tiempo. Por el contrario, un perfil completo de disolución a través del tiempo, 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.

- **Como indicador durante los estudios de desarrollo del producto**

Como indicador durante los estudios de desarrollo del fármaco (disolución intrínseca), de la forma farmacéutica tradicional, o de un sistema de entrega novedoso. En estos estudios se determina o se evalúa la posible interferencia de los excipientes o del método de

manufactura, sobre la liberación y disolución del principio activo a partir de la forma farmacéutica (disolución aparente).

Una vez optimizado el producto, se debe verificar experimentalmente que sus características de disolución aparente no se alteran durante su periodo útil (fecha de caducidad). En estos casos, es imprescindible establecer el “perfil de disolución aparente del fármaco”, es decir, un plan de muestreo de fármaco disuelto con intervalos cortos y durante un periodo total que permita la cuantificación del 100% de la dosis contenida en la forma de dosificación. La información obtenida y la utilidad potencial de los datos son muy amplias.

- **Como indicadores 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 la bioequivalencia de productos genéricos. El gran volumen de información generada durante los estudios de formulación, podría ser un banco de datos muy útil para las autoridades sanitarias, en relación con la aprobación con pruebas *in vitro* y bioexenciones, de productos genéricos.

- **Como tema de investigación y posible inclusión en farmacopea**

En países como Norteamérica y los pertenecientes a la Unión Europea, las pruebas de disolución de productos farmacéuticos veterinarios se utilizan con los mismos fines de los productos farmacéuticos de uso humano ya mencionados<sup>(EMA 2011)</sup>. En México, las pruebas de disolución podrían ser empleadas para productos que actualmente no están sujetos a la norma de disolución farmacopéica, tal es el caso de los productos farmacéuticos veterinarios. Asimismo, los estudios integrales de liberación, disolución y difusión de fármacos a través de membranas (naturales o sintéticas), son de importancia para los denominados sistemas de entrega, para preparaciones tópicas tradicionales (pomadas), para productos cosméticos, y aun de absorción de contaminantes a través de la piel<sup>(Hanson 1991)</sup>.

### 3. Disolución de un Fármaco a partir de Formas Farmacéuticas Sólidas Simples Tradicionales

En el caso de comprimidos simples, capsulas rígidas o elásticas y de grageas, los factores adicionales que influyen en el proceso de disolución del fármaco que contienen, se pueden agrupar según los siguientes fenómenos:

- Humectación de la superficie de la forma farmacéutica.
- Penetración del disolvente hacia el interior de la misma.
- Proceso de expansión de la forma farmacéutica, de su desintegración en grandes gránulos, y su disgregación en gránulos o partículas pequeñas.

Todo un proceso, en gran parte simultáneo, está involucrado en la liberación y disolución del fármaco contenido en el medicamento.

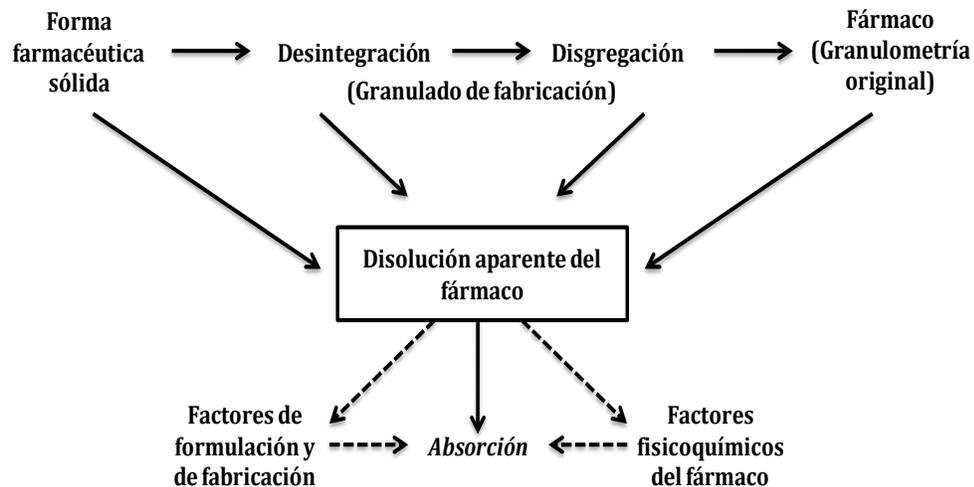


Figura 3. Esquema general de los fenómenos involucrados en los procesos de liberación y de disolución de un fármaco contenido en una forma farmacéutica sólida. Los tres procesos cinéticos son: velocidad de desintegración de la forma farmacéutica, velocidad de disolución del fármaco liberado y velocidad de absorción del mismo. Los procesos ocurren simultáneamente, con distinta intensidad cuantitativa.

- **Humectación de la forma farmacéutica sólida**

La humectación de la superficie de la forma farmacéutica, controla el acceso del líquido hacia el interior de la misma y muchas veces es el factor limitante del proceso de disolución.

La velocidad de humectación está en función directa de la tensión interfacial y del ángulo de contacto entre el sólido y el líquido. La presencia de agentes tensoactivos favorece la disminución del ángulo de contacto y por tanto la humectación del sólido. Por otra parte, la presencia de sustancias hidrófobas en la superficie sólida (ceras, estearatos, talco) o de burbujas de aire en el medio líquido, obstaculizan la humectación del sólido.

- **Penetración del disolvente al interior de la forma farmacéutica sólida**

La penetración de un líquido en los poros de un sólido puede ser estudiada a través de la ecuación de Washburn<sup>(Abdou 1989)</sup>, según la cual la penetración de un líquido es más rápida cuanto menor sea su tensión superficial (fuerza de cohesión) y cuanto mayor sea el radio del poro.

- **Proceso de expansión, desintegración y disgregación de la forma farmacéutica sólida**

Este proceso está en función de factores tales como:

- Compactación del polvo. Si ésta es muy alta, los poros son muy estrechos, el líquido penetra lentamente y por tanto retarda el proceso de desintegración. Este es un punto crítico en el caso de fármacos hidrófobos.
- Distribución y tamaño de poros. En el caso de los comprimidos, el tamaño de los poros es muy pequeño (15 micras en promedio), de modo que es necesario agregar un agente desintegrante, que al absorber el líquido provoque, con su aumento de volumen, una presión interna en el sólido de tal modo que ocurra su desintegración y disgregación<sup>(Aulton 2004)</sup>.

- **Tiempo de desintegración de la forma farmacéutica sólida**

La desintegración de la forma farmacéutica sólida y la disolución del principio activo que contiene son fenómenos estrechamente relacionados y el más lento de los dos, es el llamado paso limitante, que en este caso limita o regula el proceso de absorción del fármaco (siempre y cuando este tenga características adecuadas de absorbabilidad).

Las pruebas farmacopéicas de tiempo de desintegración, estudian la primera parte del proceso de liberación. El comprimido o cápsula en contacto con un líquido se desintegra en agregados o gránulos, que a su vez se disgregan en agregados más finos y éstos son capaces de atravesar un tamiz de un número dado, lo cual es un indicador de que el tiempo de desintegración ha concluido. Estos ensayos farmacopéicos únicamente establecen desde un punto de vista tecnológico, la reproducibilidad del tiempo de desintegración de un lote de medicamento a otro<sup>(Aiache, Devisasaguet et al. 1983)</sup>.

Existe una relación entre el tiempo de desintegración de la forma farmacéutica y la disolución del principio activo contenido en ella<sup>(Abdou 1989)</sup>. La disgregación condiciona en general, la disolución del fármaco y particularmente, en el caso de fármacos hidrófobos. Es importante puntualizar que, independientemente del equipo empleado para medir el tiempo de desintegración, éste está en función de la formulación y proceso de fabricación de la forma farmacéutica, de las condiciones de almacenamiento y de la antigüedad de la misma.



**Figura 4. Interrelación limitante entre los procesos de desintegración de una forma farmacéutica sólida y la disolución del fármaco que contiene. En el primer caso, la desintegración debe ser rápida para evitar mayor retraso en la disolución del fármaco poco soluble. En el segundo caso, una inadecuada formulación de la forma sólida podría retardar el inicio de la disolución de un fármaco altamente soluble.**

### 3.1. Factores que Afectan la Velocidad de Disolución del Fármaco en una Forma Farmacéutica Sólida

Después de la disgregación, más partículas de fármaco están expuestas al medio líquido y la disolución procede mayoritariamente a partir de este polvo.

Los principales factores que pueden afectar la velocidad de disolución de un fármaco contenido en una forma farmacéutica sólida, de los cuales algunos pueden también afectar su tiempo de desintegración, son:<sup>(Aiache, Devisasaguet et al. 1983)</sup>

- **Factores relacionados con la técnica y el equipo de disolución**
  - Intensidad de la agitación, velocidad y tipo de flujo del fluido, geometría del recipiente o contenedor del medio de disolución.
  - Composición del medio de disolución (pH, fuerza iónica, tensión superficial, viscosidad, temperatura).
  - Gradiente de concentración final de la solución. Estas pruebas deben de realizarse en condiciones de no saturación (“*Sumidero* o “*Sink*”), tales que la concentración final del fármaco en la solución sea al menos diez veces menor que su concentración de saturación. La condición de no saturación, también se cumple *in vivo*.
  
- **Factores relacionados con la formulación y con el método de manufactura de la forma farmacéutica sólida**
  - Cantidad y naturaleza de los diluentes (hidrófilos o hidrófobos).
  - Tamaño y distribución de los poros.
  - Cantidad y método de adición del agente desintegrante (inter y/o intragranular).
  - Presencia o ausencia de agentes surfactantes o tensoactivos.
  - Grosor y naturaleza química de los recubrimientos de película (permeabilidad al agua, solubilidad en función del pH).
  - Fuerza y velocidad de compresión (distribución y tamaño de poros).

- **Factores fisicoquímicos del fármaco que afectan la solubilidad**

- Polimorfismo (distintas energías de enlace cristalino).
- Estado amorfo y grado de solvatación.
- Forma química (ácido, bases, sal).
- Tamaño de partícula (área de contacto sólido-disolvente).
- Presentación del fármaco como una solución sólida, o un complejo. Estas presentaciones son generalmente mezclas a nivel molecular, de un fármaco poco hidrosoluble, con moléculas altamente hidrófilas. También existen mezclas físicas con la misma finalidad.

Como se ha mencionado, son diversos los factores y variables que pueden afectar el tiempo de desintegración de una forma farmacéutica sólida, y la disolución del fármaco que contiene. Es importante por tanto, establecer normas farmacopéicas adecuadas para cuantificar los dos procesos a fin de garantizar *in vitro*, un comportamiento de liberación y disolución del fármaco uniforme de lote a lote de producción del medicamento, y aun entre productos de distinto fabricante, como parte de la calidad biofarmacéutica de los medicamentos.

### **3.2. Pruebas de disolución *In Vitro* para Fármacos contenidos en diversas Formas Farmacéuticas**

La velocidad a la cual un sólido se disuelve en un solvente fue estudiada, en términos cuantitativos por Noyes y Whitney<sup>(Noyes and Whitney 1897)</sup>, quienes gracias a sus estudios establecieron la siguiente ecuación:

$$\frac{dC}{dt} = K(C_s - C)$$

Donde  $C$  es la concentración del soluto a tiempo  $t$ ,  $dC/dt$  es la velocidad de cambio de la concentración respecto al tiempo,  $K$  es una constante con dimensiones de  $1/\text{tiempo}$  y  $C_s$ ,

es la concentración de una solución saturada del soluto en el medio de disolución o bien, la solubilidad del sólido en este medio.

El siguiente desarrollo fue de Eric Brunner y Stanislaus von Tolloczko, que publicaron un artículo basado en una serie de experimentos en los que se demostraba que la velocidad de disolución depende de la superficie expuesta, la velocidad de agitación, la temperatura, la estructura de la superficie y el equipo de disolución<sup>(Brunner and Tolloczko 1901)</sup>. El modelo propuesto se deriva de la ecuación de Noyes y Whitney, dejando a  $K$  como  $K_1S$ , siendo  $S$  el área superficial:

$$\frac{dC}{dt} = K_1S(C_s - C)$$

Nernst y Brunner<sup>(Brunner 1904)</sup>, en 1904 hicieron una generalización teórica de la ley de Noyes y Whitney incluyendo el proceso de disolución dentro de las reacciones heterogéneas. Como tal, la velocidad de disolución estaría determinada por los procesos de difusión involucrados en el sistema. De este modo, aplicando la primera ley de difusión de Fick, la cantidad  $dm$  de una substancia que difunde en un tiempo  $dt$  a través de un plano perpendicular de área  $A$ , es directamente proporcional al cambio de concentración  $dc$  e inversamente proporcional a la distancia recorrida  $dx$ . Esto puede expresarse mediante la ecuación siguiente:

$$\frac{dm}{dt} = -DA \frac{dc}{dx}$$

En la que  $D$  es el coeficiente de difusión, el cual se define como la cantidad de soluto que difunde por unidad de área en la unidad de tiempo, cuando  $dc/dx$ , llamado gradiente de concentración, es igual a la unidad  $D$  tiene, por lo tanto, dimensiones de área por unidad de tiempo, como, por ejemplo,  $\text{cm}^2 \text{seg}^{-1}$ .

Nernst y Brunner postularon que sobre la superficie del sólido introducido en un líquido se forma una capa saturada de espesor  $h$  desde donde el soluto difunde hacia el seno de la solución. En esta película estática existiría un flujo laminar, o sea, el líquido circula en

capas separadas y superpuestas las unas a las otras a una velocidad idéntica. En cambio, en el seno de la solución existiría un flujo turbulento. La ecuación de Noyes y Whitney, modificada por Nernst y Brunner, bajo las circunstancias descritas se expresa como:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{DS}{Vh} (C_s - C) = K(C_s - C)$$

En donde:

D = coeficiente de difusión del soluto en la solución

S = superficie del sólido expuesta al solvente

V = volumen de medio de disolución

h = espesor de capa de difusión

Con este método se mide la velocidad de “disolución intrínseca”, la cual se expresa en masa/tiempo/área. Esta forma de cuantificar la velocidad de disolución se refiere a las características de disolución de un fármaco puro, en condiciones de superficie constante. Un fármaco que posea una velocidad de disolución intrínseca mayor de 1 mg/min/cm<sup>2</sup> no provocaría problemas de biodisponibilidad; en cambio si la velocidad es inferior a 0,1 mg/min/cm<sup>2</sup> podría producir problemas en la absorción.

Sin embargo, este concepto de disolución intrínseca tiene poca aplicación práctica cuando se habla de la disolución a partir de formas farmacéuticas, ya que en particular, para las formas sólidas tradicionales, el área interfacial entre el sólido y el líquido cambia con el tiempo. Por ello, se habla en este caso, de la “disolución aparente”, que puede ser definida como la masa total de sólido disuelto por unidad de tiempo<sup>(Hanson 1991)</sup>. Esta velocidad aparente puede ser caracterizada por una constante de velocidad de disolución, *k*. Esta constante representa la “velocidad de corte” entre el sólido y el disolvente, es decir, la velocidad a la cual el disolvente limpio o fresco entra en contacto con la superficie del sólido. Este es un fenómeno complejo que incluye una velocidad de difusión a través de varias capas.

Esta velocidad de corte o de renovación de interfase, está a su vez, en función de diversas variables que deben ser controladas, a fin de obtener procesos y datos de disolución constantes, reproducibles y veraces. Los factores que determinan la velocidad de disolución han sido expuestos en detalle en muchas publicaciones<sup>(Niebergall, Milosovich et al. 1963)</sup>, distinguiendo los factores dependientes del medio de disolución de aquellos que dependen del sólido a disolver.

Las variables que influyen en la velocidad de corte entre soluto y disolvente y por tanto en la velocidad aparente de disolución son:

- Patrón de flujo del disolvente
- Viscosidad y tensión superficial del disolvente; y
- 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 es energía cinética externa, también de este modo altera el proceso de disolución.

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; y,
- Calibración geométrica al milímetro del equipo de disolución en conjunto.

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<sup>(Aiache, Devisasaguet et al. 1983)</sup>.

Es importante puntualizar que el correcto estado, funcionamiento y calibración del equipo, es el punto de partida indispensable para poder establecer que las diferencias de velocidad de disolución aparente entre productos, si las hay, son debidas a factores de formulación y no a una técnica incorrecta o incontrolada de disolución.

### 3.3. Características Generales de los Equipos de Disolución

Existe a la fecha una gran diversidad de equipos y de técnicas reportadas para el estudio de la disolución aparente de fármacos contenidos en diversas formas farmacéuticas, aunque la mayoría fueron diseñados originalmente para formas sólidas. Dado que este amplio espectro de equipo y metodologías influyen de distinto modo en el perfil de disolución aparente del fármaco, y por ende en su posible correlación con resultados de biodisponibilidad, se debe decidir cuáles de ellos serán establecidos como métodos de disolución oficiales.

Actualmente, tanto la USP como la FEUM, hacen referencia a 7 aparatos oficialmente reconocidos para llevar a cabo pruebas de disolución<sup>(USP 35 2012)</sup>; sin embargo, la elección de este depende de la forma farmacéutica en cuestión. 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, estandarizados, 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.

#### 3.3.1. Aparato de Disolución II (Paletas)

Este aparato consiste en un vaso de vidrio u otro material inerte y transparente con tapa, un motor y un dispositivo giratorio (paleta). El vaso debe estar inmerso en un baño de agua o enchaquetado de manera que permita que la temperatura del medio contenido por el vaso sea de  $37\pm 5^{\circ}\text{C}$  durante toda la prueba; a su vez, la tapa retarda la evaporación. La transparencia del vaso permite visualizar el proceso de desintegración de la forma

farmacéutica. El vaso cilíndrico con un fondo semiesférico puede ser de distintas dimensiones dependiendo de la capacidad del mismo. Ninguna parte del aparato o de su entorno debe ser fuente de vibración, movimiento o agitación que no sea la proporcionada por el elemento rotatorio del mismo. El aparato II de disolución tiene las mismas especificaciones que el aparato I, lo único que cambia es el elemento giratorio que en este caso es un sólo cuerpo consistente de un eje y una paleta. La forma farmacéutica se coloca libremente en el vaso antes de comenzar la prueba<sup>(USP 35 2012)</sup>.

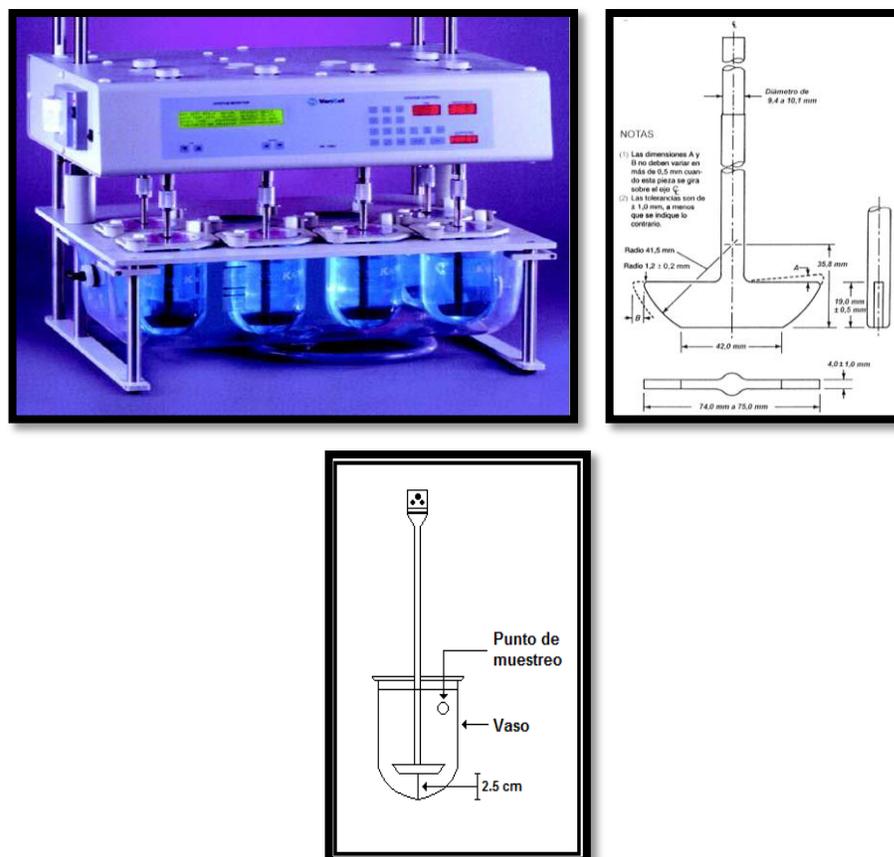


Figura 5. Aparato de Disolución II USP (también llamado de paleta) y su elemento de agitación.

**Ventajas del método:** un patrón de flujo más estable que el obtenido con el Aparato I (canastillas) y por tanto mejor dispersión del sólido para la disolución. También permite una buena inspección visual de la forma farmacéutica durante el tiempo de prueba, para

apoyar en su caso, la explicación de algún problema. El recubrimiento de polifluorocarbono de las propelas, es un material con alto grado de inercia, por lo que no presenta problemas de corrosión o de interferencia con el método analítico para cuantificar fármaco disuelto.

**Desventajas del método:** este método es mucho más sensible a las variaciones en el patrón de flujo del disolvente. La superficie de la propela provoca un gran volumen de flujo; por lo tanto, cualquier pequeña variación en la geometría o en la continuidad de la superficie de la misma, provocará patrones de flujo distintos al normal, esto altera la superficie de intercambio entre sólido y líquido y por ende, se obtendrá resultados dispersos, no reproducibles e inexactos.

Lo mismo ocurrirá si la forma farmacéutica no está exactamente centrada en el fondo de cada vaso, o si el producto es menos denso que el medio de disolución y tiende a flotar. Para evitar que algunos productos floten en el medio de disolución, la USP indica el empleo de “hundidores”, los cuales se colocan de modo envolvente sobre la forma de dosificación. No obstante, el empleo de estos hundidores es severamente criticado puesto que alteran el patrón de flujo normal, y en ocasiones, conforme ocurre el proceso de disolución, la forma de dosificación se libera del hundidor y se desplaza o flota al azar en el medio de disolución, lo cual, se sabe, es una fuente singular de variación de resultados inaceptables. A la fecha, los expertos de la USP están atentos a la resolución de este problema.

### 3.3.2. Aparato de Disolución IV (Celda de Flujo Continuo)

El aparato IV 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 entre 4 y 16 mL por minuto; el flujo debe ser volumétrico para que sea constante independientemente de la resistencia del dispositivo de filtrado, el perfil de flujo

es sinusoidal con una pulsación de  $120 \pm 10$  pulsos por minuto. Los procedimientos de la prueba de disolución en los que se usa una celda de flujo deben estar caracterizados con respecto a la velocidad y a las pulsaciones. La celda de flujo continuo debe ser de material inerte y transparente, se monta verticalmente con un sistema de filtrado que evita la salida de partículas no disueltas por la parte superior de la misma. Los diámetros estándares de las celdas son de 12 y de 22.6 mm, el fondo cónico se rellena con perlas de alrededor de 1 mm de diámetro y con una de 5 mm colocada en el vértice para evitar la entrada de chorro. Se dispone de un contenedor de tableta para formas farmacéuticas especiales. El aparato está ensamblado con abrazaderas para evitar su movimiento y la bomba es independiente de la celda para evitar vibraciones, la posición de la bomba no debe ser más alta que la de los reservorios de medio, las conexiones deben ser lo más cortas posible de material llamado polytef de 1.6 mm de diámetro interno<sup>(USP 35 2012)</sup>.

La bomba de pistón cumple todos estos requisitos y ha demostrado ser a la vez precisa y fiable, mientras que las bombas peristálticas se pueden utilizar en casos especiales, como en las pruebas de implantes. La desgasificación de los medios de prueba es esencial para asegurar que no se formen burbujas. Hay una serie de variaciones en la prueba asociadas a burbujas de aire<sup>(Glantzmann 2007)</sup>.

<b>Irregularidad</b>	<b>Resultado</b>
Variación en la velocidad de flujo	Resultados con alta variación
Burbujas de aire entran en la celda a gran velocidad y pueden dañar la forma de dosificación	Liberación del fármaco muy rápida
Burbujas de aire se pegan al comprimido	Liberación del fármaco muy lenta
Burbujas de aire se pegan a los <i>pellets</i> , resultando en la flotación de los <i>pellets</i> , los cuales se pegan al filtro	Liberación del fármaco muy lenta



**Figura 6. Aparato de Disolución IV USP, también llamado celda de flujo continuo.**

Hay diferentes métodos de desgasificación. Algunos grupos lo hacen manualmente según el método descrito en la USP<sup>(USP 35 2012)</sup>, el cual lleva mucho tiempo para los grandes volúmenes requeridos. Otros trabajan con una estación comercial de preparación del medio. También se puede utilizar la desgasificación en línea, en la que el medio fluye a través de tubos de gas permeables al vacío.

**Ventajas del método:** una de las principales ventajas que tiene el aparato abierto de flujo continuo sobre el aparato cerrado tradicional (de tipo paleta y/o canastilla) es que se pueden mantener fácilmente condiciones *Sink* o de no saturación el medio de disolución por periodos más largos. Esta aplicación es especialmente importante para los fármacos poco solubles, por lo que el desarrollo de correlaciones *in vitro-in vivo* es más fácil para estos fármacos<sup>(Aguilar-Díaz 2008)</sup>.

Otra ventaja importante que tiene el Aparato IV USP es que el medio de disolución y/o los cambios en la velocidad de flujo se pueden realizar fácilmente dentro de la misma prueba, por lo que se pueden realizar cambios de pH durante la prueba. Esta aplicación es útil para probar la robustez de la formulación con respecto a las variaciones en el entorno intraluminal, ya que la hidrodinámica intraluminal es simulada más eficiente en este sistema que en otros sistemas *in vitro*. Además, variando la geometría y capacidad de las

celdas, este equipo puede emplearse para determinar la disolución aparente de fármacos contenidos en formas sólidas, matrices, supositorios, sistemas de entrega transdérmicos, suspensiones. Este método también evita problemas el problema que se presenta cuando un fármaco sufre descomposición debida a su permanencia en el medio de disolución, por largos periodos de tiempo.

**Desventajas del método:** las desventajas de este aparato son la dificultad en la validación de la velocidad de flujo durante el tiempo de prueba; la obstrucción de filtros, causa variaciones graves en el flujo del medio de disolución y puede dañar la bomba. Así como las dificultades operacionales de preparar grandes volúmenes de medio para operación en el modo de circuito abierto y el tiempo agregado en el arranque y limpieza del sistema.

#### 4. Pruebas de Disolución *In Vitro* para Productos Farmacéuticos Veterinarios

Actualmente, la legislación para medicamentos genéricos en México existe solo para aquellos que serán utilizados por humanos; como consecuencia, todavía se carece de reglas específicas para los estudios de bioequivalencia en productos de uso veterinario. En este sentido, las pruebas de disolución *in vitro* de fármacos a partir de productos farmacéuticos de uso veterinario pueden formar parte o incluso reemplazar a los estudios de bioequivalencia y están siendo utilizadas en países como Australia, Canadá, Europa, Japón, Nueva Zelanda y los Estados Unidos <sup>(APVMA , FDA 2002, EMA 2011, Lainesse 2012)</sup>. Dichas pruebas tienen como finalidad ayudar a comprender y tratar de predecir el comportamiento *in vivo* de las formas farmacéuticas. Los equipos y las condiciones que se utilizan actualmente para realizar pruebas *in vitro* son más adecuadas para imitar la fisiología del sistema gástrico humano, pero no simulan las condiciones de las especies que serán tratadas con estos productos farmacéuticos veterinarios. Las formas de dosificación y los sistemas de liberación de uso veterinario tienden a ser más complejos y variados debido a la diversidad de especies, tamaño de los animales y la prevalencia de excipientes poco convencionales que no son utilizados en productos farmacéuticos para la salud humana. Por lo tanto, el desarrollo de ensayos de disolución *in vitro* específicos para su uso con medicamentos veterinarios puede ser difícil y poco convencional con respecto a las expectativas de las agencias regulatorias. Independientemente del enfoque analítico para el desarrollo, se espera que el ensayo de disolución *in vitro* sea discriminante con respecto al impacto de los atributos de calidad críticos en el comportamiento *in vivo* y de fácil aplicación en cualquier laboratorio de control de calidad.

El objetivo y, generalmente las condiciones de las pruebas *in vitro*, para los productos farmacéuticos veterinarios son equivalentes a las de las formas de dosificación orales sólidas de uso humano.

#### 4.1. Retos de las Pruebas de Liberación y Disolución *In Vitro* para Productos Farmacéuticos Veterinarios

Las formas farmacéuticas y los sistemas de liberación de uso veterinario tienden a ser más complejas y variadas debido a la diversidad de especies, al peso corporal de los animales y al uso frecuente de ingredientes naturales y excipientes que a menudo no se utilizan en productos farmacéuticos de uso humano. La industria de la salud animal fabrica productos para una variedad de especies, incluyendo (aunque no exclusivamente) animales de compañía (perros y gatos), rumiantes (vacas, ovejas y cabras), cerdos, caballos y peces. Por lo tanto, las formas de dosificación a menudo se adaptan a las especies objetivo, lo que resulta en distintas formas farmacéuticas para una línea de productos y en formas farmacéuticas de diferente dosificación para cubrir la amplia gama de pesos corporales de los animales.

Las pruebas de liberación y disolución *in vitro* fueron ideadas para su uso con medicamentos y formas farmacéuticas para la salud humana. Los aparatos recomendados y las condiciones de prueba, como se describen en las monografías de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) y la Farmacopea Europea (Ph. Eur.), fueron desarrollados con la intención de imitar la liberación y la absorción de productos farmacéuticos en humanos, y fueron diseñados basados en la fisiología humana<sup>(Gajendran, Kriváček et al. 2005)</sup>. Por lo tanto, las condiciones para las pruebas de liberación de productos farmacéuticos veterinarios no pueden correlacionarse bien con la fisiología de los animales para los cuales fue desarrollada la forma farmacéutica. Desde un punto de vista normativo, se espera el desarrollo de pruebas de liberación *in vitro* para nuevas formas de dosificación de uso veterinario, mínimamente para apoyar en el desarrollo de la formulación, como prueba de control de calidad y para respaldar cambios en la escala de fabricación y cambios posteriores a la aprobación. La singularidad de las formas de dosificación, la complejidad del entorno fisiológico de los animales y el diseño del aparato en *in vitro* puede resultar en una prueba *in vitro* que puede ser demasiado exigente o completamente carente de biorrelevancia<sup>(Siewert, Dressman et al. 2003)</sup>. Las condiciones recomendadas descritas en las

farmacopeas internacionales pueden ser modificadas tomando en consideración la fisiología de la especie de destino del producto farmacéutico, con la apropiada justificación científica. Esto es especialmente válido para especies con sistemas digestivos ruminales, que son únicas respecto a la mayoría de los otros animales y remarcablemente diferentes respecto a la fisiología humana. Para complicar aún más las pruebas de liberación y disolución *in vitro* de productos de uso veterinario, se debe tener presente que pueden incluso existir diferencias específicas entre razas de una misma especie. Debido a la falta de biorrelevancia en las condiciones de las pruebas *in vitro* para productos farmacéuticos de uso veterinario, las correlaciones *in vitro-in vivo* en animales son muy difíciles y muy a menudo no se persiguen.

#### 4.1.1. Diferencias Fisiológicas Gastrointestinales

Los perros, gatos y cerdos son especies monogástricas. Los perros y los cerdos son omnívoros mientras que los gatos son carnívoros. Su fisiología de la digestión y la absorción de fármacos son similares entre sí, y no se diferencian de los humanos (aunque hay claras diferencias). Los caballos son herbívoros con sistemas digestivos monogástricos, a diferencia de los rumiantes, que son herbívoros con un sistema gástrico multi-componentes<sup>(Baggot and Brown 2010)</sup>. Curiosamente, los perros y los cerdos tienden a comer sus comidas a intervalos de tiempo específicos, mientras que los caballos y los rumiantes suelen pastar durante todo el día. Debido a las diferencias en la dieta y estilos alimenticios de las diferentes especies animales, el pH del sistema gástrico en los herbívoros y los carnívoros difiere<sup>(Baggot and Brown 2010)</sup>. Conjuntamente, estas diferencias suelen hacer que la correlación entre las pruebas de liberación y disolución *in vitro* de las formas farmacéuticas y su rendimiento *in vivo* sea muy difícil si no se modifican las condiciones de ensayo descritas por las farmacopeas internacionales.

- **Sistemas Monogástricos**

El sistema gastrointestinal de los perros es relativamente simple pero tiene distintas características a las de los humanos. Además de que la diversidad de razas de perros se extiende hasta el sistema gastrointestinal. Por ejemplo, el tamaño de un perro tiene un impacto directo sobre el tamaño del tracto gastrointestinal. Para las razas grandes (ej. 60 kg), el tracto gastrointestinal es 2.8% de su peso corporal total, mientras que para las razas pequeñas (ej. 5 kg) es el 7%<sup>(Meyer, Kienzle et al. 1993, Fleischer, Sharkey et al. 2008)</sup>. El pH del tracto gastrointestinal canino se encuentra al menos una unidad de pH por encima del pH del tracto gastrointestinal de los humanos, el cual se encuentra comúnmente entre 1-2 en estado de ayuno. En los humanos, después de comer, se presenta un incremento en el pH hasta aproximadamente 3-5 debido al efecto amortiguador de los alimentos<sup>(Martinez and Papich 2009)</sup>. Sin embargo, múltiples estudios han demostrado gran variación en el pH gástrico de los perros. Se han llevado a cabo estudios para determinar el pH gástrico de perros de la raza Beagle en estado de ayuno y alimentados. Los resultados mostraron que el valor de pH de los perros en estado de ayuno fue de 2.05, valor superior que el reportado para los humanos. Por otra parte, para los perros que fueron alimentados el valor que se encontró estuvo entre 1.08 y 1.26. Otros estudios han mostrado un valor de pH bajo condiciones de alimentación de 0.5-3.5<sup>(Lui, Amidon et al. 1986, Zhou, Moench et al. 2005, Sagawa, Li et al. 2009)</sup>. Según estos resultados, en los perros que han sido alimentados no se observa el incremento de pH que aparece en los humanos después de la ingesta de comida.

El tiempo de tránsito gastrointestinal en un animal de compañía puede afectar la capacidad de un fármaco para ser completamente absorbido antes del vaciamiento gástrico. Esto es particularmente importante para formulaciones de liberación controlada. Se han llevado a cabo minuciosos estudios para describir los factores que impactan el tiempo de residencia gástrico tanto en perros como en humanos. Estas diferencias incluyen la fuerza de trituración del estómago del perro, la cual supera la de los humanos, el carácter más restrictivo del píloro en los perros, diversos efectos de los alimentos entre las especies y la anatomía<sup>(Martinez and Papich 2009)</sup>.

Existen también diferencias en las características fisiológicas de los sistemas monogástricos entre especies, no solamente con los humanos. Los gatos tienden a tener proporcionalmente estómagos más pequeños que los perros. Diversos estudios han demostrado que el vaciamiento gástrico de los gatos y los perros se lleva a cabo a la misma velocidad cuando han ingerido alimentos, pero es más lento para los gatos en estado de ayuno<sup>(Sutton 2004)</sup>. Además, se ha demostrado que la permeabilidad en el intestino delgado de los gatos es mayor en comparación con los perros y los seres humanos<sup>(Vandamme and Ellis 2004)</sup>. El revestimiento del estómago en los cerdos tiene las mismas tres capas de tejido de mucosa que existe en los seres humanos, pero difieren en el área relativa de cada una<sup>(Baggot and Brown 2010)</sup>. Se ha observado que estas diferencias pueden inactivar ciertos fármacos. El pH del estómago en los caballos (pH 5.5) es mucho más alto que el reportado para perros. La capacidad relativa del estómago en los caballos (8.5%) es mucho más baja que la reportada para los cerdos (29.2%) y perros (62.3%)<sup>(Baggot and Brown 2010)</sup>.

## 5. Bioequivalencia de Medicamentos Veterinarios

Se entiende por bioequivalencia a la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en la velocidad y magnitud a la que el principio activo contenido en formas farmacéuticas similares, se encuentra disponible en el sitio de acción una vez administrada en el mismo sujeto a la misma dosis bajo condiciones similares en un estudio apropiadamente diseñado para ello<sup>(FDA 2003)</sup>.

En Europa, de acuerdo a lo indicado por el CVMP, los estudios de bioequivalencia se exigen para los medicamentos veterinarios que contienen principios activos ya comercializados por otros laboratorios y que tengan o no la intención de ser comercializados como genéricos, así como también para medicamentos que quieren ser comercializados y que son administrados por una vía distinta al original<sup>(EMA 2011)</sup>. En este último caso, se considera que dos vías de administración son bioequivalentes cuando las concentraciones plasmáticas son similares.

En la actualidad, diversos países tales como Canadá, Estados Unidos de Norteamérica, Japón, Australia, y los pertenecientes a la Unión Europea, han definido lineamientos e incluso legislaciones específicas sobre biodisponibilidad y bioequivalencia de medicamentos veterinarios<sup>(Lainesse 2012)</sup>. En México, a la fecha de realización de este trabajo, los estudios de bioequivalencia todavía no son obligatorios para registrar un medicamento de uso veterinario ante SAGARPA, por lo que la clasificación de genérico no existe en muchos casos, como se observa también en otros países en desarrollo.

Actualmente, en México, son pocos los trabajos publicados sobre la comparación del comportamiento farmacocinético de dos o más medicamentos veterinarios<sup>(Sumano, Gutiérrez et al. 2001, Sumano, Ocampo et al. 2001, Hayashida, Gutiérrez et al. 2011)</sup> que permitan al médico veterinario seleccionar entre uno u otro medicamento de los disponibles en el mercado tomando en cuenta la bioequivalencia. Por lo anterior, se desconocen las consecuencias de utilizar una u otra forma farmacéutica disponibles en el mercado al momento de instaurar una terapia.

Actualmente, como parte del Proyecto de Facilitación del tratado de Libre Comercio entre México y la Unión Europea (PROTLCUEM), existe un proyecto por parte de SENASICA (órgano desconcentrado de SAGARPA) en el que se ha realizado la “Guía que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento veterinario es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas”, que sería una guía equivalente a la NOM-177. Este proyecto de cooperación internacional tiene como principal propósito lograr un cambio en la cultura de nuestro país sobre el consumo y garantía de medicamentos de uso veterinario y homogeneizar los criterios de calidad, eficacia y seguridad de los medicamentos disponibles en el mercado nacional. Sin duda, esto revoluciona la cultura que prevalece en México sobre la calidad y reglamentación en el tema de medicamentos veterinarios, posicionándonos bajo los mismos parámetros que los países primer mundistas utilizaron cuatro décadas atrás. Es un hecho que este tema no ha quedado prácticamente resuelto, ya que los genéricos seguirán avanzando en nuestro país para beneficios de todos los mexicanos.

En el 2009, los Doctores Marilyn Martínez y Rob Hunter ponen de manifiesto que la farmacología veterinaria tiene la necesidad urgente de una iniciativa en materia de bioequivalencia<sup>(Martínez 2012)</sup>. A pesar de los avances farmacológicos y estadísticos que se han dado desde los primeros días en que comenzó a evaluarse la bioequivalencia, todavía siguen existiendo problemas que no han sido resueltos. Si bien muchos de estos problemas son comunes entre la medicina humana y veterinaria, también existen retos específicos para los productos farmacéuticos de uso veterinario. En 2011 se publicó un artículo de revisión en el cual se detallan muchos de los retos que deben abordarse a través de talleres y documentos técnicos<sup>(Martínez and Hunter 2010)</sup>. Dicho artículo aborda las siguientes cuestiones:

- a) La celebración de un seminario al que pudo acceder comunidad internacional, en el cual se proporcionó la historia fundacional, la farmacocinética y los principios estadísticos en los que se basan muchas de las determinaciones para demostrar bioequivalencia. Este seminario fue celebrado en Mayo de 2011, donde Marilyn Martínez fue el presentador y Rob Hunter el copresidente. El objetivo del evento fue proporcionar la información básica que podría servir como plataforma para continuar el debate.

- b) La celebración en Junio de 2010 del Workshop de Bioequivalencia, donde los participantes tuvieron la oportunidad de analizar cuestiones complejas en tema de bioequivalencia. Martínez y Hunter fueron copresidentes. Los temas de discusión incluyeron fármacos de alta variabilidad, los productos de liberación prolongada, las formulaciones tópicas (sin absorción sistémica), productos de administración por vía intramamaria, definiendo el analito apropiado para la determinación de la bioequivalencia y la evaluación de la bioequivalencia en los productos medicinales de tipo A. Los puntos clave de estas discusiones en el Workshop fueron publicados<sup>(Martínez, Hunter et al. 2011)</sup>.
- c) La generación de un número temático en el *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* donde diferentes expertos tienen la oportunidad de presentar sus puntos de vista sobre temas clave. El objetivo de estas publicaciones es proporcionar un trampolín para centrar posteriormente la discusión. Los temas tratados en esta edición son los siguientes:
- La evaluación de la bioequivalencia de formulaciones de liberación prolongada y de fármacos con vida media larga.
  - Si debe o no ser considerado el comportamiento que tienen los animales al lamerse, cuando se evalúe la bioequivalencia de los productos tópicos.
  - La farmacocinética y farmacodinámica de los fármacos estereoisoméricos con especial referencia a la determinación de su bioequivalencia.
  - El establecimiento de la bioequivalencia de las premezclas veterinarias (artículos medicinales de Tipo A)
  - Estimación de la bioequivalencia en productos veterinarios con fármacos de alta variabilidad.
  - Los retos asociados a la demostración de la bioequivalencia en los productos de administración por vía intramamaria en rumiantes.
  - ¿Cómo puede ser determinada la equivalencia de los principios activos o productos provenientes de la biomasa?
  - Retos para llegar a la bioexención en las formas veterinarias de dosificación tópica.

- Problemas de solubilidad:
  - o El establecimiento de criterios de solubilidad para las diferentes especies animales
  - o Clasificación de fármacos en base a su solubilidad en la especie canina
  - o Clasificación de fármacos en base a su solubilidad en la especie bovina
- Estudios clínicos de punto final para la evaluación de la bioequivalencia.
- Consideraciones para la extrapolación de datos de bioequivalencia *in vivo* a través de especies.
- Las diferencias a nivel internacional respecto a los criterios de bioequivalencia.

En ningún caso, estos documentos técnicos deben ser considerados como guías, pero pueden ser vistos como las perspectivas que han sido presentadas por un grupo de expertos. Ciertamente, las perspectivas de otros pueden ser igualmente apropiadas y deben tenerse en cuenta.

El control de los productos veterinarios empieza por la adopción legal de definiciones de los diferentes productos utilizados (vacunas, antibióticos, desinfectantes, vitaminas, antiparasitarios, etc.) y de las condiciones de su importación o de su fabricación si son elaborados en el país. Por ello, los productos veterinarios son objeto de un registro oficial previo a cualquier autorización de comercialización. A este efecto, la OIE (*World Organisation for Animal Health*) trabaja en estrecha colaboración con la VICH (*International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products*), el único organismo internacional que adopta y publica directrices sobre las reglas técnicas de registro de los productos veterinarios.

Las medidas publicadas por la VICH constituyen garantías de seguridad y eficacia para todos los países que las adoptan, a la vez que evitan lastres administrativos nacionales que hacen perder años preciosos para la adopción de innovaciones en el ámbito terapéutico o preventivo. Una vez que las directrices VICH obtengan un reconocimiento suficiente de la comunidad internacional, la OIE las someterá a su vez al conjunto de sus Miembros para que las adopten como normas de la OIE.

Se debe tener en consideración que las directrices que este programa supervisa hacen uniforme y coherente los requisitos, datos e información requerida por los productores de medicamentos de uso veterinario respecto a la integración de un expediente de solicitud de registro, así como para dar seguimiento de la seguridad de los medicamentos una vez que se inició su comercialización. Sin embargo, la VICH no suele abordar cuestiones relativas a la evaluación de los datos, sólo con unas pocas excepciones, esa importante tarea está reservada a las autoridades reguladoras en cada uno de los países de la VICH.

## 6. Validación de Métodos Analíticos

La validación de métodos analíticos se define como: “El proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de un método analítico cumplen con los requerimientos para su aplicación analítica deseada”<sup>(CNQFB)</sup>. Otra definición la podemos encontrar en la guía de validación emitida por la FDA, en la cual se define a la validación como “el proceso de demostrar que el método analítico es adecuado para el uso previsto”<sup>(FDA 2000)</sup>.

En la guía de validación de métodos cromatográficos se define a la validación como “un proceso mediante el cual el método es evaluado por el desarrollador o por el usuario para demostrar que es confiable, exacto y preciso en su finalidad prevista”<sup>(FDA 1994)</sup>.

A nivel nacional se tiene la NOM-059-SSA1-2006, la cual define la validación como “la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones de calidad establecidas”<sup>(SSA 2006)</sup>.

Para el cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio la validación es un requisito imprescindible que está establecido por agencias regulatorias y por comisiones de Farmacopeas para el registro de nuevos medicamentos. La validación es un requisito con carácter obligatorio cuando se desarrolla un nuevo método analítico; sin embargo, los métodos descritos en farmacopeas u otros textos oficiales se consideran validados, aunque debe aclararse que ellos se refieren solamente a métodos generales y a materias primas. Estos no precisan la validación, aunque deben de ser comprobados antes de su utilización rutinaria con la verificación de la idoneidad en las condiciones de laboratorio<sup>(Lugo-Santos 2006)</sup>.

A partir del criterio de que no existe un modelo único para validar y de que existe una gran variedad de métodos analíticos, la validación de los métodos analíticos se fundamenta en la determinación de diversos parámetros, que se aplican de acuerdo con a la categoría a la que pertenezca. Los cuatro tipos más comunes de procedimientos analíticos son:

- Pruebas de identificación;
- Pruebas cuantitativas para el contenido de impurezas;
- Pruebas límite para el control de las impurezas;
- Pruebas cuantitativas de la fracción activa en muestras de la sustancia activa, producto farmacéutico u otro componente(s) seleccionado en el producto farmacéutico.

Existen otro tipo de métodos analíticos, como los que se utilizan en las pruebas de disolución de productos farmacéuticos y la validación de estos métodos analíticos es igualmente importante<sup>(VICH 1998)</sup>.

El objetivo del método analítico debe estar claramente definido, ya que esto regirá los parámetros de validación que será necesario evaluar. Los parámetros necesarios para realizar la validación de un método analítico enfocado a la determinación de contenido químico en un producto farmacéutico son semejantes entre los distintos autores y tienen un grado de concordancia con los documentos regulatorios internacionales.

**Tabla 1. Parámetros de validación recomendados por la VICH<sup>(VICH 1998)</sup>**

Parámetro	Tipo de Método Analítico			
	Identificación	Prueba de Impurezas		Ensayo - Disolución - Contenido/Potencia
		Cuantificación	Límite	
Exactitud	-	+	-	+
Precisión				
Repetibilidad	-	+	-	+
Precisión Intermedia	-	+(1)	-	+(1)
Especificidad <sup>(2)</sup>	+	+	+	+
Límite de detección	-	-(3)	+	-
Límite de cuantificación	-	+	-	-
Linealidad	-	+	-	+
Rango	-	+	-	+

+ Significa que este parámetro es normalmente evaluado

- Significa que este parámetro no es normalmente evaluado

(1) En casos donde la reproducibilidad haya sido evaluada, no es necesario evaluar la precisión intermedia

(2) La falta de especificidad de un método analítico puede ser compensada por otra alternativa analítica de soporte

(3) Puede ser necesario en algunos casos

**Tabla 2. Parámetros de validación recomendados por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México (CNQFB)**

Parámetro de desempeño	Tipo de Método Analítico			
	Contenido/Potencia/Valoración	Pruebas de Impurezas		Identificación
		Contenido/Valoración	Límite	
Precisión/Adecuabilidad del sistema	SÍ	SÍ	SÍ	*
Linealidad del sistema	SÍ	SÍ	NO	NO
Especificidad	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
Exactitud y Repetibilidad	SÍ	SÍ	NO	NO
Linealidad del método	SÍ	SÍ	NO	NO
Precisión del método o Precisión intermedia	SÍ	SÍ	NO	NO
Estabilidad analítica de la muestra	*	*	NO	NO
Límite de detección	NO	NO	SÍ	NO
Límite de cuantificación	NO	SÍ	NO	NO
Robustez	*	*	*	NO
Tolerancia	*	*	*	NO

\*Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método.

## 6.1. Parámetros de Validación

### 6.1.1. Adecuabilidad del Sistema

También llamada “aptitud del sistema”<sup>(USP 32 2008)</sup> más que ser un parámetro de validación como tal, es considerado un requisito previo al comienzo de la experimentación, ya que este parámetro va a demostrar que el equipo funciona de manera adecuada y que las variaciones que se puedan obtener no sean debidas al sistema, por ejemplo: mal funcionamiento de la bomba (flujo inadecuado), problemas de detección (periodo de vida

de la lámpara del detector agotado o presencia de suciedad en las lentes), problemas de muestreo (inyector del automuestreador descompuesto, presencia de burbujas de aire en el mismo), variaciones de presión (provocados generalmente por la acumulación de sales en las tuberías, lo cual conduce al aumento de presión y consecuentemente al paro del equipo debido a presiones fuera del límite.

### 6.1.2. Especificidad

La especificidad es la capacidad que tiene el método para evaluar de manera inequívoca el analito de interés en presencia de componentes que se espera que estén presentes. Normalmente, estos podrían ser impurezas, productos de degradación, o algún excipiente de la matriz<sup>(VICH 1998)</sup>. Se aplica el término especificidad a cualquiera de los siguientes casos: demostrar que las impurezas no interfieren con el análisis o no interfieren con las valoraciones. De acuerdo con la guía del CNQFB<sup>(CNQFB)</sup> se sugiere realizar un análisis con la adición de cualquiera de los productos de degradación, y de no tenerse es necesario producirlos, ya sea por hidrolisis (por medio de un baño de agua y calentamiento o por reflujo durante una hora<sup>(Quattrocchi 1992)</sup>), termólisis (105°C), hidrolisis alcalina (hidróxido de sodio 1 N), hidrolisis ácida (ácido clorhídrico 1 N), fotólisis u oxidación.

### 6.1.3. Precisión

De manera general se puede definir a la precisión como el grado de concordancia (dispersión de los datos con respecto a un valor promedio<sup>(Quattrocchi 1992)</sup>) entre datos obtenidos bajo las mismas condiciones analíticas<sup>(CNQFB , FDA 1994)</sup>. Como criterios de evaluación se debe calcular la desviación estándar, la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) y el intervalo de confianza para cada nivel de precisión. De acuerdo con la guía del CNQFB la precisión se ha dividido en sistema y método (el sistema

se evalúa por medio de estándares y el método por medio de la preparación de varias muestras analíticas<sup>(Quattrocchi 1992)</sup>. Otros autores<sup>(Ermer 2005)</sup> sugieren que para realizar un estudio más detallado es necesario que la precisión tenga tres componentes: repetibilidad, precisión intermedia (o tolerancia intermedia) y reproducibilidad.

La repetibilidad expresa la variabilidad analítica bajo las mismas condiciones de funcionamiento durante un intervalo de tiempo corto<sup>(Ermer 2005)</sup>. Puede expresarse como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y métodos<sup>(CNQFB)</sup>.

La precisión intermedia expresa la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días o equipos<sup>(CNQFB, Ermer 2005)</sup>.

La reproducibilidad expresa la precisión expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios entre laboratorios, generalmente no se requiere la evaluación de este parámetro pero se puede tomar en cuenta para la normalización de los procedimientos analíticos.

#### **6.1.4. Linealidad**

La linealidad de un método analítico es su capacidad (dentro de un rango determinado) de obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en la muestra<sup>(Ermer 2005)</sup>. Puede demostrarse directamente sobre el analito, o en muestras adicionadas usando al menos cinco concentraciones en todo el rango de trabajo. Además de una evaluación visual de la señal del analito como una función de la concentración, se recomienda realizar cálculos estadísticos apropiados, tales como un análisis de regresión lineal. Se deben reportar los valores para la pendiente y la intersección, la suma de cuadrados residual y el coeficiente de determinación. Se recomienda la representación gráfica de los datos y los residuos<sup>(CNQFB, Ermer 2005)</sup>.

La linealidad del sistema tiene la finalidad de demostrar la proporcionalidad que hay entre la concentración del analito y la respuesta obtenida<sup>(Quattrocchi 1992)</sup>; los datos obtenidos deben ser proporcionales, ya sea directamente o por medio de una transformación matemática bien definida<sup>(USP 32 2008)</sup>. La guía FDA indica que la linealidad debe corresponder a un rango que obedezca la ley de Beer<sup>(FDA 1994)</sup> y la guía VICH recomienda que se establezca un intervalo de mínimo cinco concentraciones<sup>(VICH 1998)</sup>. La finalidad de evaluar la linealidad del método es demostrar que sin importar la proporción en que se encuentre el analito de interés y los excipientes en la formulación, el método es capaz de cuantificar el analito de interés.

### 6.1.5. Exactitud

También conocida como error sistemático o tendencia y expresa la concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia (convencionalmente el valor verdadero)<sup>(CNQFB)</sup>. La exactitud puede demostrarse por alguno de los siguientes enfoques<sup>(Ermer 2005)</sup>:

- Demostrando la precisión, linealidad y especificidad
- Comparando los resultados con los de un método independiente previamente validado
- Aplicación del método a un estándar de referencia (para principio activo)
- Porcentaje de recobro del principio activo adicionado a un placebo o al producto farmacéutico (para productos farmacéuticos)
- Porcentaje de recobro de la impureza adicionada a un producto farmacéutico o a un principio activo (para impurezas)

### 6.1.6. Límite de Detección y Cuantificación

El límite de detección se refiere a la concentración mínima del analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada; mientras que el límite de cuantificación indica la concentración mínima del analito que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables<sup>(CNQFB)</sup>. Para su determinación se pueden emplear varios enfoques<sup>(Ermer 2005)</sup>.

- Definición visual
- Cálculo de la relación de señal-ruido (el LD y LQ corresponde a 3 o 2 y 10 veces el nivel de ruido, respectivamente)
- Cálculo de la desviación estándar del blanco
- Evaluación de una curva de calibración a concentraciones bajas

Los límites estimados deben ser verificados analizando un adecuado número de muestras que contengan el analito a las concentraciones correspondientes. Se debe reportar el LD o el LQ y el procedimiento utilizado para la determinación, así como los cromatogramas relevantes.

### 6.1.7. Robustez

Según Ermer<sup>(Ermer 2005)</sup> este es uno de los parámetros de validación de mayor importancia, pero que generalmente pasa por inadvertido; se evalúa la capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método<sup>(CNQFB, VICH 1998)</sup>. Por ejemplo, en el caso de la cromatografía de líquidos<sup>(VICH 1998)</sup>: variaciones de pH, en la composición de la fase móvil, columnas (diferentes lotes/proveedores), temperatura, velocidad de flujo. Sin embargo, las variaciones deben de simular una variación “realista” de las posibles variaciones que se obtengan<sup>(FDA 1994)</sup>. En resumen, la robustez del método se refiere a la capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros normales de operación del

método<sup>(CNQFB)</sup>. La robustez provee una indicación de la fiabilidad del método en condiciones de operación normales.

Debido a que algunas variaciones inevitablemente producen cambios drásticos en la respuesta obtenida no necesariamente es “robusto” frente a todas las condiciones impuestas, así que lo que se reporta es el rango en el que se puede variar cada una de las condiciones sin producir alteraciones en los resultados<sup>(Quattrocchi 1992)</sup>.

### 6.1.8. Tolerancia

Es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación. En la guía VICH no se encuentra una definición como tal de tolerancia., en lugar de eso consideran la tolerancia como un parámetro involucrado con la precisión (precisión intermedia), sin embargo, en la guía del CNQBF se hace hincapié en que la robustez y la tolerancia son conceptos diferentes<sup>(CNQFB)</sup>. El primero se refiere a la influencia de factores internos del método, mientras que la tolerancia se refiere a factores externos del método. Es decir, la tolerancia se refiere a la reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo diferentes normales de operación como pueden ser: equipos, columnas, marca de reactivos, etc.

### 6.1.9. Rango

El rango de un método analítico es el intervalo de entre la concentración superior e inferior (cantidades) de analito en la muestra (incluyendo estas concentraciones) para las cuales se ha demostrado que el método analítico tiene un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad<sup>(VICH 1998)</sup>.

## 6.2. Métodos Analíticos para la Cuantificación del Meloxicam

De los diferentes métodos analíticos que existen reportados en la literatura para la cuantificación de Meloxicam, aproximadamente el 35% de ellos son métodos espectrofotométricos y el 45% son métodos por cromatografía de líquidos<sup>(Nageswara Rao, Meena et al. 2005)</sup>.

Los métodos espectrofotométricos incluyen técnicas por inyección en flujo el uso de derivadas de primer orden<sup>(Joseph-Charles and Bertucat 1999, You, Liu et al. 1999, Sener, Altioikka et al. 2001, Hassan 2002)</sup>. Además de los métodos espectrofotométricos diferenciales, se han desarrollado métodos para la cuantificación de Meloxicam en comprimidos y supositorios mediante su complejación con T-safranina, la dilución de estas mismas soluciones con cloroformo hace posible su cuantificación mediante fluorimetría<sup>(Hassan 2002)</sup>. También existen reportados métodos para estudios de estabilidad en los que es posible detectar y cuantificar la presencia de algunos de los productos de degradación del Meloxicam<sup>(Bebawy 1998, Taha, Salama et al. 2002)</sup>. Para la determinación colorimétrica del Meloxicam se han utilizado complejos con Fe(III) en metanol, azul de metileno en buffer de fosfatos a pH 8.0, 2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona y con el reactivo de Folin-Ciocalteu<sup>(García, Sánchez-Pedreño et al. 2000, Kuchekar, Late et al. 2001, Zawilla, Abdul-Azim Mohammad et al. 2003)</sup>. Para su determinación en formas farmacéuticas también se han utilizado colorantes como el púrpura de bromocresol, azul de bromotimol y azul de bromofenol<sup>(Hassan 2002)</sup>.

En la siguiente tabla se resumen algunos de los métodos analíticos por espectrofotometría UV reportados en la literatura.

**Tabla 3. Métodos analíticos por espectrofotometría reportados para la determinación de Meloxicam.**

<b>Matriz (Muestra)</b>	<b>Solvente/Reactivo</b>	<b>Rango de Linealidad (µg/mL)</b>	<b>Detector, λ (nm)</b>	<b>Ref.</b>
Materia prima / Formas farmacéuticas	NaOH etanólico	1.0 -10.0	UV 322 – 368	(Hassan 2002)
	Safranina-T	4.0 -12.0	Vis 518	
Comprimidos	Acetonitrilo acidificado	6.0 – 14.0	UV 341	(Joseph- Charles and Bertucat 1999)
Comprimidos / Cápsulas	Dimetilformamida acidificada	1.0 – 14.0	UV 357	(Sener, Altiokka et al. 2001)
Formulaciones farmacéuticas	Cloruro férrico en metanol	2.0 – 200.0	Vis 570	(Taha, Salama et al. 2002)
	NaOH 0.1 N	0.5 – 20.0	UV 362	(García, Sánchez- Pedreño et al. 2000)
	2,3-Dicloro-5,6-ciano p- benzoquinona	40.0 – 160.0	Vis 455	(Zawilla, Abdul- Azim Mohammad et al. 2003 )
	Azul de metileno	1.0 – 5.0	Vis 653	
	Reactivo de Folin – Cioaltea	1.5 – 22.5	Vis 700	(Kuchekar, Late et al. 2001)
	Purpura de bromocresol	1.0 – 27.0	UV 386	(Sane, Vandana et al. 2000)
	Azul de bromotimol	2.0 – 30.0	Vis 394	
	Azul de bromofenol	3.0 – 36.0	Vis 395	
	Cloruro férrico / Ferricianuro de potasio		0.25 – 2.5	Vis 770

En la USP 35 también está descrito un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para la valoración de Meloxicam en comprimidos, mientras que la cuantificación de este fármaco en la prueba de disolución debe realizarse utilizando un método espectrofotométrico UV a 362 nm<sup>(USP 35 2012)</sup>. En la siguiente tabla se resumen las características del sistema cromatográfico para la valoración de Meloxicam en comprimidos.

**Tabla 4. Método cromatográfico descrito en la USP 35 para la valoración de Meloxicam en comprimidos.**

Columna	Fase Móvil	Velocidad de flujo (mL/min)	Detección	Temp. (°C)
C18 (4.6 x 100 mm)	Solución A. Solución 2.0g/L de fosfato dibásico de amonio, ajustar con ácido fosfórico a pH 7.0 ±0.1  Solución B. Metanol y alcohol isopropílico (13:2)  Fase móvil: Solución A-Solución B (63:37)	0.8	UV	40

Además de los métodos espectrofotométricos y electroquímicos, se han propuesto métodos por cromatografía de líquidos para la cuantificación del Meloxicam en formas farmacéuticas<sup>(Altınöz, Nemetlu et al. 2002, Hassan 2002)</sup>. Se han desarrollado métodos para la determinación de Meloxicam y sus productos de degradación mediante cromatografía de líquidos de par iónico<sup>(Bebawy 1998)</sup>. Se ha desarrollado un método para identificar y evaluar la estabilidad del Meloxicam mediante cromatografía de capa fina utilizando una fase móvil de acetato de etilo/metanol/NH<sub>3</sub> [17:2:1] con detección a 365 nm<sup>(Joseph-Charles and Bertucat 1999, You, Liu et al. 1999, Hopkała and Pomykalski 2003, Taha, Salama et al. 2004)</sup>.

El Meloxicam también ha sido determinado simultáneamente en presencia de otros AINE's derivados del Oxicam con detección a 360 nm<sup>(Ding, Chen et al. 2002)</sup>. Se han reportado métodos por cromatografía de líquidos para la estimación cuantitativa de Meloxicam a 355 nm en plasma humano para estudios de biodisponibilidad relativa de comprimidos dispersables<sup>(Y., Wang et al. 2001, Dasandi, Shivaprakash et al. 2002)</sup>. Otros más describen la extracción del Meloxicam del plasma y fluidos biológicos seguida de cromatografía utilizando columnas C18, con acetonitrilo/buffer de acetato de sodio pH 3.3 y metanol/buffer de fosfatos pH 3.2 como fase móvil y detección a 346 y 355 nm<sup>(Velpandian, Jaiswal et al. 2000, Elbary, Foda et al. 2001, Y., Z. et al. 2002)</sup>. El Meloxicam también ha sido cuantificado en plasma humano utilizando cromatografía de líquidos en fase reversa acoplada a espectrometría de masas<sup>(Wiesner, De Jager et al. 2003)</sup>.

La farmacocinética del Meloxicam ha sido estudiada por cromatografía de líquidos de fase reversa en los cuales se evita por completo la extracción con solventes. Las proteínas del plasma se precipitan utilizando una mezcla [1:1] de acetonitrilo y ácido perclórico, el sobrenadante se puede inyectar directamente utilizando una columna C18 con una fase móvil que contenga acetonitrilo y acetato de sodio con detección a una longitud de onda de 355 nm. En la siguiente tabla se resumen algunos de los métodos analíticos por espectrofotometría UV reportados en la literatura.

**Tabla 5. Métodos analíticos por CLAR reportados para la determinación de Meloxicam.**

Columna	Fase Móvil (% v/v)	Detección UV	R <sub>t</sub> (min)	Rango de linealidad (µg/mL)	Ref.
Hi Q Sil C18 (250 x 4.6 mm, 5µm)	Acetonitrilo/Agua/Ác. acético glacial [55:40:5]	355 nm	6.8	4.0 – 20.0	(Bandarkar and Vavia 2009)
Lichrocart Lichrospher 100-RP18 C18 (125 x 4 mm, 5µm)	Buffer Tris Ác. Acético 0.05M/Reactivo de tetrabutilamonio/Acetonitrilo [64:1:35]	360 nm	6.21	1.5 – 3.5	(Joseph-Charles and Bertucat 1999)
Spherisorb	Metanol/Buffer de acetato (pH	365 nm	13.8	100 – 500	(Zawilla,

ODS (200 x 4.6 mm, 5 $\mu$ m)	4.3) [45:55]				Abdul-Azim Mohammad et al. 2003 )
Luna, Phenomenex C18 (250 x 4.6 mm, 5 $\mu$ m)	Metanol/Isopropanol/Buffer de fosfato (pH 5.9) 50 mM [51:9:40]	225 nm	$\approx$ 4.0	0.2 – 15.0	(Vignaduzzo, Castellano et al. 2008)
Nucleosil 100-5 C18 (150 x 4.6 mm, 5 $\mu$ m)	Buffer de fosfato 50 mM/MeCN/MeOH (pH 5.5) [50:15:35]	366 nm	11.1	0.2 – 15.0	(Nemutlu, Sayın et al. 2007)
Hypersil Gold C18 (250 x 4.6 mm, 5 $\mu$ m)	Soln. al 0.65% de Ortofosfato dihidrogenado de potasio (pH 6)/Metanol [45:55]	361 nm	4.18	5.0 – 25.0	(Sinha, Jeswani et al. 2009)
Hi Q Sil C18 (4.6 x 250 mm, 5 $\mu$ m)	Metanol/Agua/Ácido orto fosfórico [80:19.9:0.1]	360 nm	4.38	4.0 – 20.0	(Shaji 2012)

## 7. Meloxicam

Los fármacos Antiinflamatorios No Esteroideos (AINE's) son uno de los tratamientos farmacológicos de mayor uso en Europa y en los Estados Unidos y representan aproximadamente el 5% de todas las prescripciones médicas<sup>(Wynne and Campbell 1993)</sup>. Además, el uso de los AINE's ha ido en aumentando debido a que son considerados como terapia farmacológica de primera elección para una amplia gama de condiciones reumáticas<sup>(Baum, Kennedy et al. 1985)</sup>. En nuestro país, el cuadro básico del IMSS contempla algunos AINE's<sup>(IMSS 2014)</sup>, como el Ácido Acetilsalicílico, Diclofenaco, Ketorolaco, Paracetamol, varios de ellos en diversas presentaciones, y son utilizados para el dolor, la fiebre y la inflamación<sup>(Valtierra 2007)</sup>. En el mercado mexicano se encuentran a la venta prácticamente todos los AINE's clásicos en diversas presentaciones.

Si bien el dolor es uno de los síntomas más comunes encontrados en la práctica médica humana, hoy en día no es nada raro encontrarlo también en la medicina veterinaria. Sin embargo, hasta hace poco, se había prestado poca atención a la evaluación y la mitigación del dolor en los animales, especialmente en los países latinos<sup>(Bertolini, Minelli et al. 2002)</sup>. Las razones por las cuales ocurría esto son complejas: los obstáculos ideológicos, por ejemplo, la creencia de que el dolor es natural o de que los animales no sienten dolor, la incapacidad para identificar o reconocer el dolor, el desconocimiento de sus efectos perjudiciales, el temor a los efectos adversos o a la toxicidad de ciertos analgésicos y la falta de familiaridad con las terapias actuales. Todas ellas probablemente contribuyen al deficiente tratamiento del dolor en animales de compañía. Sin embargo, las consideraciones éticas, la gran preocupación que expresan los dueños de mascotas hacia el control del dolor en estas y la creciente evidencia que apoya la importancia médica de la analgesia son razones de peso para rechazar las creencias anteriores.

Actualmente existe poca información disponible acerca de las actitudes de los veterinarios hacia la evaluación del dolor y su alivio, lo que supone que el dolor en los animales frecuentemente puede ser ignorado o sub-diagnosticado<sup>(Hansen and Hardie 1993)</sup>. Sólo

unos pocos estudios observacionales han investigado específicamente el alcance y la adecuación del uso de analgésicos dentro de la profesión veterinaria, la mayoría se han centrado en la analgesia perioperatoria<sup>(Dohoo and Dohoo 1996, Watson, Nicholson et al. 1996, Capner, Lascelles et al. 1999)</sup>.

El Meloxicam es un fármaco anti inflamatorio no esteroideo (AINE), perteneciente al subgrupo de los derivados del oxicam. Su perfil farmacocinético y farmacodinámico ha sido descrito en diversas especies<sup>(Engelhardt 1996, Engelhardt, Bögel et al. 1996, Türck, Roth et al. 1996, Busch, Schmid et al. 1998)</sup>. El principal modo de acción del Meloxicam es la inhibición de una enzima esencial, la ciclooxigenasa (COX), en la cascada del ácido araquidónico.

Después de su introducción en la medicina humana el Meloxicam demostró tener una proporción de potencia COX-1/COX-2 de 3.1:1 sobre macrófagos peritoneales de cobayo<sup>(Engelhardt 1996)</sup>. La proporción de inhibición de la COX-2 respecto a la COX-1 fue desde 7 (diclofenaco) hasta 960 veces (flurbiprofeno) más favorable que otros AINE's investigados. Una actividad preferente sobre la COX-2 similar fue reportada posteriormente cuando se realizaron ensayos con sangre completa de humanos<sup>(Warner, Giuliano et al. 1991)</sup> y posteriormente utilizando células caninas aisladas<sup>(Ricketts, Lundy et al. 1998, Kay-Mugford, Benn et al. 2000)</sup>. En ensayos clínicos con humanos, el Meloxicam demostró producir menos y menos graves efectos adversos gastrointestinales que las dosis recomendadas de algunos otros AINE's, los cuales fueron no selectivos sobre la isoforma COX<sup>(Distel, Mueller et al. 1996)</sup>.

Actualmente, han sido introducidas al mercado farmacéutico veterinario formulaciones parenterales y orales de Meloxicam, siendo los perros una de las principales razas animales tratadas con este fármaco. Los principales malestares tratados con estos medicamentos son el dolor y la inflamación de tejidos blandos y osteoartritis. Ahora hay una gran cantidad de literatura sobre la farmacología, toxicología y usos terapéuticos del Meloxicam en esta especie. A través de un estudio se ha definido el perfil farmacocinético después de la administración de una dosis intravenosa; los valores obtenidos para los parámetros farmacocinéticos fueron 0.01 L/h/kg (depuración), 24 h (tiempo de vida media de eliminación) y 34.8 h (tiempo medio de residencia). El mismo grupo de investigadores

reporto valores similares para el tiempo medio de residencia y la vida media de eliminación después de la administración de una dosis oral en perros<sup>(Busch, Schmid et al. 1998)</sup>.

Otros investigadores han estudiado la farmacodinámica del Meloxicam en el perro, utilizando ensayos *in vitro* con sangre completa y así determinar la proporción de inhibición COX-1/COX-2. Para 50% de inhibición, los valores reportados en la literatura son 10:1<sup>(Brideau, Van Staden et al. 2001)</sup>, 2.72:1<sup>(Streppa, Jones et al. 2002)</sup> y 7.42:1<sup>(King, Rudaz et al. 2010)</sup>. En estudios de seguridad, en los que se compararon AINE's administrando la dosis recomendada a perros por vía oral una vez al día durante 90 días, se reportó menos efectos adversos gastrointestinales para el Meloxicam y Carprofen comparados con Ketoprofen, Flunixin y Etodolaco<sup>(Luna, Basilio et al. 2007)</sup>. Además, un estudio clínico estableció la superioridad del Meloxicam respecto a un tratamiento con placebo en perros con osteoartritis<sup>(Peterson and Keefe 2004)</sup>. Basándose en la favorable farmacocinética, farmacodinámica, toxicidad y perfil terapéutico del Meloxicam en el perro, ha sido introducido un número de productos genéricos, con formulaciones similares al producto innovador. Este estudio está enfocado al establecimiento de la equivalencia farmacéutica entre algunas de estas formulaciones genéricas, como primer paso para posteriormente determinar los perfiles farmacocinéticos de las mismas y así demostrar o no su bioequivalencia.

En el mes de Octubre del año 2010, el Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (LEDEFAR), realizó una recopilación de los medicamentos que tienen una patente registrada en México; es decir, aquellos medicamentos de uso veterinario cuyos protección tendrá validez por un periodo de 20 años, siempre y cuando se cumplan los requerimientos solicitados por el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI), pero también puede existir el caso patentes que tengan un periodo más largo (extensión de patente), o aquellas que no fueron explotadas y han sido objeto de un periodo de renovación especial del que trata el artículo 171 de la Ley de Propiedad Intelectual.

Este listado se recopiló en base a los datos obtenidos conjuntamente en las siguientes fuentes: Prontuario de especialidades veterinarias 2010; Sistema de Información de la

Gaceta de la Propiedad Industrial (SIGA)<sup>(IMPI 2010)</sup> y las Páginas web de los laboratorios farmacéuticos veterinarios. En este estudio se encontraron 128 medicamentos registrados como de uso veterinario, que tienen el registro ante SAGARPA y patente vigente en el IMPI, en la siguiente tabla se puede observar hacia qué especies están destinados estos productos; es importante señalar que un mismo producto puede estar destinado para más de una especie.

**Tabla 6. Cantidad de medicamentos veterinarios destinados a cada especie.**

ESPECIE DESTINADA	NUMERO PRODUCTOS	POCENTAJE (%)
Animales marinos	1	0.33
Abejas	1	0.33
Aves	21	7.00
Ovinos	21	7.00
Caprinos	24	8.00
Gatos	32	10.67
Equinos	35	11.67
Perros	47	15.67
Porcinos	48	16.00
Bovinos	70	23.33

Analizando la tabla, podemos ver que más del 50% de los productos encontrados están destinados para Bovinos, Porcinos y Perros; el 40% de los productos se encuentran destinados para Equinos, Gatos, Caprinos y Ovinos. Esto indica que un elevado porcentaje de los medicamentos de uso veterinario registrados ante SAGARPA son para ser administrados en la especie canina (aproximadamente el 16%).

En estos medicamentos encontrados, se evaluó también la predominancia de las formas farmacéuticas; encontrándose que las soluciones predominan con casi el 50%, seguida de los polvos y granulados con el 15%, los comprimidos, emulsiones y suspensiones con una aportación del 21% y las otras formas farmacéuticas en conjunto representaron el 18% del total.

**Tabla 7. Cantidad de medicamentos veterinarios por forma farmacéutica.**

<b>FORMA FARMACEUTICA</b>	<b>NUMERO DE PRODUCTOS</b>	<b>POCENTAJE (%)</b>
Espumas	1	1
Implantes/Inyectables	1	1
Pesarios	1	1
Tiras	1	1
Cápsulas	2	2
Aerosoles	4	3
Geles	5	4
<i>Pour on</i>	6	5
Suspensiones	9	7
Emulsiones	9	7
Comprimidos	9	7
Sólidos (polvo o granulado)	19	15
Soluciones	58	46

Adicionalmente, se realizó una encuesta con algunos de los Médicos Veterinarios del Hospital de Pequeñas Especies de la FES Cuautitlán quienes argumentaron que los AINE's son de los principios activos de mayor uso en la terapéutica de pequeñas especies y animales compañía. Tanto en Europa como en nuestro país, el Meloxicam es uno de los tres principales AINE's más frecuentemente utilizados para el tratamiento del dolor y la analgesia en perros y gatos<sup>(Hugonnard, Leblond et al. 2004)</sup>, fundamentalmente por ser considerado un inhibidor selectivo de la COX-2 y por lo tanto, presentar efectos adversos relativamente escasos en comparación con otros AINE's<sup>(Henke and Erhardt 2004)</sup>.

## IV. JUSTIFICACIÓN

Los estudios de bioequivalencia para los medicamentos veterinarios son un requisito regulatorio en países como Australia, Canadá, la Unión Europea, Japón, Nueva Zelanda y los Estados Unidos de Norteamérica<sup>(Lainesse 2012)</sup>. Los diversos organismos internacionales que regulan el uso de medicamentos reconocen la importancia de dichas pruebas.

Este tipo de regulaciones han ido creciendo en el mundo, por lo que se ha hecho necesaria la actividad constante de revisarlas y evaluar su aplicación. La legislación contempla además la armonización de estas regulaciones entre los países que establecen acuerdos comerciales, como el Proyecto de Facilitación del tratado de Libre Comercio entre México y la Unión Europea (PROTLCUEM). Para que este acuerdo se lleve a cabo con éxito, se deben armonizar los requisitos de importación y comercialización de medicamentos veterinarios. México, como participe de este acuerdo de nivel internacional, debe hacer que la legislación nacional en materia regulatoria del área veterinaria avance y se fortalezca, ya que actualmente es relativamente nueva e insuficiente.

Es necesario evaluar de manera científica la bioequivalencia de los medicamentos veterinarios, mediante pruebas que demuestren que los productos genéricos son igualmente seguros y eficaces que los innovadores o de referencia dentro de un intervalo previamente definido. Para cada tipo de producto veterinario se deben elegir el tipo de pruebas que permitan definir su bioequivalencia, ya que esta puede ser demostrada *in vivo* o, bajo ciertas condiciones, *in vitro*<sup>(EMA 2011)</sup>.

Las pruebas de disolución *in vitro* de fármacos a partir de medicamentos tienen como finalidad ayudar a comprender y tratar de predecir su comportamiento *in vivo*. Sin embargo, para que estas pruebas sean un predictor confiable del comportamiento *in vivo*, deben de realizarse tratando de simular, en la medida de lo posible, las condiciones fisiológicas reales de la especie animal de destino y deben considerar las características fisicoquímicas del fármaco. A pesar de ello, los equipos y las condiciones que se utilizan actualmente para

realizar estas pruebas son más adecuados para imitar la fisiología del sistema gástrico humano, además de que las formas de dosificación y los sistemas de liberación de uso veterinario tienden a ser más complejos y variados debido a la diversidad de especies, tamaño de los animales y la prevalencia de excipientes poco convencionales que no son utilizados en productos farmacéuticos para la salud humana. Por lo tanto, el desarrollo de pruebas de disolución *in vitro* específicas para su uso con medicamentos veterinarios puede ser difícil y poco convencional con respecto a las expectativas de las agencias regulatorias.

En este sentido, el uso de aparatos de disolución no compendiales como el Aparato II USP modificado para pequeños volúmenes, así como el Aparato compendial IV USP que posee mayor versatilidad para utilizarse con una configuración de sistema abierto o cerrado, con hidrodinámica laminar o turbulenta y que puede utilizarse con una gran variedad de formas farmacéuticas gracias a las distintas celdas que han sido diseñadas, ofrece claras ventajas en el desarrollo de pruebas de disolución *in vitro* para medicamentos de uso veterinario.

Además de la similitud en el comportamiento de disolución de los medicamentos, para que estos sean considerados equivalentes farmacéuticos deben contener el o los mismos principios activos, en la misma forma farmacéutica, para ser administrados por la misma vía y deben cumplir con los requisitos establecidos en la farmacopea como identidad, resistencia, calidad y pureza, incluyendo la potencia; y si es el caso, la uniformidad de contenido y el tiempo de desintegración<sup>(Code of Federal Regulations Title 21 2011)</sup>. Siendo esto un requisito previo e indispensable para posteriormente llevar a cabo los estudios de bioequivalencia *in vivo*.

## V. PARTE EXPERIMENTAL

### 1. Productos Estudiados

Los productos de Meloxicam seleccionados para el estudio fueron donados por los laboratorios fabricantes. Sus características se resumen en el siguiente cuadro:

Marca Comercial	Principio Activo	Contenido	Forma Farmacéutica	Especies	Número de Regulación (SAGARPA)	Laboratorio
Doxo 10 <sup>®</sup>	Meloxicam	1 mg	Comprimidos	Perros/ Gatos	Q-0286-065	Sanfer S.A. de C.V.
MeloxiPet's (S) <sup>®</sup>	Meloxicam	1 mg	Comprimidos	Perros / Gatos	Q-7827-158	Norvet S.A. de C.V.
Meloximax 1 <sup>®</sup>	Meloxicam	1 mg	Comprimidos	Perros / Gatos	Q-0104-150	Bio Zoo S.A. de C.V.

Los lotes evaluados de cada uno de los productos bajo estudio fueron los siguientes:

Marca Comercial	Lote	Fecha de Caducidad	Clave
Doxo 10 <sup>®</sup>	V855JN008	Septiembre 2014	DX008
	V855KN009	Octubre 2014	DX009
MeloxiPet's (S) <sup>®</sup>	126186	Junio 2015	MP186
	1212391	Diciembre 2015	MP391
	1111375	Noviembre 2014	MP375
Meloximax 1 <sup>®</sup>	F-12170	Julio 2014	MM170



Figura 7. Presentación comercial de los productos evaluados.

## 2. Sustancias, Reactivos y Equipo

### 2.1. Estándar de Referencia

El estándar de referencia del Meloxicam utilizado fue un donativo del laboratorio Serral S.A. de C.V.

- Meloxicam Estándar de Referencia  
Pureza 99.3%  
Lote CML20110307

Se analizaron también los distintos lotes de Meloxicam materia prima con los que se fabricaron los productos evaluados. La materia prima también fue donada por los laboratorios productores.

- Meloxicam materia prima proporcionada por laboratorios Sanfer S.A. de C.V.
  - o Lote 1208000124
    - Lotes y productos fabricados con esta materia prima:  
Doxo 10<sup>®</sup> Lote V855JN008  
Doxo 10<sup>®</sup> Lote V855KN009
- Meloxicam materia prima proporcionada por laboratorios Bio Zoo S.A. de C.V.
  - o Lote M.P.-0S1-09
    - Lotes y productos fabricados con esta materia prima:  
Meloximax 1<sup>®</sup> Lote F-12170

- Meloxicam materia prima proporcionada por laboratorios Norvet S.A. de C.V.
  - Lote ALC/MLX/111206
    - Lotes y productos fabricados con esta materia prima:  
Meloxi Pet's (S)<sup>®</sup> Lote 126186  
Meloxi Pet's (S)<sup>®</sup> Lote 1212391
  - Lote ALG/MLX/111101
    - Lotes y productos fabricados con esta materia prima:  
Meloxi Pet's (S)<sup>®</sup> Lote 1111375

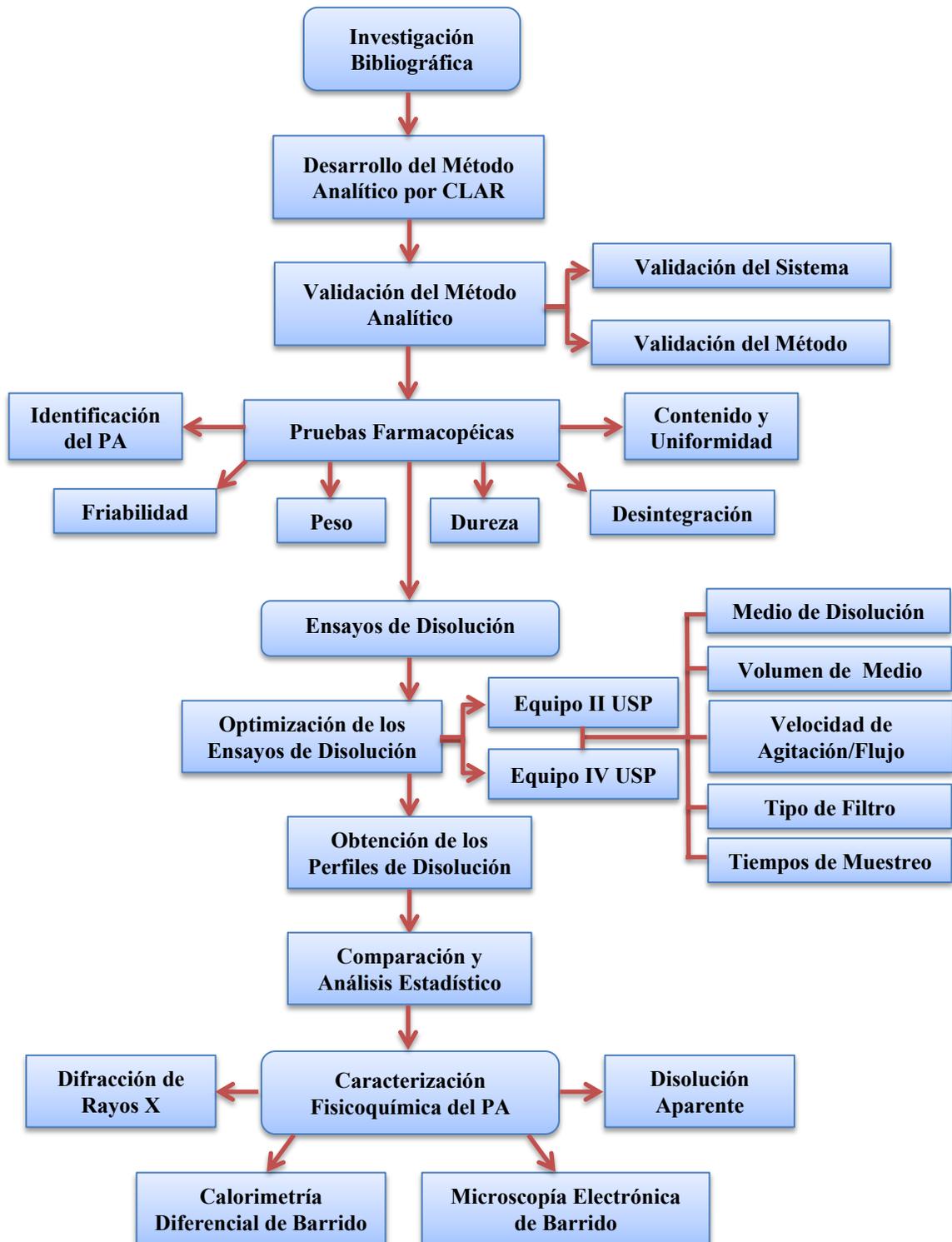
## 2.2. Reactivos

- Ácido acético glacial grado reactivo [C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>], 99-100%. Riedel-de Haën.
- Ácido clorhídrico grado reactivo [HCl], ~36%. Fischer Chemical.
- Ácido trifluoroacético extra puro [C<sub>2</sub>HF<sub>3</sub>O<sub>2</sub>], 99%. Acros Organics.
- Acetato de sodio grado reactivo [NaC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>], 99%. Merck.
- Agua grado CLAR [H<sub>2</sub>O]. Acros Organics.
- Agua desionizada [H<sub>2</sub>O].
- Cloruro de Potasio grado reactivo [KCl], >99%. Fischer Chemical.
- Fosfato monobásico de potasio grado reactivo [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], 98-100.5%. Fluka Analytical.
- Hidróxido de sodio grado reactivo [NaOH], 98.56%. Fischer Chemical.
- Hidróxido de sodio [NaOH]. Solución volumétrica 0.1 M. Fisher Chemical.
- Metanol grado CLAR [CH<sub>4</sub>O]. Fischer Chemical.

### 2.3. Equipos

- Agitador magnético marca Thermo Scientific, modelo Variomag Telesystem.
- Analizador termogravimétrico marca TA Instruments, modelo Q5000IR
- Balanza analítica marca Mettler Toledo, modelo AB204-S.
- Balanza analítica marca Swiss Quality, modelo Precisa 410 AM-FR.
- Baño ultrasonido marca Fisher Scientific, modelo FB15150.
- Calorímetro diferencial de barrido marca TA Instruments, modelo Q2000
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca VWR-Hitachi, modelo Elite La Chrom. Automuestreador termostatzado L-2200 con capacidad para 200 muestras. Bomba cuaternaria en régimen de baja presión L-2130. Horno para columnas termostatzado L-2300, desde 15°C por debajo de la temperatura ambiente hasta 65°C. Detector UV L-2400 con rango de longitudes de onda de: 190-600 nm.
- Desintegrador marca Erweka, modelo ZT501.
- Difractómetro de Rayos X marca Rigaku, modelo Ultima IV.
- Disolutor marca Sotax, modelo AT7 con vasos de vidrio y paletas modificados para pequeños volúmenes.
- Disolutor marca Sotax, modelo CE7Smart con celdas para polvos y celdas de 22.6 mm para comprimidos.
- Durómetro marca PharmaTest, modelo PTB311E.
- Equipo de purificación y desmineralización de agua marca Déminéralisation de l'eau Aquadem.
- Friabilizador marca PharmaTest, modelo PTF10E.
- Microscopio electrónico de barrido marca Jeol, modelo 7600F.
- Potenciómetro de pH marca Inolab, modelo pH Level 2.

### 3. Diagrama de Flujo



## **4. Desarrollo Experimental**

### **4.1. Desarrollo del Método Analítico**

Para el desarrollo del método analítico se realizó una investigación bibliográfica de los métodos analíticos reportados para la cuantificación de Meloxicam en formas farmacéuticas y en estudios de disolución. Los resultados de la búsqueda mostraron que ya existían diversos métodos reportados, e incluso en la USP se cuenta con una monografía para su evaluación. Se probaron algunas de estas metodologías y se hicieron algunas modificaciones hasta lograr la cuantificación de Meloxicam mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

### **4.2. Validación del Método Analítico**

Una vez establecidas las condiciones de trabajo, se validó el método analítico cumpliendo con los criterios de aceptación establecidos en las guías de validación GL1 y GL2 de la Conferencia internacional sobre armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso Veterinario (o “VICH”, por sus siglas en inglés); la guía de validación del Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México edición 2002 y en la Norma Oficial Mexicana NOM 177-SSA1-2013.

#### **4.2.1. Adecuabilidad del Sistema**

Se evaluó inyectando por sextuplicado una solución estándar de Meloxicam a una concentración de 2.0 µg/mL. Esta prueba se realizó cada vez que se utilizaba cromatógrafo de líquidos, con la finalidad de asegurar que el sistema cromatográfico se encontraba en las condiciones adecuadas de trabajo y así evitar obtener resultados poco confiables. Cómo

valores óptimos se considera que la adecuabilidad del sistema debe tener una variación en área menor al 2%, un factor de capacidad mayor a 2 y un factor de coeio (T) menor a  $2^{(CNQFB)}$ .

#### 4.2.2. Linealidad del Sistema

Se preparó una curva de calibración con siete puntos de concentración a partir de una solución estándar de Meloxicam de concentración 10.0  $\mu\text{g/mL}$  realizando las diluciones correspondientes para preparar el resto de los sistemas de la curva de acuerdo a la siguiente tabla:

Sistema	Alícuota (mL)	Volumen de Aforo (mL)	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	0.5	20	0.25
2	1.0	20	0.50
3	3.0	20	1.50
4	6.0	20	3.00
5	9.0	20	4.50
6	12.0	20	6.00
7	15.0	20	7.50

Se graficaron los valores del área de pico cromatográfico obtenidos contra concentración y mediante un análisis de regresión por mínimos cuadrados parciales se obtuvo el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), la pendiente (m) y el intercepto (b) y el error relativo a la regresión.

#### 4.2.3. Precisión del Sistema

Para evaluar la precisión del sistema se preparó una solución estándar de Meloxicam de concentración 10.0  $\mu\text{g/mL}$  y se realizaron las diluciones correspondientes para preparar tres

niveles de concentración. Cada sistema se preparó por sextuplicado de acuerdo a la siguiente tabla:

Sistema	Alicuota (mL)	Volumen de Aforo (mL)	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	0.5	20	0.25
2	6.0	20	3.00
3	15.0	20	7.50

#### 4.2.4. Especificidad del Método

Para demostrar la especificidad del método se inyectó medio de disolución (buffer de fosfatos pH 7.5) como solución blanco, una solución estándar de Meloxicam con una concentración de 2.0  $\mu\text{g/mL}$  y tres muestras analíticas preparadas a partir de los tres productos utilizados en la misma concentración de 2.0  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 4.2.5. Linealidad del Método

La validación de este parámetro se realizó utilizando el método de estándar adicionado, el cual tiene como objetivo evaluar el sesgo de cuantificación, expresado como error, en un método de análisis. Esta metodología es útil en la validación de métodos analíticos cuando se desconocen los excipientes contenidos en la matriz.

La metodología seguida para evaluar linealidad del método se representa en las siguientes dos figuras.

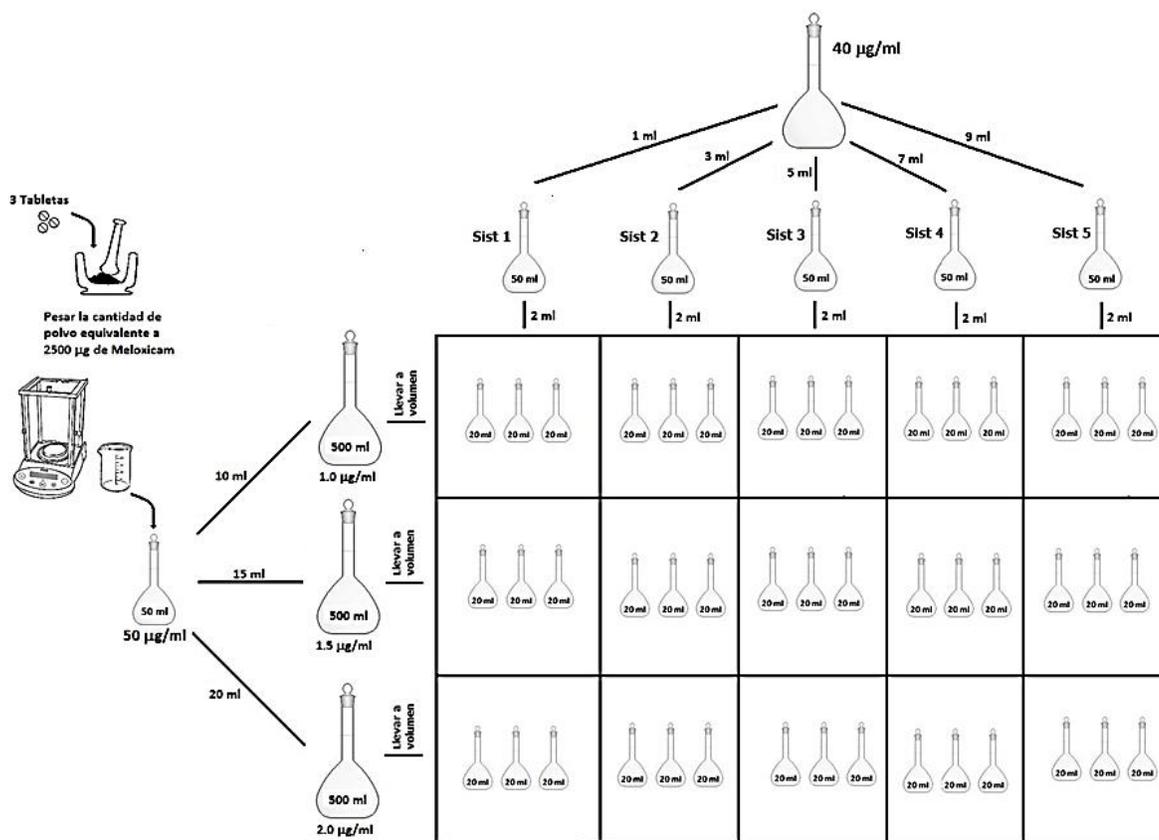


Figura 8. Metodología seguida para evaluar la linealidad del método por adiciones patrón. Parte I.

Como se indica en la figura anterior, a partir de una solución de Meloxicam de concentración 40 µg/mL preparada con el estándar se prepararon los cinco niveles de concentración requeridos para la validación de este parámetro. A partir de una solución estándar de Meloxicam de concentración 50 µg/mL preparada con el polvo de los comprimidos se obtuvieron tres soluciones de concentración diferente.

A cada uno de los matraces se les adicionó el mismo volumen (2 mL) de las soluciones con los cinco niveles de concentración y se llevaron a un volumen final de 20 mL con los tres niveles de concentración preparados con los comprimidos de Meloxicam. Cada uno de los niveles se preparó por triplicado.

También se prepararon los cinco niveles de concentración utilizando el mismo volumen de las soluciones estándar (2 mL) pero se llevaron al volumen final (20 mL) únicamente con medio de disolución (Buffer de fosfatos pH 7.5). Así como los tres niveles de concentración provenientes de la soluciones de Meloxicam preparadas a partir de los comprimidos, tal y como se describe en la Figura 24. Esto se realizó porque un requisito importante del método de las adiciones patrón es que todas las soluciones (estándar y muestra), deben ser aforadas al mismo volumen, de esta forma cualquier posible interferencia estará siempre presente a las mismas concentraciones y representará un efecto igual sobre la respuesta que se obtenga en la adición estándar.

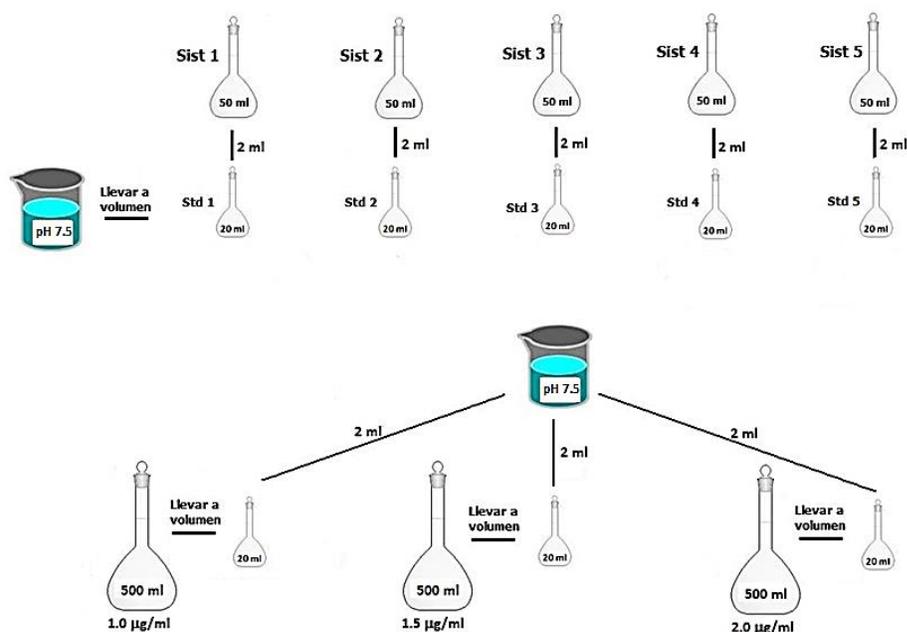


Figura 9. Metodología seguida para evaluar la linealidad del método por adiciones patrón. Parte II.

#### 4.2.6. Precisión y Exactitud del Método

La precisión y la exactitud del método se evaluaron de la misma manera que la linealidad del método, con la diferencia de que se utilizaron únicamente tres niveles de concentración cada uno preparado por sextuplicado. La metodología se describe en la figura 25.

Al igual que en la linealidad del método se prepararon los tres niveles de concentración utilizando el mismo volumen de las soluciones estándar pero llevándolas a volumen final únicamente con medio de disolución (Buffer de fosfatos pH 7.5). Así como los tres niveles de concentración provenientes de las soluciones de Meloxicam preparadas a partir de los comprimidos, tal y como se indica en la Figura 26.

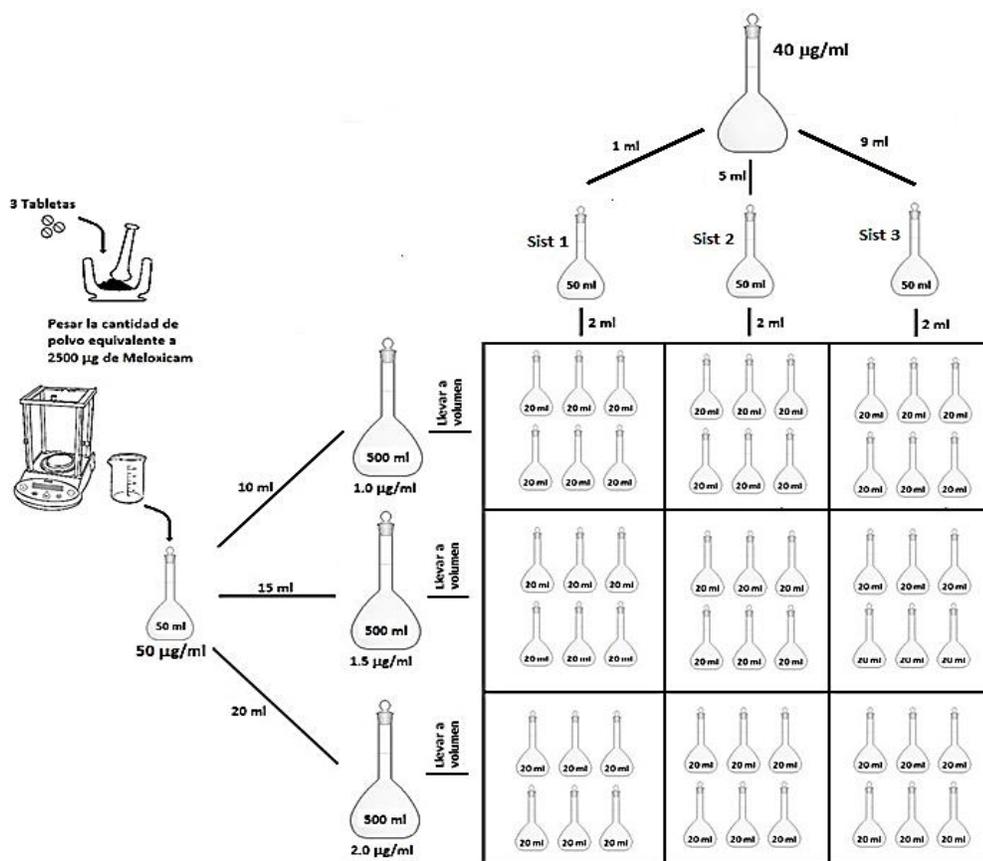


Figura 10. Metodología seguida para evaluar la precisión y exactitud del método por adiciones patrón. Parte I.

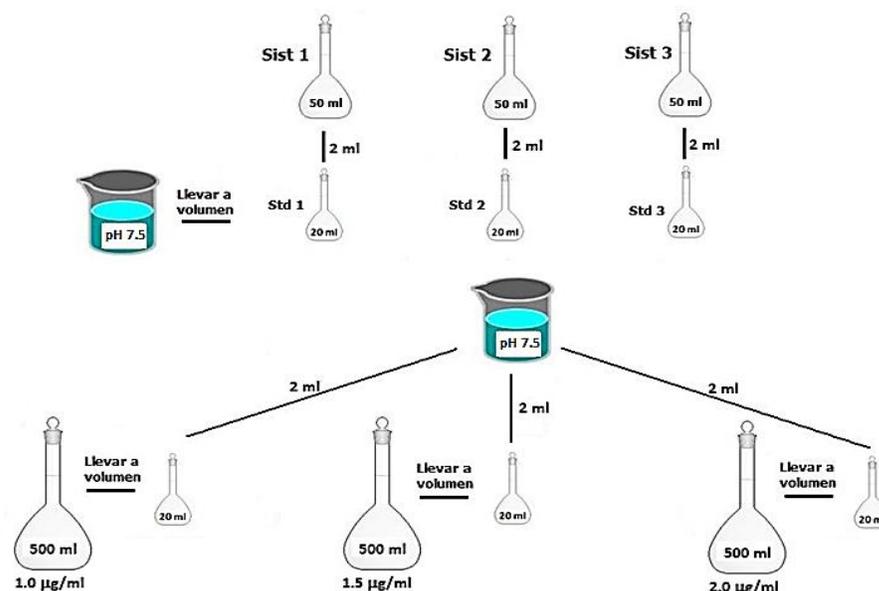


Figura 11. Metodología seguida para evaluar la precisión y exactitud del método por adiciones patrón. Parte II.

#### 4.2.7. Repetibilidad y Reproducibilidad del Método

La repetibilidad y la reproducibilidad del método se evaluaron por medio de la estimación por triplicado de tres niveles de concentración de soluciones con estándar adicionado. Las muestras fueron preparadas por dos analistas diferentes en dos diferentes días bajo las mismas condiciones. El análisis estadístico se realizó utilizando un Análisis de Varianza Anidado.

#### 4.2.8. Estabilidad de la Muestra

Para evaluar la estabilidad de la muestra se preparó una solución de concentración 3.0 µg/mL de Meloxicam, la cual se mantuvo a temperatura ambiente y a 37°C. Se tomaron alícuotas a los 30, 60, 90, 180 minutos y a las 24 horas de preparada la solución. Las

muestras se inyectaron en el cromatógrafo y se realizó un análisis de varianza para determinar si existe diferencia significativa.

#### **4.2.9. Influencia del Filtro**

Para la evaluación de este parámetro se preparó una solución de Meloxicam de concentración 10 µg/mL y a partir de esta se prepararon tres niveles de concentración diferentes, se tomaron seis alícuotas de cada una de las concentraciones y se filtraron con los dos diferentes filtros. Cada una de las muestras se inyectó en el cromatógrafo y se comparó el valor del área del pico cromatográfico con el valor obtenido de las mismas soluciones sin filtrar.

#### **4.3. Perfil de Solubilidad-pH del Meloxicam**

Para la obtención del perfil de solubilidad del Meloxicam se determinó el perfil de solubilidad versus el pH del Meloxicam en medio acuoso a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  en un rango de pH comprendido entre 1.2 a 8.8. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Se utilizaron soluciones buffer estándares descritas en la USP y se verificó el pH de las soluciones antes y después de adicionar el Meloxicam.

A los vasos de precipitados conteniendo las soluciones buffer se les adicionó una cantidad fija de Meloxicam asegurando la saturación del sistema. Los vasos se colocaron en el baño ultrasonido durante 15 minutos y posteriormente se sometieron a agitación constante (400 rpm) durante 72 horas a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . Transcurrido este tiempo las soluciones se filtraron utilizando filtros de microfibras de vidrio de 0.2 µm de tamaño de poro. Se realizaron las diluciones correspondientes y se cuantificó la cantidad de Meloxicam disuelta en cada solución buffer utilizando el método analítico desarrollado.

#### 4.4. Disolución Intrínseca y Aparente del Meloxicam

La determinación de la disolución intrínseca del Meloxicam se realizó utilizando el Aparato de Wood, el cual consiste en un punzón y una matriz de acero endurecido que se une sobre una placa de acero pulido. La parte superior de la matriz posee un hombro roscado que permite que se una a un soporte, el cual se monta sobre un dispositivo agitador de laboratorio. La matriz completa se sumerge en el medio de disolución y se rota con el agitador<sup>(USP 32 2008)</sup>.

Para la prueba, se pesaron aproximadamente 50 mg del estándar de Meloxicam. La placa de acero pulido se unió al lado inferior de la matriz y se aseguró con los tres tornillos que incluye el aparato. El Meloxicam se transfirió a la cavidad de la matriz y se colocó el punzón dentro de la cámara, y se comprimió en una prensa hidráulica durante 1 minuto con una presión de 1 tonelada para formar el pellet comprimido. Se retiró el punzón y se atornilló la matriz en el soporte superior, se ajustó firmemente y se eliminó todo el polvo suelto de la superficie de la matriz para finalmente separar la placa de acero. Se colocó el soporte (unido a la matriz) dentro del equipo de disolución Sotax AT7 utilizando una velocidad de agitación de 100 rpm. Se realizó esta prueba utilizando diferentes medios de disolución como variable aleatoria, buffer con pH 1.2, 4.5, 6.8 y 7.5. Todos los demás parámetros se mantuvieron constantes. La concentración de cada muestra se determinó utilizando el método analítico desarrollado.

La determinación de la disolución aparente del Meloxicam se realizó con el Aparato IV USP con una configuración de sistema cerrado, utilizando las celdas para polvos. Se colocó una perla de rubí de 5 mm de diámetro en la parte inferior de las celdas y posteriormente se llenaron con perlas de vidrio de 1 mm de diámetro. Se colocaron las dos mallas, las cuales sostenían un filtro de microfibras de vidrio Whatman® GF/C (1.2 µm) y la cantidad del principio activo que se analizó. Se posicionaron las mallas superiores sosteniendo el segundo filtro y se cerró herméticamente la celda. El volumen de los diferentes medios de disolución, buffer con pH 1.2, 4.5, 6.8 y 7.5, fue de 500 mL. Se tomaron alícuotas de 1 mL

durante 90 minutos con una frecuencia de 5 minutos. La concentración de cada muestra se determinó utilizando el método analítico desarrollado.

## **4.5. Pruebas de Control de Calidad**

### **4.5.1. Peso Promedio**

Se pesaron individualmente 20 comprimidos de cada uno de los lotes analizados. Se determinó el peso promedio así como la desviación estándar y el coeficiente de variación.

### **4.5.2. Tamaño (Diámetro y Espesor)**

Se midió el espesor de 20 comprimidos de cada una de las marcas y lotes analizados utilizando un calibrador Vernier. Se calculó el valor promedio de las dimensiones de los comprimidos en milímetros, así como la desviación estándar y el coeficiente de variación.

### **4.5.3. Friabilidad**

Se pesaron 10 comprimidos de cada producto y cada lote analizado en la balanza analítica, se colocaron en el Friabilizador y se inició la medición bajo las siguientes condiciones: 25 rpm durante 4 minutos. Transcurrido este tiempo se sacaron los comprimidos, con una brocha se retiró el polvo de la superficie de las mismas y se pesaron nuevamente en la balanza analítica. Se determinó la diferencia en peso y el porcentaje de pérdida de peso.

#### **4.5.4. Dureza**

Se determinó la dureza de 10 comprimidos de cada una de las marcas y lotes analizados utilizando el durómetro. Se calculó el valor promedio de la dureza de los comprimidos en kilopondios, así como la desviación estándar y el coeficiente de variación.

#### **4.5.5. Tiempo de Desintegración**

Se seleccionaron 6 comprimidos de cada una de las marcas y lotes para el análisis. Se colocó un comprimido en cada uno de los tubos de la canastilla del aparato de desintegración y se sumergió en un vaso de precipitados de 1000 mL conteniendo 800 mL de buffer de ácido clorhídrico pH 1.2 a  $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  introducido en un baño de agua. Se registró el tiempo en minutos necesario para que los comprimidos se desintegraran, transcurrido el tiempo de desintegración se elevó la canastilla para separarla del líquido de inmersión y observar los comprimidos, los cuales debían haberse desintegrado completamente.

#### **4.5.6. Identificación del Principio Activo**

La identificación del principio activo se realizó mediante la identificación de su espectro de absorción en la región UV, en un rango de 200 a 400 nm. Se prepararon soluciones de concentración  $10\ \mu\text{g/mL}$  a partir de los comprimidos evaluados y se comparó su espectro de absorción con el espectro obtenido a partir de una solución de Meloxicam estándar a la misma concentración.

#### 4.5.7. Valoración del Principio Activo

En la tabla 8 se describe la metodología empleada para el ensayo de valoración.

**Tabla 8. Metodología empleada para la valoración de Meloxicam contenido en comprimidos de 1 mg.**

<b>Valoración de Meloxicam contenido en comprimidos de 1 mg</b>	
<b>Preparación de la Solución Estándar Stock</b>	Se pesaron y transfirieron 10 mg de Meloxicam RE a un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvieron en 3 mL de Hidróxido de Sodio 0.1 N y 15 mL de Metanol. Se diluyó a volumen con agua y se mezcló. [Nota: La solución estándar stock se preparó de forma que la concentración final de Meloxicam, en mg/mL, fuera aproximadamente equivalente a la concentración de la solución estándar muestra].
<b>Preparación de la Solución Estándar</b>	Se transfirió 1 mL de la solución estándar stock a un matraz volumétrico de 50 mL, se diluyó a volumen con agua y se mezcló.
<b>Preparación de la Solución Estándar Muestra</b>	Se pesaron y transfirieron 3 comprimidos a un matraz volumétrico de 100 mL, se adicionaron 10 mL de Hidróxido de sodio 0.1 N y 30 mL de Metanol, se agitó para dispersar los comprimidos. Se sometió a ultrasonido durante 10 minutos y posteriormente se agitó durante 20 minutos. Se diluyó a volumen con agua y se mezcló. Se filtró la solución resultante y se utilizó el filtrado.
<b>Preparación de la Solución Muestra</b>	Se transfirieron 2 ml de la solución estándar muestra a un matraz volumétrico de 25 mL, se diluyó a volumen con agua y se mezcló.
<b>Sistema Cromatográfico</b>	Detección UV 362 nm; Columna de 3.9 mm x 150 mm con relleno C18, de 5 µm de diámetro; Velocidad de Flujo de 1.5 mL/min; Temperatura ambiente; Volumen de Inyección de 50 µL
<b>Fase Móvil</b>	Se preparó una mezcla de metanol y ácido trifluoroacético al 1% (60:40).
<b>Criterio de Aceptación<sup>(USP 35 2012)</sup></b>	Los comprimidos de Meloxicam contienen no menos de 90% y no más de 110% de la cantidad declarada de Meloxicam.

#### 4.5.8. Uniformidad de Contenido

En la tabla 9 se resume la metodología empleada para llevar a cabo la prueba de uniformidad de dosis de los productos evaluados.

**Tabla 9. Metodología empleada para la Valoración individual de los comprimidos de Meloxicam.**

<b>Valoración individual de los comprimidos de Meloxicam</b>	
<b>Preparación de la Solución Estándar Stock</b>	Se pesaron y transfirieron 10 mg de Meloxicam RE a un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvieron en 3 mL de Hidróxido de Sodio 0.1 N y 15 mL de Metanol. Se diluyó a volumen con agua y se mezcló. [Nota: La solución estándar stock se preparó de forma que la concentración final de Meloxicam, en mg/mL, fuera aproximadamente equivalente a la concentración de la solución estándar muestra].
<b>Preparación de la Solución Estándar</b>	Se transfirió 1 mL de la solución estándar stock a un matraz volumétrico de 50 mL, se diluyó a volumen con agua y se mezcló.
<b>Preparación de la Solución Estándar Muestra</b>	Se transfirió 1 comprimido a un matraz volumétrico de 50 mL, se adicionaron 5 mL de Hidróxido de sodio 0.1 N y 15 mL de Metanol, se agitó para dispersar el comprimido. Se sometió a ultrasonido durante 5 minutos y posteriormente se agitó durante 10 minutos. Se diluyó a volumen con agua y se mezcló. Se filtró la solución resultante y se utilizó el filtrado.
<b>Preparación de la Solución Muestra</b>	Se transfirió 1 mL de la solución estándar muestra a un matraz volumétrico de 10 mL, se diluyó a volumen con agua y se mezclómezclar.
<b>Sistema Cromatográfico</b>	Detección UV 362 nm; Columna de 3.9 mm x 150 mm con relleno C18, de 5 µm de diámetro; Velocidad de Flujo de 1.5 mL/min; Temperatura ambiente; Volumen de Inyección de 50 µL
<b>Fase Móvil</b>	Se preparó una mezcla de metanol y ácido trifluoroacético al 1% (60:40).

**Criterio de Aceptación**<sup>(USP 35 2012)</sup>

Para conocer si los productos evaluados cumplen con el ensayo de Uniformidad de contenido, según los criterios establecidos por la USP 35 <905>, es necesario el cálculo del “Valor de Aceptación” (VA), el cual se calcula de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{Valor de Aceptación} = |M - \bar{X}| + k \cdot s$$

M = valor de referencia

- a) Si  $98.5 \% \leq \bar{X} \leq 101.5 \%$ , entonces  $M = \bar{X}$  [VA=k·s]
- b) Si  $\bar{X} < 98.5 \%$ , entonces  $M = 98.5 \%$  [VA = (98.5 -  $\bar{X}$ ) + k·s]
- c) Si  $\bar{X} > 101.5 \%$ , entonces  $M = 101.5 \%$  [VA = ( $\bar{X}$  - 101.5) + k·s]

$\bar{X}$  = Media de los contenidos individuales ( $X_1, X_2, \dots, X_n$ ), expresados como el porcentaje de la cantidad declarada

k = Constante de aceptabilidad (si n = 10, k = 2.4)

n = Número de unidades evaluadas (10)

s = Desviación estándar de la muestra

Máximo valor de aceptación permitido: L1 = 15.0 a menos que se especifique algo diferente en la monografía individual.

Máximo intervalo permitido para la desviación de cada unidad de dosificación probada a partir del valor calculado de M: L2 = 25.0 a menos que se especifique algo diferente en la monografía individual. En el lado del valor menor, ningún resultado de unidad de dosificación puede ser menor de  $(1 - L2 \cdot 0.01)M$ , mientras que en el lado del valor superior ningún resultado de unidad de dosificación puede ser mayor de  $(1 + L2 \cdot 0.01)M$ . (Esto está basado en un valor de L2 de 25.0).

## 4.6. Obtención de los Perfiles de Disolución

### 4.6.1. Estudio de los Perfiles de Disolución en Aparato USP II (Paletas) Modificado para Pequeños Volúmenes

La metodología utilizada para obtener los perfiles de disolución en el Aparato USP II es la propuesta en la USP para el desarrollo de la prueba, sin embargo, se utilizó una versión modificada del Aparato II utilizando propelas y vasos de menores dimensiones. El vaso para pequeños volúmenes está basado en las especificaciones del vaso de un litro descrito en las farmacopeas, pero el tamaño se redujo para ser utilizado con un volumen de 50 a 200 mL de medio de disolución, con un diámetro interno de 40 mm. Estos vasos ofrecen la ventaja de que pueden ser utilizados directamente en el mismo equipo. Se utilizó una paleta pequeña de 29 mm de longitud posicionada a 10 mm del fondo del vaso. En la siguiente figura se pueden observar las diferencias en el tamaño de los vasos y las paletas del Aparato II.

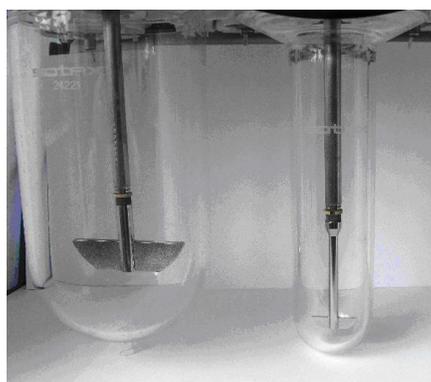


Figura 12. Vaso y paleta de dimensiones compéndiales (Izquierda) y Vaso modificado para pequeños volúmenes con la paleta pequeña (derecha).

- **Procedimiento**

Se colocaron 200 mL del medio de disolución en cada vaso del disolutor, éste se calentó a través de un baño de agua con temperatura constante hasta obtener una temperatura de

37±0.5°C. Se colocó un comprimido del producto a estudiar en el interior de cada vaso del disolutor, y se comenzó con la agitación. Se tomaron 2 mL de muestra en los tiempos indicados con filtración inmediata. Las muestras se analizaron utilizando el método por cromatografía de líquidos de alta resolución desarrollado y validado previamente. En la siguiente tabla se resumen las condiciones de operación con las cuales obtuvieron los perfiles de disolución.

**Tabla 10. Condiciones de operación de la prueba de disolución en el Aparato USP II modificado para pequeños volúmenes.**

<b>Condición de Operación</b>	<b>Especificación</b>
<b>Equipo de disolución</b>	Equipo II USP (Paletas) modificado para pequeños volúmenes marca Sotax modelo AT7 Smart
<b>Medio de disolución</b>	Buffer de fosfatos pH 7.5
<b>Volumen de medio</b>	200 mL
<b>Filtro</b>	Minisart® NML Syringe Filters (0.2 µm)
<b>Temperatura de la prueba</b>	37°C ± 0.5
<b>Velocidad de agitación</b>	190 rpm
<b>Muestra</b>	N = 6
<b>Tiempos de muestreo (min)</b>	2, 5, 9, 15, 20, 25, 30, 40, 50 y 60.

#### 4.6.2. Estudio de los Perfiles de Disolución en Aparato USP IV (Celdas de Flujo Continuo)

Para la obtención de los perfiles de disolución en el Aparato USP IV, el equipo se utilizó con una configuración de sistema cerrado, por lo que un volumen constante de medio de disolución estuvo recirculando a través de las celdas durante la prueba. En la siguiente tabla se resumen las condiciones de operación con las cuales obtuvieron los perfiles de disolución.

**Tabla 11. Condiciones de operación de la prueba de disolución en el Aparato USP IV.**

Condición de Operación	Especificación
<b>Equipo de disolución</b>	Equipo IV USP (celdas de flujo continuo) marca SOTAX modelo CE 7Smart
<b>Tipo de Celda</b>	Celda para tabletas de 22.6 mm
<b>Medio de disolución</b>	Buffer de fosfatos pH 7.5
<b>Volumen de medio</b>	200 mL
<b>Filtro</b>	Filtros de Microfibra de Vidrio Whatman® GF/C (1.2 µm)
<b>Temperatura de la prueba</b>	37°C ± 0.5
<b>Velocidad de flujo</b>	24 mL/min
<b>Perlas de vidrio</b>	Colocar una perla de 5 mm de diámetro y posteriormente llenar la base cónica de la celda con perlas de vidrio de 1mm de diámetro.
<b>Muestra</b>	N = 6
<b>Tiempos de muestreo (min)</b>	3, 5, 9, 15, 20, 25, 30, 40, 50, y 60.

- **Procedimiento**

Se encendió el termostato del baño de temperatura ajustándolo a una temperatura de 37°C ± 0.5. Se colocó las conexiones de cada una de las celdas en cada uno de los contenedores con el medio de disolución. Las celdas de 22.6 mm se posicionaron y en cada una se colocó una cuenta de rubí seguida de una cama de perlas de vidrio. En cada celda se

colocó, sobre la cama de perlas, un comprimido del producto a estudiar. Una vez insertada la muestra se colocaron en cada celda los filtros en los cabezales de filtro y el empaque superior. Posteriormente se acoplaron los cabezales en cada celda y se cerraron. Antes de comenzar la prueba se programó el equipo para que el agua del termostato se introdujera en cada unidad de disolución y mantuviera la temperatura de prueba deseada. Se encendió la bomba para que el medio de disolución comenzara a fluir a través de las celdas y se tomaban las muestras a los diferentes tiempos.

- **Procedimiento para la obtención de los perfiles de disolución con cambio de pH del medio de disolución**

Para la obtención de los perfiles de disolución con cambio de pH se utilizaron las mismas condiciones de operación y el procedimiento ya descrito; con la diferencia de que se realizó un cambio en el medio de disolución.

Los ensayos se llevaron a cabo durante 90 minutos, utilizando buffer pH 1.2 como medio de disolución durante los primeros 30 minutos y posteriormente se reemplazó por buffer pH 7.5 para continuar con la prueba durante 60 minutos más.

#### 4.7. Caracterización Físicoquímica de la Materia Prima de Meloxicam

Los lotes de materia prima caracterizados y los lotes de producto terminado fabricados con cada lote de materia prima se resumen a continuación.

Lote de Materia Prima	Codificación	Marca del Medicamento Fabricado	Lote del Medicamento Fabricado
MP-0S1-09	A1	Meloxicam 1 <sup>®</sup>	F-12170
1208000124	B1	Doxo 10 <sup>®</sup>	V855JN008 V855KN009
ALC/MLX/111206	C1	Meloxi Pet's (S) <sup>®</sup>	126186 1212391
ALG/MLX/111101	C2	Meloxi Pet's (S) <sup>®</sup>	1111375

##### 4.7.1. Disolución Aparente del Meloxicam en Aparato IV USP

Los estudios de disolución aparente de la materia prima de Meloxicam se llevaron a cabo en el mismo medio de disolución (buffer de fosfatos pH 7.5) y bajo las condiciones que se utilizaron para obtener los perfiles de disolución en el Aparato IV USP; aunque en este caso se utilizó la celda para polvos y granulados.

##### 4.7.2. Difracción de Rayos X

Los ensayos de Difracción de Rayos X para analizar las muestras de materia prima de Meloxicam se realizaron en el laboratorio de Rayos X del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM, utilizando un Difractómetro de Rayos X marca Rigaku, modelo Ultima IV. El registro de cada difractograma fue realizado a una velocidad de  $1.0^{\circ}2\theta/\text{min}$ , en un rango de  $5.0$  a  $60.0^{\circ}2\theta$  con intervalos de  $0.02^{\circ}2\theta$ .

#### **4.7.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)**

Para el análisis térmico por Calorimetría Diferencial de Barrido se empleó un calorímetro marca TA Instruments, modelo Q2000. Los análisis se realizaron a una tasa de calentamiento 5°C/min, en atmosfera de nitrógeno, utilizando porta muestras de aluminio. Los análisis fueron realizados en el laboratorio de Análisis Térmico del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM.

#### **4.7.4. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)**

Las imágenes de la materia prima de Meloxicam se obtuvieron mediante Microscopía Electrónica de Barrido, con un Microscopio electrónico de barrido marca Jeol, modelo 7600F, localizado en el Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Desarrollo del Método Analítico

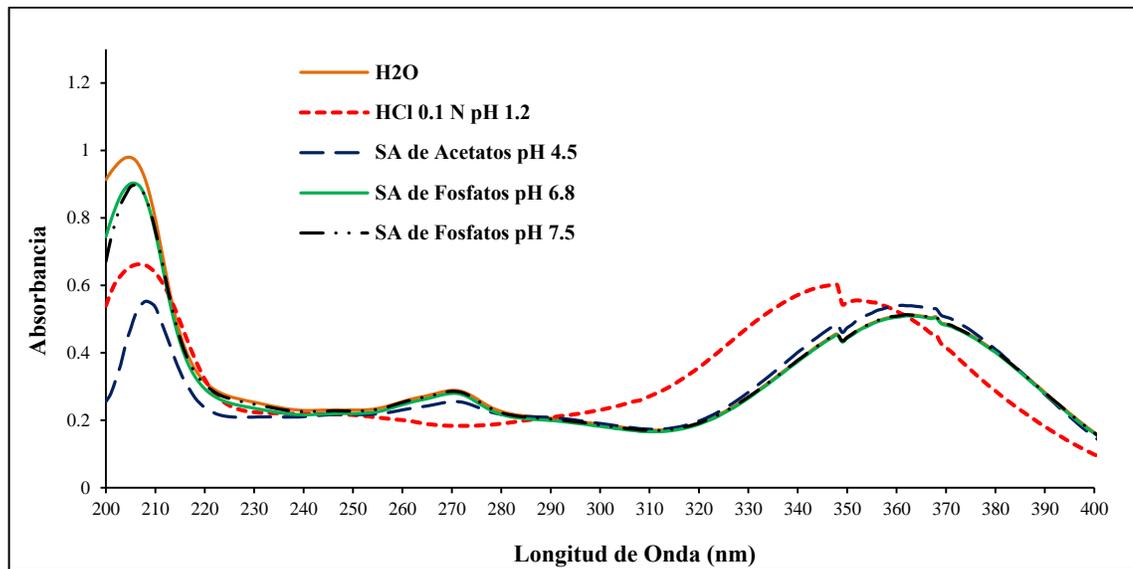
A pesar de las ventajas que posee un método analítico por espectrofotometría (rápido, preciso, versátil, fácil de usar y eficiente en costo), uno de los inconvenientes es que no resulta ser muy confiable para la cuantificación de compuestos en concentraciones por debajo del rango de linealidad del método.

Debido a que las formas farmacéuticas de Meloxicam de uso veterinario implicadas en este estudio contienen solamente 1.0 mg de activo, en los ensayos de disolución las concentraciones que se pretendía analizar eran del orden de 2.0  $\mu\text{g/mL}$  o inferiores, dado que ninguno de los métodos espectrofotométricos reportados permite cuantificar confiablemente estas concentraciones fue necesario desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) en fase reversa.

#### 1.1. Selección de las condiciones óptimas de trabajo

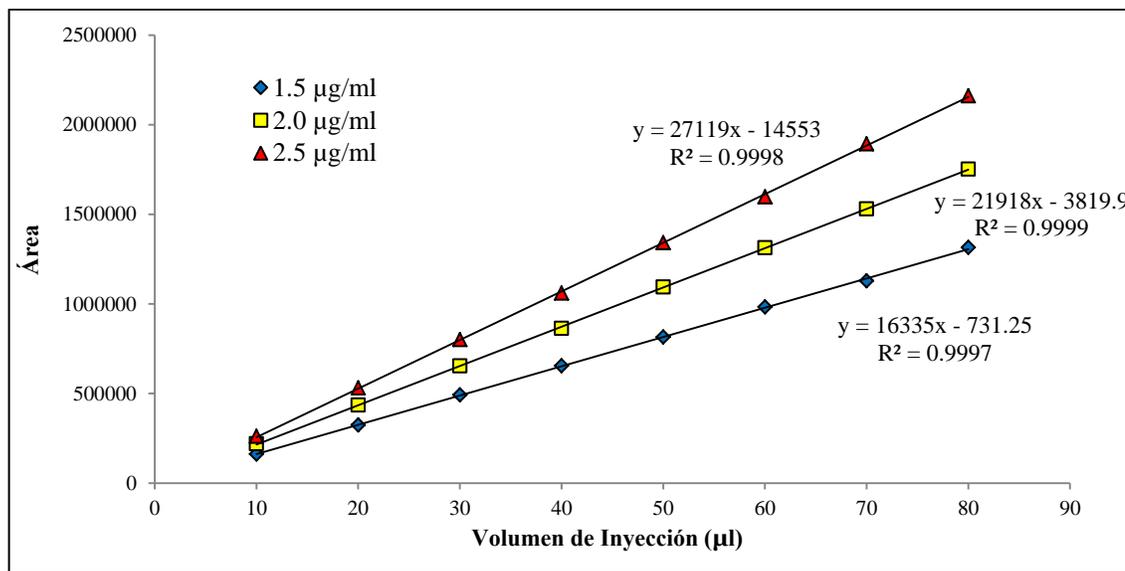
Mediante el barrido espectrofotométrico de una solución estándar de Meloxicam preparada en diferentes valores de pH se determinó la longitud de onda de máxima absorción del analito. En el siguiente gráfico se observa el comportamiento espectrofotométrico de la molécula del Meloxicam en función de la longitud de onda en distintos valores de pH.

La longitud elegida fue 362 nm, ya que es la longitud de onda de máxima absorción y con la cual es posible obtener una señal óptima.



**Gráfico 1. Espectro de Absorción en el intervalo 200 – 400 nm para una solución de Meloxicam (10 µg/mL) en diferentes medios.**

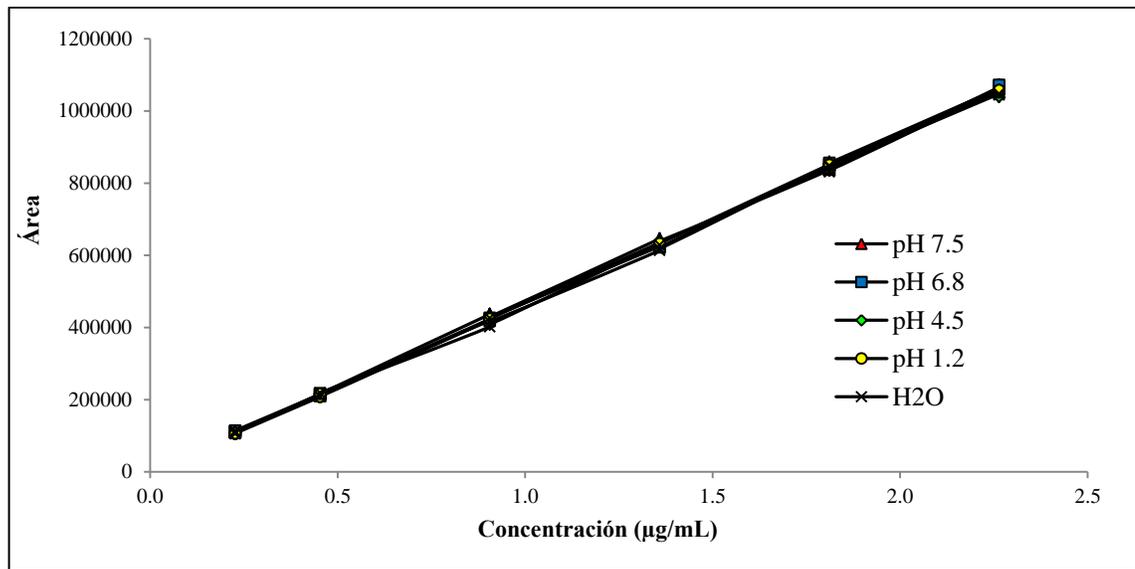
Para seleccionar el volumen de inyección óptimo se inyectaron diferentes volúmenes de una solución estándar de Meloxicam con tres concentraciones diferentes. Como se puede observar en el siguiente gráfico, la relación entre el área del pico cromatográfico y el volumen de inyección sigue una relación lineal, por lo que un volumen de inyección de 50 µl es suficiente para obtener valores de área adecuados.



**Gráfico 2. Respuesta analítica (Área de pico) obtenida con diferentes volúmenes de inyección de una solución estándar de Meloxicam a tres niveles de concentración.**

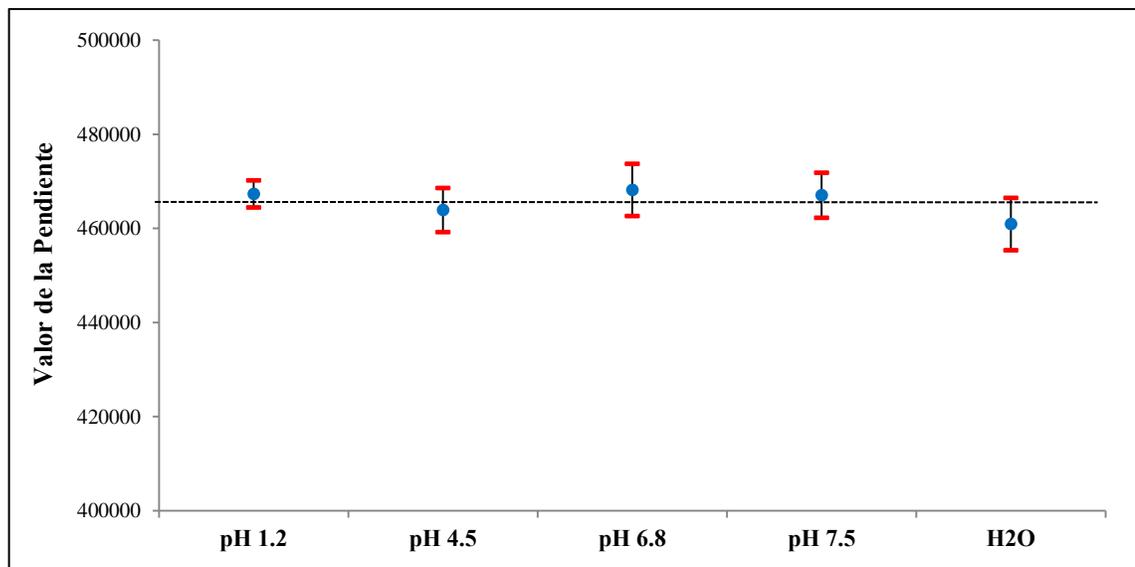
Se evaluó también la influencia del medio en el que se encontraba la muestra de Meloxicam. Para ello se prepararon cinco curvas de calibración en diferentes medios. Se utilizó buffer de cloruros pH 1.2, buffer de acetatos pH 4.5, buffer de fosfatos pH 6.8, buffer de fosfatos pH 7.5 y agua como medio. Se realizó el análisis de regresión de cada curva de calibración y la comparación se realizó utilizando los intervalos de confianza de la pendiente de cada una de las curvas de calibración.

En el gráfico 3 se demuestra que el medio en el que se encuentra el analito no influye en la linealidad ya que todas las calibraciones cumplieron con los parámetros de aceptación establecidos; es decir, el coeficiente de variación de la relación Área/Concentración fue menor de 1.5, el coeficiente de determinación y el de correlación mayores de 0.99 y el intervalo de confianza del intercepto incluyó al cero.



**Gráfico 3. Curva de calibración de Meloxicam en diferente medio de disolución.**

Para corroborar que la diferencia entre en el valor de la pendiente de las curvas de calibración en los diferentes medios no era significativa, se utilizaron los intervalos de confianza al 95%. En el siguiente gráfico se puede observar que e los intervalos de confianza de la pendientes en todos los medios se traslapa de forma horizontal.



**Gráfico 4. Intervalos de confianza de la pendiente de las diferentes curvas de calibración para evaluar la influencia del medio en que se encontraba soluble la muestra de Meloxicam analizada.**

Las condiciones cromatográficas finales se resumen en la tabla 12, mientras que los cromatogramas típicos de la solución estándar de Meloxicam y de la muestra se presentan en la figura 28(a) y 28(b) respectivamente.

**Tabla 12. Especificaciones del Método por CLAR desarrollado.**

Parámetro del Método	Descripción
Método de ensayo	Cromatografía de líquidos de alta presión <sup>(USP 32 2008)</sup>
Equipo	HPLC VWR Hitachi serie Elite LaChrom. Automuestreador termostatzado L-2200 con capacidad para 200 muestras. Bomba cuaternaria en régimen de baja presión L-2130. Horno para columnas termostatzado L-2300, desde 15°C por debajo de la temperatura ambiente hasta 65°C. Detector UV L-2400 con rango de longitudes de onda de: 190-600 nm.
Columna	Marca: Symmetry Shield, Waters Material: Acero inoxidable Longitud: 150 mm Diámetro interno: 3.9 mm
Fase estacionaria	RP C18, 5µm
Fase móvil	Metanol 600 mL Agua 396 mL Ácido trifluoroacético 4 mL
Preparación de la fase móvil	Mezclar el ácido trifluoroacético con el agua, adicionar el metanol y homogenizar. Desgasificar por ultrasonido
Programación de solvente	Isocrático
Volumen de inyección	50 µL
Flujo	1.5 mL/min
Tiempo de corrida	6 min
Detección	UV a 362 nm
Software	Agilent EZChrom Elite

Bajo estos parámetros se puede observar en los cromatogramas correspondientes que la fase móvil resolvió el Meloxicam con gran eficiencia, con un tiempo de retención de 3.5 minutos. Esto se debe a que la cromatografía que se está empleando es la de fase reversa (una fase móvil polar), lo que hace que la retención del Meloxicam sea menor. Otro aspecto que se debe de considerar es el valor de su constante de partición, el cual es de 3.43<sup>(Moffat,</sup>

Osselton et al. 2004) lo que indicaría una gran afinidad del Meloxicam por la fase estacionaria, sin embargo el valor de su constante de partición va disminuyendo a medida que disminuye el pH<sup>(Luger, Daneck et al. 1996)</sup>, de forma que la acidificación de la fase móvil logró disminuir la afinidad del Meloxicam por la fase estacionaria y disminuir así el tiempo de retención.

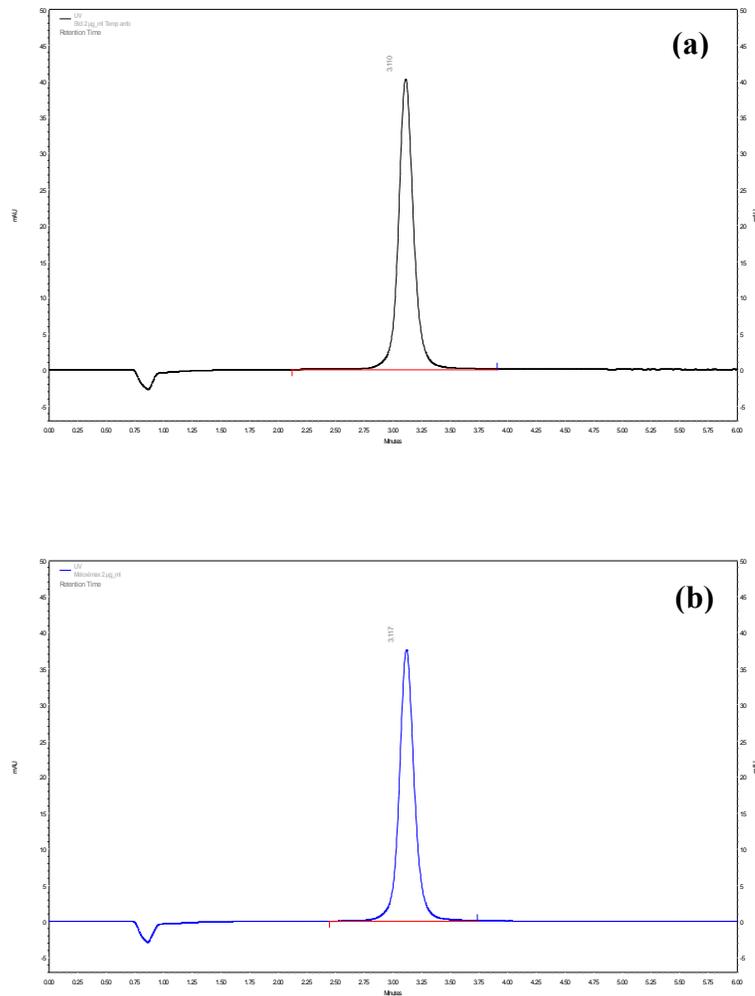


Figura 13. (a) Cromatograma típico de la solución estándar de Meloxicam. (b) Cromatograma típico de la muestra de análisis de Meloxicam.

## 2. Validación del Método Analítico

### 2.1. Adecuabilidad del Sistema

Cómo valores óptimos se considera que la adecuabilidad del sistema debe tener una variación en área menor al 2%<sup>(CNQFB)</sup> un factor de capacidad ( $K'$ ) mayor a 2 y un factor de coleo (T) menor a 2.

En la tabla 13 se muestra que todos los parámetros cumplen con los criterios de aceptación.

**Tabla 13. Resultados de la adecuabilidad del sistema.**

No. de inyección	$t_R$ (min)	Área de pico	Coleo	NPT
1	3.577	928648	0.96	944
2	3.550	915958	0.96	954
3	3.540	926502	0.96	957
4	3.523	926669	0.96	933
5	3.510	923933	0.96	956
6	3.500	919438	0.96	951
<b>Promedio</b>	<b>3.25</b>	<b>923524.67</b>	<b>0.96</b>	<b>949.17</b>
<b>DE</b>	<b>0.00</b>	<b>4881.02</b>	<b>0.00</b>	<b>9.20</b>
<b>CV (%)</b>	<b>0.13</b>	<b>0.53</b>	<b>0.29</b>	<b>0.97</b>

El factor de capacidad que se determinó para el método descrito es de 3.73, un valor adecuado según lo recomendado por las guías de validación ( $K' > 2$ )<sup>(CNQFB)</sup>.

### 2.2. Linealidad del Sistema

En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de la linealidad del sistema.

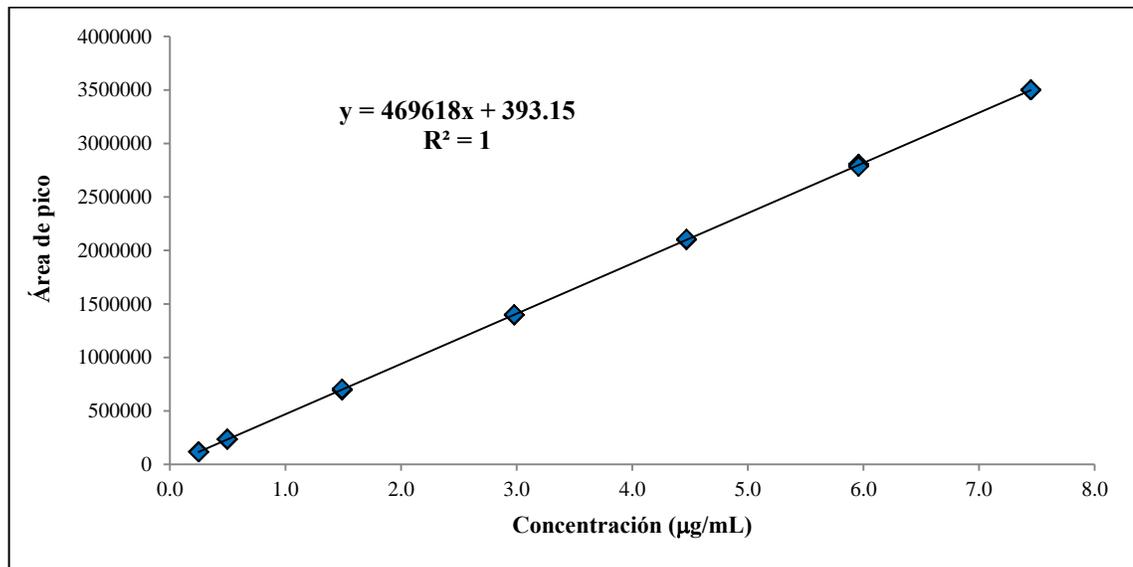
Tabla 14. Resultados de la linealidad del sistema.

Nivel	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área de pico	Área/Concentración
1	0.2483	117978	475238.67
	0.2483	118287	476483.38
	0.2483	116044	467448.14
2	0.4965	235018	473349.45
	0.4965	234142	471585.10
	0.4965	236739	476815.71
3	1.4895	694073	465977.17
	1.4895	695289	466793.55
	1.4895	704410	472917.09
4	2.9790	1398113	469322.93
	2.9790	1396018	468619.67
	2.9790	1398622	469493.79
5	4.4685	2100961	470171.42
	4.4685	2099660	469880.27
	4.4685	2105777	471249.19
6	5.9580	2793302	468832.16
	5.9580	2806568	471058.74
	5.9580	2784483	467351.96
7	7.4475	3499682	469913.66
	7.4475	3499991	469955.15
	7.4475	3499660	469910.71
		<b>Promedio</b>	<b>470588.95</b>
		<b>DE</b>	<b>2979.96</b>
		<b>CV (%)</b>	<b>0.6332</b>

Tabla 15. Parámetros estadísticos obtenidos del análisis de regresión para determinar la linealidad del sistema.

Parámetro	Valor
<b>r</b>	1.0000
<b>r<sup>2</sup></b>	1.0000
<b>b</b>	393.15
<b>m</b>	469617.95
<b>IC (b)</b>	-3242.29 a 4028.60
<b>IC (m)</b>	468748.31 a 470487.58

De acuerdo con los parámetros obtenidos de las ecuaciones de regresión (tabla 16) se puede observar que el 99% de la variación de la respuesta analítica está explicada por los cambios de concentración de Meloxicam. Como criterio de aceptación se tiene establecido que el valor de coeficiente de variación de la relación Concentración/Área debe ser menor al 2%<sup>(CNQFB)</sup> y el valor que se obtuvo fue de 0.633%. En el gráfico 5 se demuestra que existe una relación lineal entre la concentración del Meloxicam y la respuesta analítica (área del pico cromatográfico), se puede observar que el valor del coeficiente de determinación ( $r^2$ ) es mayor de 0.98 y en la tabla 16 se observa que el intervalo de confianza de la pendiente ( $b_1$ ) no incluye el cero; tal y como lo requiere la guía de validación<sup>(CNQFB)</sup>. El sistema demostró ser lineal el intervalo de concentraciones de 0.25 a 7.45  $\mu\text{g/mL}$ .



**Gráfico 5. Curva de calibración de Meloxicam para evaluar la linealidad del sistema.**

### 2.3. Precisión del Sistema

Los resultados obtenidos de los tres niveles de concentración por sextuplicado para evaluar la precisión del sistema se muestran en la siguiente tabla:

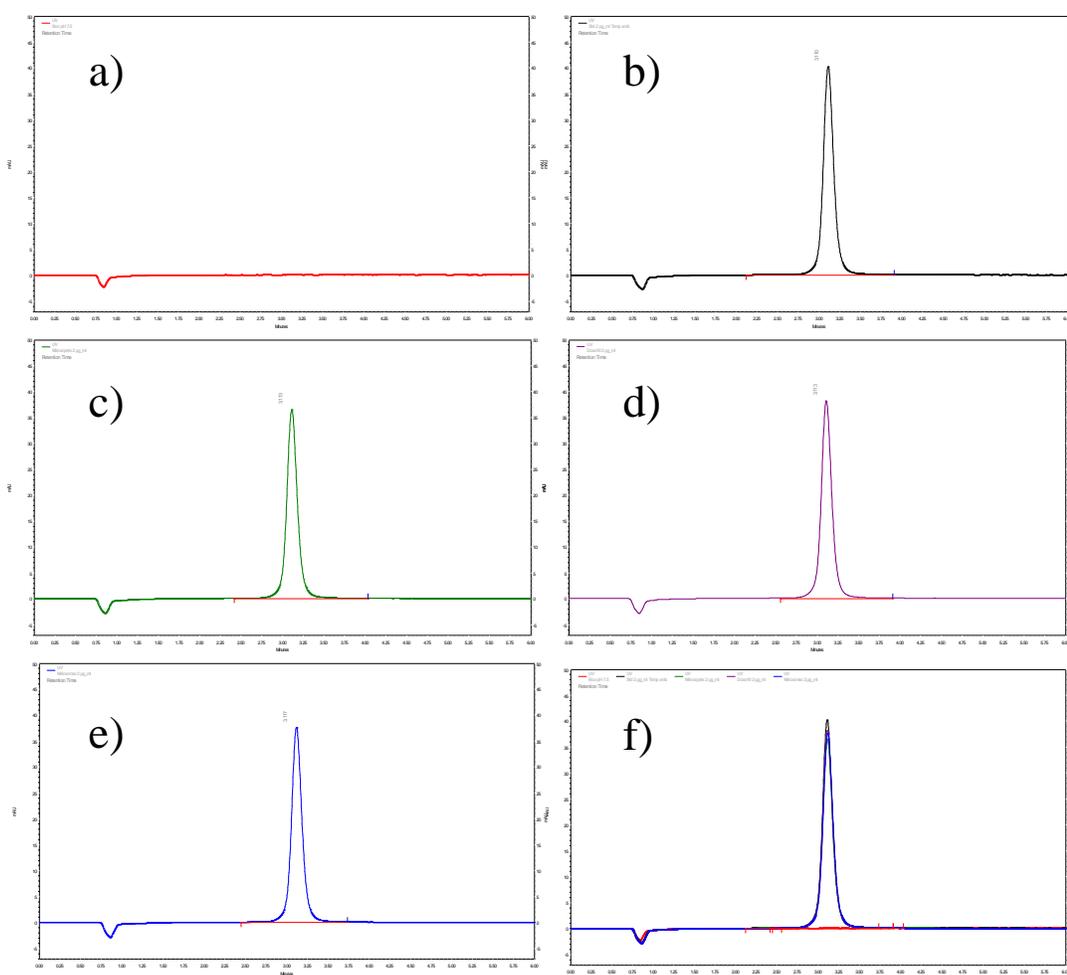
**Tabla 16. Resultados de la precisión del sistema.**

Nivel	Concentración (µg/mL)	Área de pico	Área/Concentración
1	0.2483	117978	475238.67
	0.2483	118287	476483.38
	0.2483	116044	467448.14
	0.2483	116991	471262.84
	0.2483	118472	477228.60
	0.2483	117189	472060.42
2	2.9790	1398113	469322.93
	2.9790	1396018	468619.67
	2.9790	1398622	469493.79
	2.9790	1416811	475599.53
	2.9790	1406123	472011.75
	2.9790	1399218	469693.86
3	7.4475	3499682	469913.66
	7.4475	3499991	469955.15
	7.4475	3499660	469910.71
	7.4475	3519827	472618.60
	7.4475	3498122	469704.20
	7.4475	3509182	471189.26
		<b>Promedio</b>	<b>471541.95</b>
		<b>DE</b>	<b>2846.85</b>
		<b>CV (%)</b>	<b>0.6037</b>

El sistema demostró ser preciso ya que el coeficiente de variación obtenido se encuentra dentro de los criterios de aceptación reportados en las guías de validación<sup>(CNQFB)</sup> ( $\leq 1.5\%$ ), por lo que se puede afirmar que la dispersión de los datos mínima y el sistema se considera preciso.

## 2.4. Especificidad del Método

Como se puede observar, en los cromatogramas no hay señal de sustancias que se encuentren presentes al mismo tiempo de retención que el analito y se demuestra que ningún excipiente es detectado bajo estas condiciones cromatográficas por lo que el método analítico se puede considerar selectivo, y por tanto específico para la cuantificación de Meloxicam.



**Figura 14. Cromatogramas de la prueba de especificidad del método. (a) Solución blanco, buffer de fosfatos pH 7.5; (b) Solución estándar de Meloxicam 2.0 µg/mL; (c) Solución de Meloxicam 2.0 µg/mL preparada utilizando el producto Meloxi Pet's (S)<sup>®</sup>; (d) Solución de Meloxicam 2.0 µg/mL preparada utilizando el producto Doxo 10<sup>®</sup>; (e) Solución de Meloxicam 2.0 µg/mL preparada utilizando el producto Meloximax 1<sup>®</sup>; (f) Superposición de todos los cromatogramas.**

## 2.5. Linealidad del Método

Los resultados de linealidad utilizando el método de adiciones patrón se muestran a continuación:

**Tabla 17. Concentraciones adicionadas, concentraciones recuperadas y porcentajes de recobro de los cinco niveles de concentración de Meloxicam utilizados para evaluar la linealidad del método.**

Nivel	Concentración Adicionada (µg/mL)	Concentración Recuperada (µg/mL)	% Recobro
1	0.0798	0.0795	99.54
	0.0798	0.0794	99.46
	0.0798	0.0812	101.65
2	0.2395	0.2400	100.22
	0.2395	0.2439	101.83
	0.2395	0.2397	100.06
3	0.3992	0.4029	100.92
	0.3992	0.3972	99.51
	0.3992	0.3990	99.96
4	0.5589	0.5542	99.16
	0.5589	0.5597	100.16
	0.5589	0.5551	99.33
5	0.7185	0.7185	99.99
	0.7185	0.7156	99.59
	0.7185	0.7218	100.46
		<b>Promedio</b>	<b>100.12</b>
		<b>DE</b>	<b>0.8031</b>
		<b>CV (%)</b>	<b>0.8022</b>

En el gráfico 6 se muestra la relación lineal que existe entre la concentración adicionada y la concentración recuperada de Meloxicam utilizando el método de las adiciones patrón. A continuación se muestra el análisis de regresión y se observa que el 99.9% de la variación de la concentración recuperada está explicada por los cambios en la concentración adicionada.

Tabla 18. Parámetros estadísticos del análisis de regresión para determinar la linealidad del método.

Parámetro	Valor
<b>r</b>	0.9999
<b>r<sup>2</sup></b>	0.9999
<b>b</b>	0.0011
<b>M</b>	0.9973
<b>IC (b)</b>	- 0.0019 a 0.0041
<b>IC (m)</b>	0.9908 a 1.0037

En el siguiente gráfico queda evidenciada la linealidad del método, se puede observar la relación lineal que existe entre la concentración adicionada y la concentración recuperada de Meloxicam.

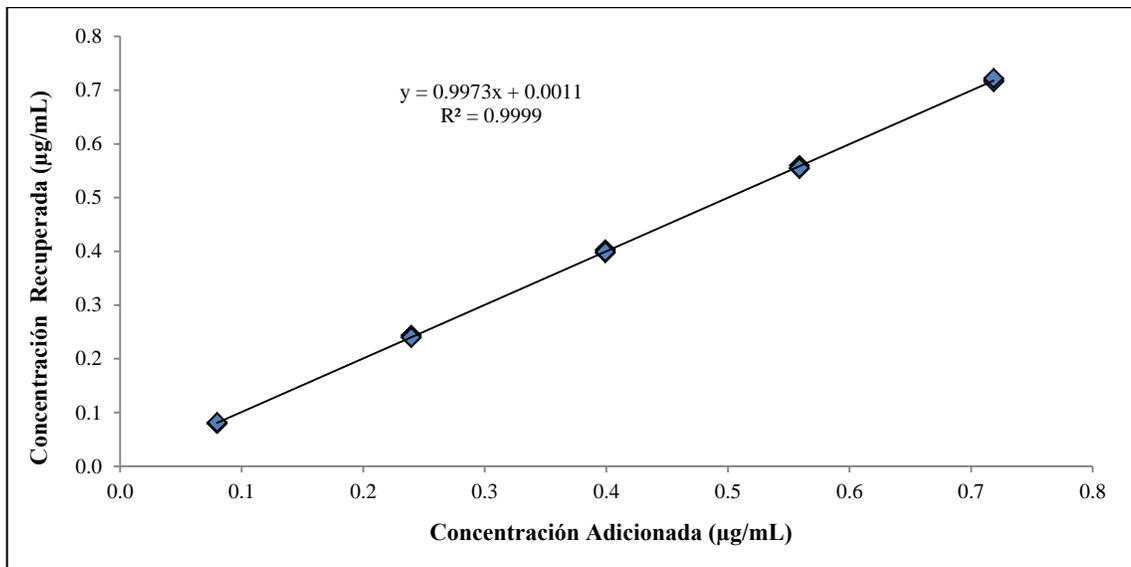


Gráfico 6. Concentración adicionada y recuperada de Meloxicam en cinco niveles de concentración mediante el método de adiciones patrón para evaluar linealidad del método.

Según la guía de validación, el intervalo de confianza de la pendiente debe incluir el 100% o el promedio aritmético del porcentaje de recobro debe ser de entre 98 al 102%<sup>(CNQFB)</sup> y el coeficiente de variación del porcentaje de recobro no debe ser mayor del 2%; criterios que se cumplen en su totalidad.

## 2.6. Precisión y Exactitud del Método

Para evaluar la precisión del método se analizaron tres niveles de concentración y estas fueron adicionadas con diferentes proporciones de un estándar de Meloxicam. Cada nivel se analizó por sextuplicado, los resultados se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 19. Porcentajes de recobro obtenidos para evaluar la precisión y exactitud del método.**

Nivel	Concentración Adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración Recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Recobro
1	0.0798	0.0795	99.5405
	0.0798	0.0794	99.4591
	0.0798	0.0812	101.6465
	0.0798	0.0803	100.5752
	0.0798	0.0805	100.8698
	0.0798	0.0793	99.3028
2	0.3992	0.4029	100.9245
	0.3992	0.3972	99.5096
	0.3992	0.3990	99.9553
	0.3992	0.4011	100.4888
	0.3992	0.3978	99.6558
	0.3992	0.4049	101.4381
3	0.7185	0.7185	99.9907
	0.7185	0.7156	99.5910
	0.7185	0.7218	100.4561
	0.7185	0.7280	101.3110
	0.7185	0.7236	100.7055
	0.7185	0.7169	99.7782
		<b>Promedio</b>	<b>100.29</b>
		<b>DE</b>	<b>0.7456</b>
		<b>CV (%)</b>	<b>0.7435</b>

**Tabla 20. Parámetros estadísticos del análisis de regresión para determinar la exactitud del método.**

Parámetro	Valor
<b>r</b>	0.9999
<b>r<sup>2</sup></b>	0.9999
<b>b</b>	-2.50E-05

**Tabla 20. Continuación.**

<b>m</b>	1.0031
<b>IC (b)</b>	- 0.0029 a 0.0028
<b>IC (m)</b>	0.9972 a 1.0091

La exactitud del método se evaluó con el coeficiente de variación global, el cual tiene un valor de 0.7435%, que se encuentra dentro del criterio de aceptación establecido ( $CV \leq 2\%$ )<sup>(CNQFB)</sup>, además de que el intervalo de confianza de la pendiente incluye el 100% y el promedio aritmético del porcentaje de recobro se encuentra en el intervalo de 98 a 102%<sup>(CNQFB)</sup>.

Los parámetros estadísticos estimados para determinar la precisión del método se muestran en la tabla 22, y se puede observar que los valores del coeficiente de variación obtenidos para cada nivel de concentración están dentro del criterio de aceptación establecido ( $CV \leq 2\%$ )<sup>(CNQFB)</sup>. Por lo tanto se puede afirmar que la dispersión de los datos es mínima y por lo tanto el método puede ser considerado preciso.

**Tabla 21. Parámetros determinados para evaluar la precisión del método.**

<b>Nivel</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Promedio (% de Recobro)</b>	<b>DE (% de Recobro)</b>	<b>CV (% de Recobro)</b>
1	0.0798	100.23	0.9449	0.9427
2	0.3992	100.33	0.7582	0.7557
3	0.7185	100.31	0.6452	0.6432

## **2.7. Repetibilidad y Reproducibilidad del Método**

La repetibilidad y la reproducibilidad del método se evaluaron por medio de la estimación por triplicado de tres niveles de concentración de muestras de placebos adicionados. Las muestras fueron preparadas por dos analistas diferentes en dos diferentes días bajo las mismas condiciones. En la siguiente tabla se muestran los porcentajes de recobro de cada analista en cada uno de los días.

Tabla 22. Resultados de los porcentajes de recobro obtenidos para evaluar la repetibilidad y reproducibilidad del método.

Fuente de Variación		% Recobro	
		Analista 1	Analista 2
Día 1	Nivel 1	98.83	102.21
		102.62	99.30
		100.22	101.06
	Nivel 2	99.65	97.98
		101.50	101.65
		97.59	99.28
	Nivel 3	100.24	101.48
		101.17	99.39
		99.08	101.08
	<b>Promedio</b>		<b>100.10</b>
<b>DE</b>		<b>1.53</b>	<b>1.42</b>
<b>CV (%)</b>		<b>1.526</b>	<b>1.420</b>
Día 2	Nivel 1	101.17	99.16
		100.85	99.52
		97.91	102.10
	Nivel 2	100.22	99.77
		100.89	100.13
		100.24	99.45
	Nivel 3	100.38	100.23
		98.65	99.94
		100.52	100.19
	<b>Promedio</b>		<b>100.09</b>
<b>DE</b>		<b>1.09</b>	<b>0.85</b>
<b>CV (%)</b>		<b>1.090</b>	<b>0.851</b>

Valor Global	
<b>Promedio</b>	<b>100.16</b>
<b>DE</b>	<b>1.21</b>
<b>CV (%)</b>	<b>1.203</b>

El criterio de aceptación establecido para métodos cromatográficos es un coeficiente de variación menor al 2%<sup>(CNQFB)</sup>, como se puede observar en la tabla anterior el valor está dentro de las especificaciones por lo que el método se puede considerar reproducible.

Para determinar si existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos por los dos analistas en los dos diferentes días se realizó un Análisis de Varianza Anidado<sup>(Montgomery 2004)</sup>, en el cual se estableció como factor fijo el analista y como factor aleatorio el día. Los resultados obtenidos del Análisis de Varianza Anidado se muestran en la tabla 24. Este análisis estadístico se realizó debido a que los dos factores tienen una relación entre sí, que es el factor día con respecto a los dos analistas, porque el día se encuentra anidado con el analista, es decir D(A). El modelo utilizado fue el siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + A_i + D_{j(i)} + \varepsilon_{k(ij)}$$

En donde:

$y_{ijk}$  = Porcentaje de recobro

$\mu$  = Valor promedio

$A_i$  = Influencia del analista sobre el porcentaje de recobro

$D_{j(i)}$  = Influencia del día sobre el porcentaje de recobro

$\varepsilon_{k(ij)}$  = Error asociado a la medición

**Tabla 23. Análisis de Varianza Anidado para evaluar la repetibilidad y reproducibilidad del método considerando un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ .**

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculada	F crítica( $\alpha=0.05$ )	Valor de P
Analista	1	0.132	0.132	<b>0.551</b>	<b>18.513</b>	<b>0.535</b>
Día (Analista)	2	0.481	0.240	<b>0.153</b>	<b>3.295</b>	<b>0.859</b>
Error	32	50.240	1.570	-----	-----	-----
Total	35	50.853	-----	-----	-----	-----

Los resultados obtenidos del análisis de varianza indican que no hay diferencia significativa entre los porcentajes de recobro obtenidos por diferentes analistas (valor de P > 0.05), lo cual significa que el método analítico es reproducible y repetible entre analistas y entre días.

## 2.8. Estabilidad de la Muestra

En la siguiente tabla se presentan los resultados de estabilidad del Meloxicam durante un periodo de 24 horas a temperatura ambiente y a 37°C.

Tabla 24. Estabilidad de una solución de Meloxicam (2.0 µg/mL) a temperatura ambiente y a 37°C.

Tiempo	Área de Pico Cromatográfico	
	Temperatura Ambiente	37°C
30 min	1504685	1515976
60 min	1509882	1506109
90 min	1509901	1526761
180 min	1512904	1512705
24 hr	1509139	1507724
<b>Promedio</b>	<b>1509302</b>	<b>1513855</b>
<b>DE</b>	<b>2958.583</b>	<b>8215.468</b>
<b>CV (%)</b>	<b>0.196</b>	<b>0.543</b>

De los resultados de estabilidad que se presentan en la tabla anterior se observa que al analizar la misma muestra a diferentes tiempos y a diferentes temperaturas, el coeficiente de variación fue menor al 2%, lo que indica que el Meloxicam es estable en buffer de fosfatos pH 7.5 por al menos un periodo de 24 horas a temperatura ambiente y a 37°C. Los resultados del análisis de varianza indican que no hay diferencia significativa en la respuesta cromatográfica a las diferentes temperaturas (valor de  $P > 0.05$ ).

Tabla 25. Análisis de Varianza para evaluar la estabilidad de las muestras de Meloxicam a diferentes temperaturas considerando un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ .

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculada	F crítica( $\alpha=0.05$ )	Valor de P
Temperatura	1	51819969.6	51819969.6	<b>1.359</b>	<b>5.318</b>	<b>0.277</b>
Tiempo	8	304988516.8	38123564.6	-----	-----	-----
Total	9	356808486.4	-----	-----	-----	-----

## 2.9. Influencia del Filtro

El objetivo de evaluar el parámetro denominado Influencia del filtro es determinar que no exista adherencia del fármaco al filtro que se utiliza durante las pruebas de disolución y cuantificación del fármaco en el medicamento. Los resultados obtenidos al evaluar los 2 filtros se muestran en la tabla 26. Se observa que en todos los casos los coeficientes de variación fueron menores al 2%<sup>(SSA 2013)</sup>. Se demostró que el uso de cualquiera de estos dos tipos de filtro no influye significativamente sobre los resultados obtenidos en la cuantificación del Meloxicam, por lo que se pudieron utilizar los filtros de microfibras de vidrio para llevar a cabo el estudio de los perfiles de disolución del Aparato USP IV mientras que para los perfiles de disolución en el Aparato USP II se utilizaron los filtros de jeringa Minisart<sup>®</sup> NML.

**Tabla 26. Resultados del Área de Pico Cromatográfico utilizando los dos tipos de filtro con tres niveles de concentración de Meloxicam: 0.1, 1.0 y 2.0 µg/mL.**

Muestra	Área del Pico Cromatográfico					
	Filtro de Microfibra de Vidrio Whatman <sup>®</sup> GF/C (2.7 µm)			Filtro de jeringa Minisart <sup>®</sup> NML (0.2 µm)		
	0.1 µg/mL	1.0 µg/mL	2.0 µg/mL	0.1 µg/mL	1.0 µg/mL	2.0 µg/mL
Sin Filtrar	46381	451405	908088	46284	450951	898084
1	45851	449788	892129	45890	450396	900270
2	46272	450914	899231	46293	447479	907853
3	46298	451248	900716	46326	451029	900112
4	45955	447100	897323	46004	450654	907705
5	45723	451154	900287	45729	451175	901827
6	46111	449923	898122	46227	448647	894505
<b>Promedio</b>	<b>46084.43</b>	<b>450218.86</b>	<b>899413.71</b>	<b>46107.57</b>	<b>450047.29</b>	<b>901479.43</b>
<b>DE</b>	<b>248.77</b>	<b>1517.91</b>	<b>4775.67</b>	<b>234.12</b>	<b>1420.02</b>	<b>4882.03</b>
<b>CV (%)</b>	<b>0.54</b>	<b>0.34</b>	<b>0.53</b>	<b>0.51</b>	<b>0.32</b>	<b>0.54</b>

### 3. Perfil de Solubilidad-pH del Meloxicam

La solubilidad acuosa del Meloxicam a diferentes valores de pH se presenta en la tabla 27, y en el gráfico 7 se puede observar la dependencia que tiene su solubilidad del pH del medio de disolución, lo cual está relacionado con sus propiedades fisicoquímicas. El Meloxicam es un fármaco ácido que presenta dos valores de  $pK_a$  (1.09 y 4.18) correspondientes a la ionización del grupo hidroxilo y la protonación del nitrógeno en el grupo tiazol respectivamente. Por lo tanto, en soluciones acuosas con valores de pH bajos, incrementa la fracción no ionizada y por ende disminuye la solubilidad. Cuando el pH es mayor a 4.18 el fármaco se encuentra en su forma ionizada y la especie dominante es la aniónica, como se muestra en la Figura 15.

Tabla 27. Valores promedio de la Solubilidad acuosa del Meloxicam a diferentes valores de pH, (n=3).

Buffer	pH (inicio)	pH (filtrado)	Solubilidad ( $\mu\text{g/mL}$ )	Solubilidad (mg/100 mL)
Cloruros	1.227	1.212	$0.562 \pm 0.0111$	$0.056 \pm 0.0011$
Acetatos	4.495	4.484	$0.750 \pm 0.0376$	$0.075 \pm 0.0038$
Fosfatos	6.806	6.795	$117.210 \pm 2.1943$	$11.721 \pm 0.2194$
Fosfatos	7.513	7.481	$522.705 \pm 19.8883$	$52.271 \pm 1.9888$
Boratos	8.808	8.440	$2717.631 \pm 41.3314$	$271.763 \pm 4.1331$

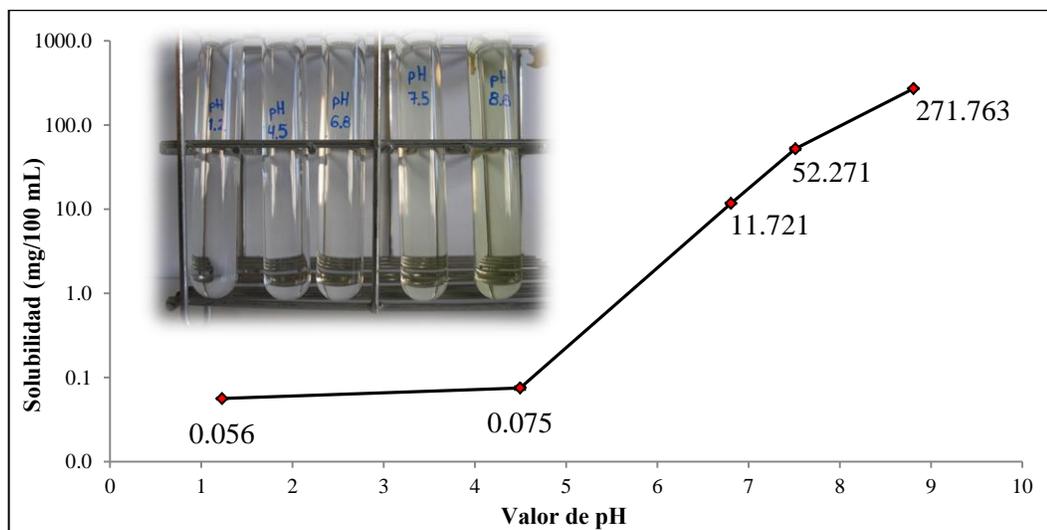


Gráfico 7. Perfil de pH-Solubilidad del Meloxicam, (Promedio  $\pm$  DE, n=3).

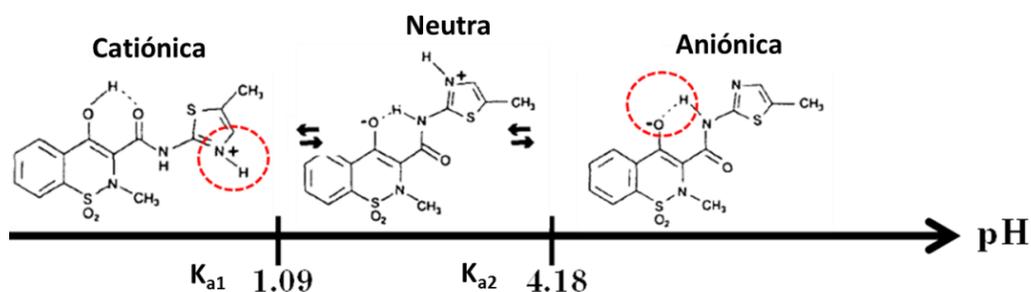


Figura 15. Equilibrio Prototrópico del Meloxicam.

Debido a su baja solubilidad en medio acuoso, el Meloxicam se encuentra clasificado dentro del grupo II del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB)<sup>(Kasim, Whitehouse et al. 2003, Lindenberg, Kopp et al. 2004, Yazdanian, Briggs et al. 2004, Laboratories 2013)</sup>. En consecuencia la disolución se convierte en el factor limitante para la absorción del fármaco<sup>(G. and G. 2011)</sup>. A pesar de ser considerado un fármaco de clase II, bajo condiciones intestinales fisiológicas (pH 7.5), el Meloxicam se encuentra en su forma aniónica y por lo tanto su solubilidad se incrementa considerablemente; esto es de particular interés porque bajo estas condiciones de pH el Meloxicam podría ser considerado un potencial candidato para presentar correlación *in vitro-in vivo*<sup>(Lu, Kim et al. 2011, Sakore and Chakraborty 2011)</sup>.

Hay que hacer notar que el SCB, toma como base y está fundamentado en las condiciones fisiológicas de los humanos, por lo que la clasificación de fármacos para uso veterinario tendría que tener en cuenta las condiciones fisiológicas de cada especie a la que está destinado el fármaco<sup>(Martinez, Amidon et al. 2002)</sup>.

#### 4. Disolución Intrínseca y Aparente del Meloxicam

En el gráfico 8 se muestra el perfil de disolución del Meloxicam, manteniendo el área expuesta permanente constante<sup>(USP 32 2008)</sup>, utilizando el aparato de Wood. El valor experimental de la constante de disolución intrínseca en diferentes medios de disolución se muestra en la tabla 28.

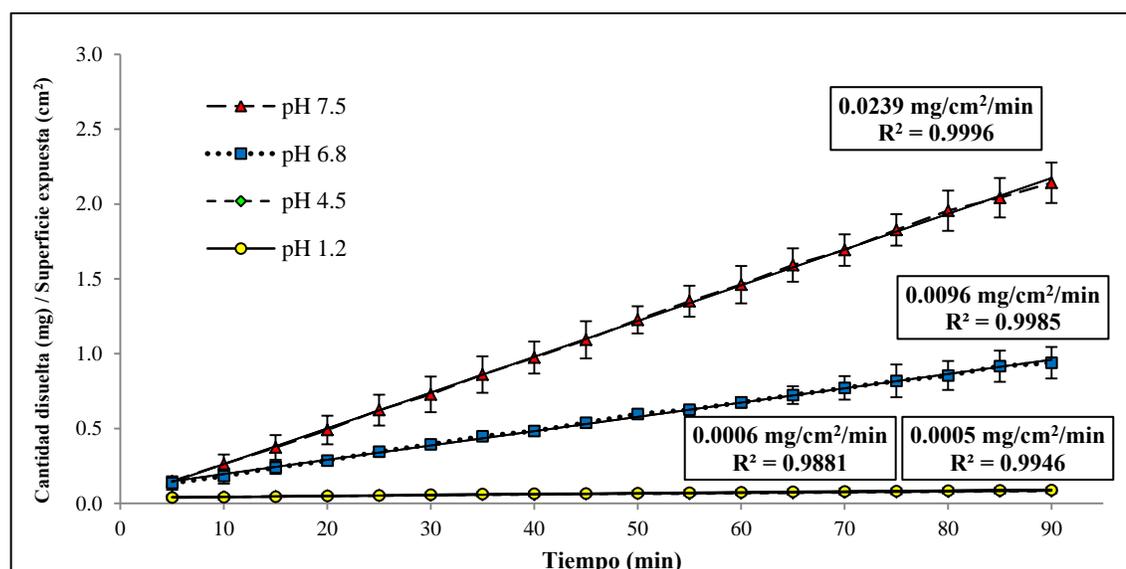


Gráfico 8. Velocidad de Disolución Intrínseca del Meloxicam a diferentes valores de pH (Promedio  $\pm$  DE, n=3).

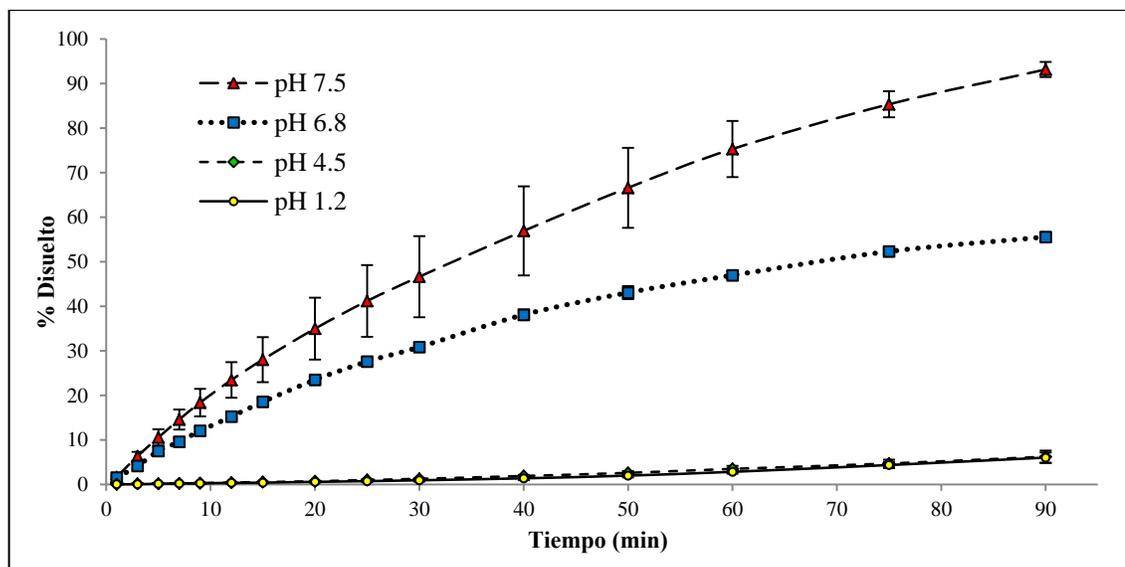
Tabla 28. Constante de Velocidad de Disolución Intrínseca del Meloxicam en diferentes Medios de Disolución (Promedio  $\pm$  DE, n=3).

Constante de Velocidad de Disolución Intrínseca (mg/cm <sup>2</sup> /min)	
Buffer de cloruros pH 1.2	0.0006 $\pm$ 0.0002
Buffer de acetatos pH 4.6	0.0005 $\pm$ 0.0001
Buffer de fosfatos pH 6.8	0.0096 $\pm$ 0.0021
Buffer de fosfatos pH 7.5	0.0239 $\pm$ 0.0009

Algunos autores consideran la velocidad de disolución intrínseca como una alternativa viable para la determinación de la clase de solubilidad a la que pertenecen los fármacos,

teniendo como ventajas el tiempo de obtención de los resultados, la cantidad de material requerido, así como la manipulación y el tratamiento de las muestras<sup>(G. and G. 2011)</sup>. En este caso, al igual que en el perfil de pH-Solubilidad (gráfico 7), se observa el incremento en la velocidad de disolución del Meloxicam conforme se incrementa el valor de pH del medio de disolución.

Los resultados de disolución aparente empleando el Aparato IV de la USP, se presentan en el gráfico 8. Se puede observar que el pH del medio de disolución juega un papel fundamental en la velocidad de disolución del Meloxicam. Esto es de gran interés debido a que la absorción del Meloxicam está limitada por su velocidad de disolución, si ésta es lenta o incompleta, el nivel sanguíneo que alcanzará será bajo e insuficiente para lograr un efecto terapéutico adecuado.



**Gráfico 9. Velocidad de Disolución Aparente del Meloxicam a diferentes valores de pH (Promedio  $\pm$  DE, n=3).**

## 5. Análisis de los Atributos de Calidad de los Productos Bajo Estudio

La caracterización y comparación de los productos utilizados se llevó a cabo mediante la evaluación de las siguientes pruebas de calidad: variación de peso, diámetro y espesor, friabilidad, dureza, tiempo de desintegración, valoración y uniformidad de contenido; las cuales respaldan el resto de los resultados obtenidos en los ensayos de disolución.

Para la selección de los ensayos se recurrió a la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica. Los resultados obtenidos aplican exclusivamente a los lotes analizados.

### 5.1. Identificación del Principio Activo

La farmacopea indica que se puede realizar mediante espectroscopía de absorción en el infrarrojo o en el ultravioleta<sup>(USP 35 2012)</sup>. Se utilizó la espectroscopía de absorción en la región ultravioleta, en un rango de longitudes de onda que va de 200 a 400 nm. Se obtuvo el espectro de absorción de cada uno de los productos y de los lotes analizados en este rango de longitudes de onda y se compararon con el espectro de una solución preparada con el estándar de Meloxicam. Todas las soluciones se prepararon de forma tal que contuvieran 10 µg/mL de Meloxicam. Los resultados se muestran en el gráfico 10.

El espectro de absorción ultravioleta del Meloxicam reportado en la literatura<sup>(Moffat, Osselton et al. 2004)</sup> se muestra en la figura 16. Se puede observar que el espectro de absorción obtenido con cada uno de los productos y lotes analizados es igual al espectro de absorción obtenido a partir de una solución estándar de Meloxicam, así como al espectro de absorción reportado en la literatura para el Meloxicam. Por lo cual, se puede concluir que todos los productos analizados incluyen dentro de su formulación al Meloxicam como principio activo.

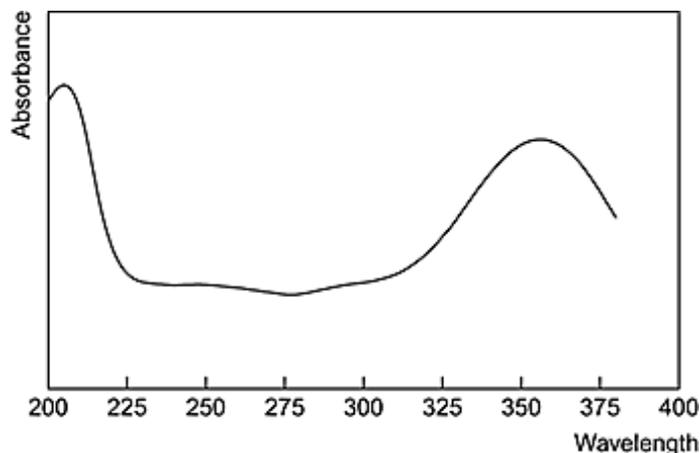


Figura 16. Espectro de Absorción Ultravioleta reportado en la literatura<sup>(Moffat, Osselton et al. 2004)</sup> en el intervalo 200 a 400 nm de una solución de Meloxicam (10 µg/mL).

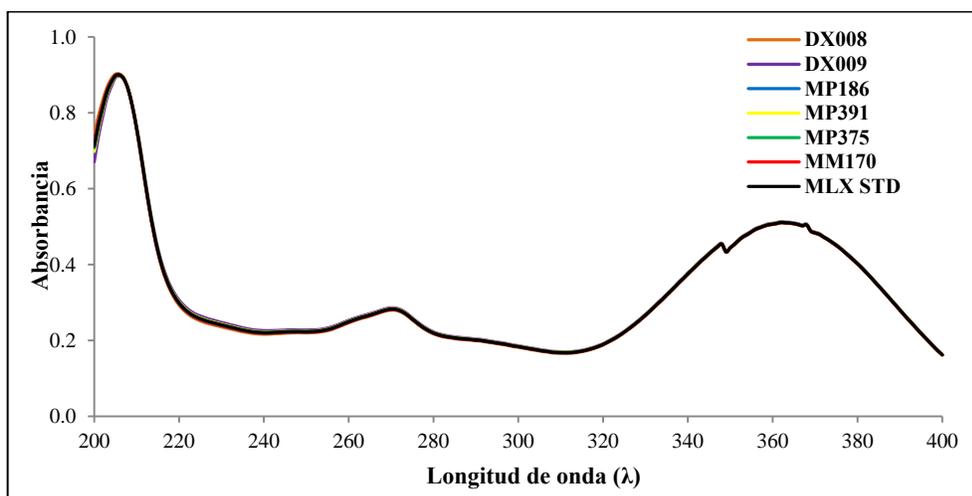


Gráfico 10. Espectro de Absorción Ultravioleta en el intervalo 200 – 400 nm de una solución de Meloxicam (10 µg/mL) y de los productos evaluados.

## 5.2. Peso promedio

Utilizando los resultados de esta prueba se puede estimar la uniformidad de dosis si el contenido de fármaco dentro de los comprimidos representa del 50 al 100% del peso total de los mismos. En este caso el contenido de fármaco en los comprimidos está muy por

debajo de este intervalo (solamente contienen 1 mg de Meloxicam), de forma que esta prueba se utilizó solamente como criterio de calidad y de reproducibilidad en el proceso de fabricación de los productos evaluados ya que grandes variaciones en el peso de los comprimidos pueden ser causadas por problemas en el proceso de granulación o problemas mecánicos durante la compresión.

**Tabla 29. Variación de peso de los comprimidos de Meloxicam evaluadas.**

Observación	Meloxi Pet's (S) <sup>®</sup>			Doxo 10 <sup>®</sup>		Meloximax <sup>®</sup>
	MP375	MP186	MP391	DX008	DX009	MM170
1	158.7	151.8	153.8	288.7	279.7	666.8
2	154.8	154.2	155.9	290.5	290.7	668.8
3	156.9	152.9	157.5	298.3	289.8	666.8
4	154.3	157.0	154.4	296.3	286.6	672.6
5	160.1	152.1	155.5	288.9	282.0	664.9
6	156.0	156.2	158.3	294.7	287.3	677.0
7	158.4	158.6	154.8	296.3	284.5	659.7
8	158.7	156.3	154.8	295.3	293.4	660.9
9	157.4	155.6	158.0	279.0	283.4	650.8
10	155.2	154.2	159.5	291.2	291.0	667.6
11	153.1	155.0	158.2	290.1	286.8	662.8
12	153.3	155.3	153.4	291.5	284.5	662.0
13	159.4	153.3	159.2	288.1	292.2	664.2
14	159.3	154.9	155.9	295.2	289.2	661.3
15	153.1	157.3	153.8	288.0	288.6	654.7
16	154.0	154.6	154.0	289.7	294.0	673.2
17	158.3	153.3	157.3	285.9	285.8	661.9
18	152.7	158.8	157.7	292.8	282.6	648.0
19	157.0	152.3	152.8	287.5	287.0	672.7
20	159.8	153.4	153.7	284.0	290.2	675.8
<b>Promedio</b>	<b>156.530</b>	<b>154.854</b>	<b>155.921</b>	<b>290.600</b>	<b>287.465</b>	<b>664.625</b>
<b>DE</b>	<b>2.526</b>	<b>2.056</b>	<b>2.116</b>	<b>4.706</b>	<b>3.925</b>	<b>7.777</b>
<b>CV (%)</b>	<b>1.614</b>	<b>1.328</b>	<b>1.357</b>	<b>1.619</b>	<b>1.365</b>	<b>1.170</b>

Como se puede observar en la tabla 30, el coeficiente de variación que hay en cada lote evaluado no es mayor del 2%, por lo que podemos asumir que el proceso de fabricación de los diferentes productos evaluados es consistente y reproducible. Las diferencias en el peso promedio de las diferentes marcas de comprimidos se pueden observar en el gráfico 11 y se deben principalmente al tamaño y la cantidad de excipientes que contiene cada uno de los

productos. Se observa que el peso promedio y, por ende, la cantidad de excipientes que contiene el producto Meloximax<sup>®</sup> es mucho mayor en comparación con los productos Doxo 10<sup>®</sup> y Meloxi Pet's (S)<sup>®</sup>.

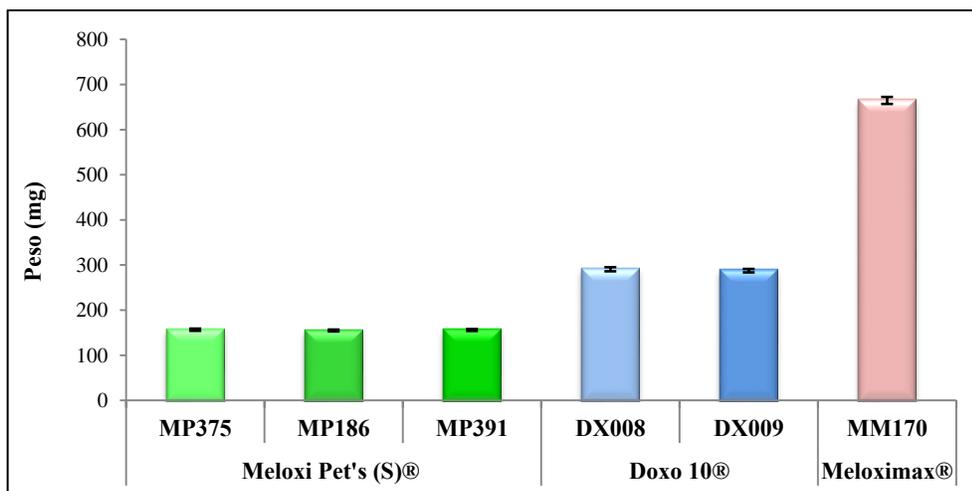


Gráfico 11. Valores promedio del peso de los comprimidos de las diferentes marcas y lotes evaluados, (DE, n=20).

### 5.3. Tamaño (Diámetro y Espesor)

En las tablas 30 y 31 se muestran los resultados de las mediciones del diámetro y el espesor de las diferentes marcas y lotes de comprimidos evaluados. Se puede observar que las diferencias entre las marcas evaluadas se deben principalmente a las dimensiones y al formato de punzón utilizado para su fabricación, lo cual resulta en comprimidos de diferente forma y diferente tamaño, tal como se puede observar en la siguiente figura.



Figura 17. Diferencias en las dimensiones de diámetro y espesor de los diferentes productos evaluados.

Tabla 30. Evaluación del diámetro de los comprimidos de Meloxicam.

Observación	Meloxi Pet's (S) <sup>®</sup>			Doxo 10 <sup>®</sup>		Meloximax <sup>®</sup>
	MP375	MP186	MP391	DX008	DX009	MM170
1	7.1	7.1	7.1	11.4	11.4	13.3
2	7.1	7.1	7.1	11.4	11.4	13.3
3	7.1	7.1	7.1	11.4	11.4	13.3
4	7.1	7.1	7.1	11.4	11.4	13.3
5	7.1	7.1	7.1	11.4	11.4	13.3
6	7.1	7.1	7.1	11.4	11.4	13.3
7	7.1	7.1	7.1	11.4	11.4	13.3
8	7.1	7.1	7.1	11.4	11.4	13.3
9	7.1	7.1	7.1	11.4	11.4	13.3
10	7.1	7.1	7.1	11.4	11.4	13.3
11	7.1	7.1	7.1	11.4	11.4	13.3
12	7.1	7.1	7.1	11.4	11.4	13.3
13	7.1	7.1	7.1	11.4	11.4	13.3
14	7.1	7.1	7.1	11.4	11.4	13.2
15	7.1	7.1	7.1	11.5	11.4	13.3
16	7.1	7.1	7.1	11.4	11.4	13.3
17	7.1	7.1	7.1	11.4	11.4	13.3
18	7.1	7.1	7.1	11.4	11.4	13.3
19	7.1	7.1	7.1	11.4	11.4	13.3
20	7.1	7.1	7.1	11.4	11.4	13.3
<b>Promedio</b>	<b>7.1</b>	<b>7.1</b>	<b>7.1</b>	<b>11.4</b>	<b>11.4</b>	<b>13.3</b>
<b>DE</b>	<b>0.008</b>	<b>0.007</b>	<b>0.012</b>	<b>0.022</b>	<b>0.000</b>	<b>0.022</b>
<b>CV (%)</b>	<b>0.107</b>	<b>0.097</b>	<b>0.172</b>	<b>0.196</b>	<b>0.000</b>	<b>0.168</b>

Tabla 31. Evaluación del espesor de los comprimidos de Meloxicam.

Observación	Meloxi Pet's (S) <sup>®</sup>			Doxo 10 <sup>®</sup>		Meloximax <sup>®</sup>
	MP375	MP186	MP391	DX008	DX009	MM170
1	3.9	3.9	4.1	3.7	3.6	5.7
2	3.9	3.9	4.1	3.7	3.7	5.7
3	3.9	3.9	4.1	3.8	3.7	5.6
4	3.9	3.9	4.1	3.8	3.6	5.7
5	3.9	3.9	4.1	3.7	3.6	5.8
6	3.9	3.9	4.1	3.7	3.6	5.9
7	3.9	3.9	4.1	3.7	3.6	5.6
8	3.9	3.9	4.1	3.7	3.7	5.7
9	3.9	3.9	4.1	3.6	3.6	5.7
10	3.9	3.9	4.1	3.7	3.7	5.7
11	3.9	3.9	4.1	3.7	3.6	5.7
12	3.9	3.9	4.1	3.7	3.6	5.7

Tabla 31. Continuación.

13	3.9	3.9	4.1	3.7	3.7	5.7
14	3.9	3.9	4.1	3.6	3.6	5.7
15	3.9	3.9	4.1	3.6	3.6	5.7
16	3.9	3.9	4.1	3.6	3.7	5.7
17	3.9	3.9	4.1	3.7	3.6	5.7
18	3.9	3.9	4.1	3.7	3.6	5.6
19	3.9	3.9	4.1	3.6	3.6	5.8
20	3.9	3.9	4.1	3.7	3.6	5.7
<b>Promedio</b>	<b>3.9</b>	<b>3.9</b>	<b>4.1</b>	<b>3.7</b>	<b>3.6</b>	<b>5.7</b>
<b>DE</b>	<b>0.015</b>	<b>0.011</b>	<b>0.014</b>	<b>0.059</b>	<b>0.047</b>	<b>0.069</b>
<b>CV (%)</b>	<b>0.393</b>	<b>0.295</b>	<b>0.346</b>	<b>1.593</b>	<b>1.295</b>	<b>1.203</b>

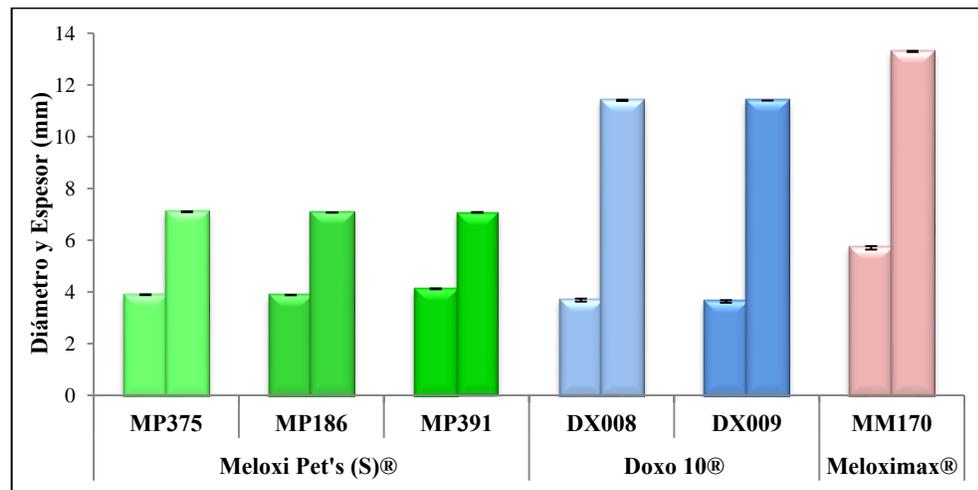


Gráfico 12. Valores promedio del diámetro y espesor de los comprimidos de las diferentes marcas y lotes evaluados (Promedio  $\pm$  DE, n=20).

Los resultados demuestran que hay ligeras variaciones en las dimensiones de cada lote evaluado (coeficientes de variación menores del 0.3%), las cuales no son perceptibles a simple vista.

## 5.4. Dureza

En el gráfico 13 se presenta el valor promedio de la dureza de los diferentes productos evaluados. Como se observa, la mayor dureza la presentan los comprimidos de la marca Doxo 10<sup>®</sup>, sin embargo, el mayor coeficiente de variación pertenece a los comprimidos de la marca Meloximax<sup>®</sup>.

Tabla 32. Evaluación de la dureza de los comprimidos de Meloxicam.

Observación	Meloxi Pet's (S) <sup>®</sup>			Doxo 10 <sup>®</sup>		Meloximax <sup>®</sup>
	MP375	MP186	MP391	DX008	DX009	MM170
1	8.5	11.0	6.7	20.7	20.8	9.2
2	8.3	9.6	6.5	20.7	22.3	12.0
3	7.7	8.5	7.8	18.4	20.7	10.4
4	10.0	10.5	6.4	20.8	20.9	9.1
5	10.1	9.1	7.9	22.2	20.8	10.2
6	11.0	11.2	6.9	18.3	22.8	8.3
7	9.9	9.8	7.0	21.3	19.7	15.4
8	10.5	10.2	6.8	19.4	19.4	10.2
9	7.9	9.5	6.4	19.6	19.6	8.9
10	8.9	9.0	6.7	20.1	21.3	9.4
<b>Promedio</b>	<b>9.3</b>	<b>9.8</b>	<b>6.9</b>	<b>20.2</b>	<b>20.8</b>	<b>10.3</b>
<b>DE</b>	<b>1.161</b>	<b>0.881</b>	<b>0.534</b>	<b>1.243</b>	<b>1.112</b>	<b>2.064</b>
<b>CV (%)</b>	<b>12.513</b>	<b>8.952</b>	<b>7.732</b>	<b>6.169</b>	<b>5.337</b>	<b>20.022</b>

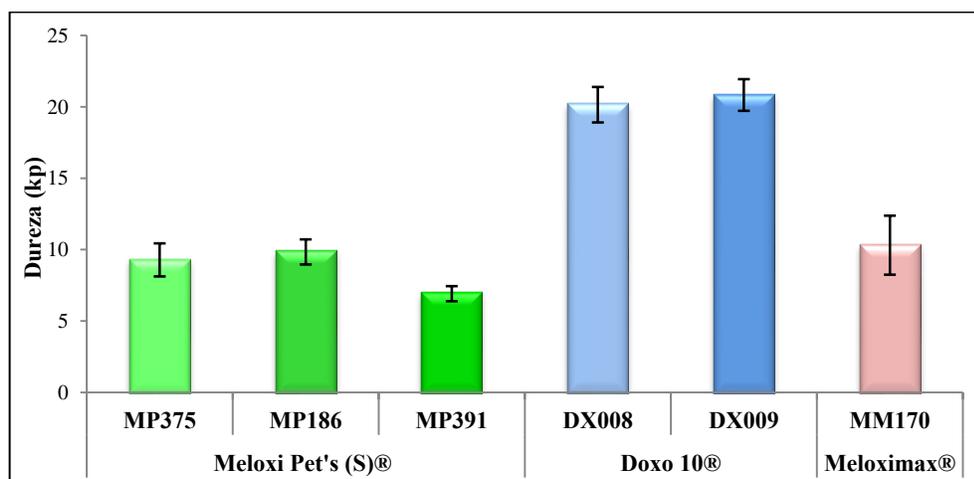


Gráfico 13. Valores promedio y desviación estándar de la dureza de los comprimidos de las diferentes marcas y lotes evaluados, (DE, n=10).

## 5.5. Friabilidad

Los resultados de la prueba de friabilidad mostrados en la tabla 34 indican una buena resistencia a la abrasión o al desgaste mecánico ya que el porcentaje de friabilidad de todos los productos y lotes evaluados se encontró muy por debajo del criterio máximo de aceptación (1%). Esto significa que los comprimidos evaluados son resistentes durante el proceso de manufactura, empaque, transporte y uso por parte del usuario, evitando así el desmoronamiento en los comprimidos, lo cual hace perder elegancia y aceptación por parte del usuario además de traer consigo problemas de uniformidad de dosis, especialmente para los comprimidos de menor tamaño.

Tabla 33. Porcentaje de Friabilidad de los comprimidos de Meloxicam.

Marca	Lote	Friabilidad (%)
Meloxi Pet's (S) <sup>®</sup>	MP375	0.019
	MP186	0.005
	MP391	0.052
Doxo 10 <sup>®</sup>	DX008	0.226
	DX009	0.222
Meloximax <sup>®</sup>	MM170	0.003

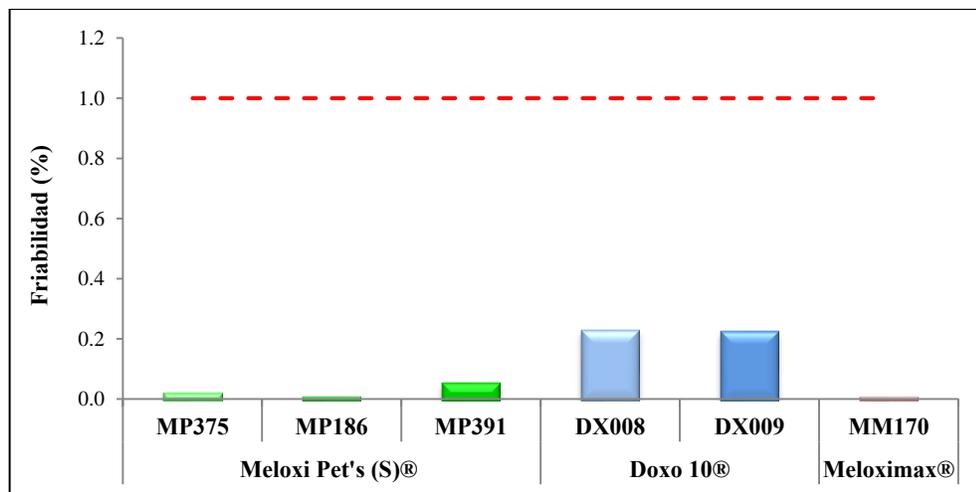


Gráfico 14. Evaluación de la friabilidad los comprimidos de las diferentes marcas y lotes evaluados (n=10). La línea punteada indica el criterio máximo de aceptación.

## 5.6. Tiempo de Desintegración

La tabla 35 muestra el tiempo requerido para que los seis comprimidos de cada una de las marcas y de los lotes estudiados se desintegraran. En ningún caso se sobrepasó el tiempo límite que es de 30 minutos.

Tabla 34. Tiempo de desintegración en minutos de los comprimidos de Meloxicam.

Marca	Lote	Tiempo de Desintegración (min)
Meloxi Pet's (S) <sup>®</sup>	MP375	2.50
	MP186	1.75
	MP391	1.20
Doxo 10 <sup>®</sup>	DX008	15.20
	DX009	9.30
Meloximax <sup>®</sup>	MM170	0.75

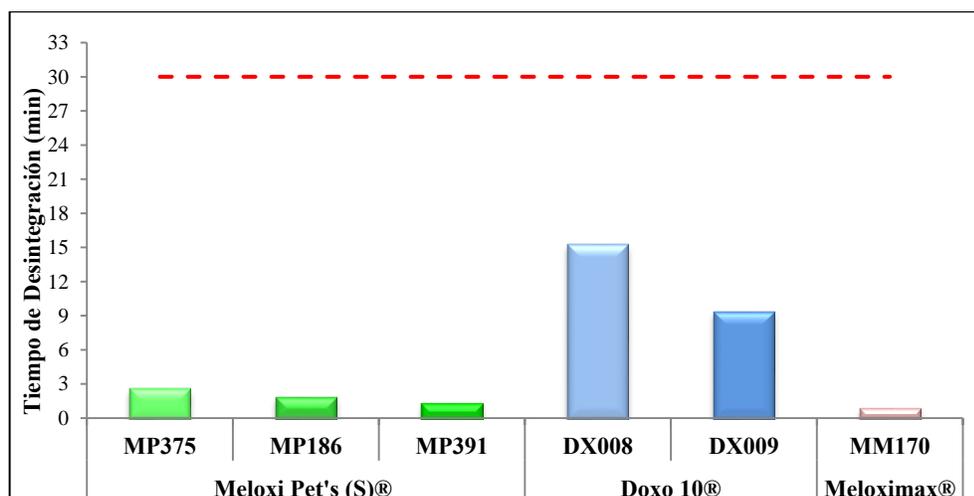


Gráfico 15. Tiempo de desintegración los comprimidos de las diferentes marcas y lotes evaluados (n=6). La línea punteada indica el criterio máximo de aceptación.

Una cuestión importante que a menudo no es considerada en el desarrollo de formulaciones de uso veterinario es el impacto del tiempo de desintegración de las formas farmacéuticas sólidas. Este proceso es de suma importancia ya que, para que el fármaco contenido se absorba tras la administración oral, en primer lugar debe estar en solución, y el

primer paso importante hacia esta condición suele ser la desintegración del comprimido<sup>(Banker and Anderson 1986)</sup>.

Los resultados indican que fueron los comprimidos de la marca Doxo 10<sup>®</sup> los que mayor tiempo requirieron para su completa desintegración; lo cual está directamente relacionado con la dureza que presentaron estos comprimidos. Esto podría tener como consecuencia diferencias en la biodisponibilidad de este producto respecto a las otras marcas, sobre todo si tenemos en consideración que algunos estudios han demostrado que la agitación de los contenidos gástricos durante las contracciones normales es bastante suave, en contraste con la agitación turbulenta producida en el aparato utilizado en la prueba de desintegración<sup>(Guyot-Hermann 1992)</sup>. En este caso se evaluaron tres formulaciones cuya especie de destino son los perros. La fuerza de contracción estomacal de esta especie ha sido determinada en 3.2 Newtons, la cual es considerablemente más fuerte que la fuerza de contracción estomacal de los humanos (entre 1.5 y 1.9 Newtons)<sup>(Kamba, Seta et al. 2001)</sup>. Además se debe tener siempre en consideración la posibilidad de que la forma farmacéutica sea masticada, particularmente si la formulación se administra con comida, ya que también podría tener un efecto sobre la biodisponibilidad del fármaco. Se ha reportado la influencia que tiene la masticación sobre los perfiles de biodisponibilidad de una formulación a base de micro pellets, aunque esto es de mayor importancia cuando se administran formulaciones de liberación sostenida<sup>(Ritschel, Agrawala et al. 1988)</sup>.

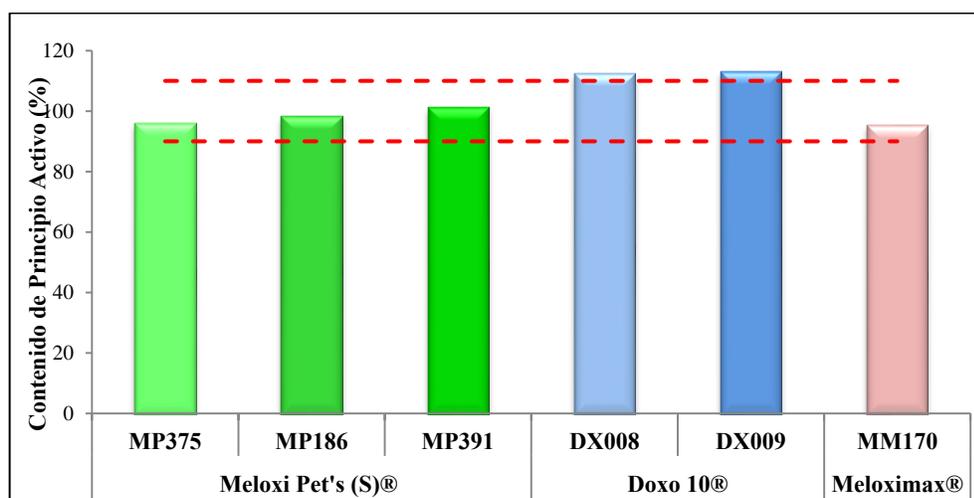
La prueba de desintegración está diseñada para simular únicamente el proceso de desintegración de los comprimidos a nivel *in vitro*, sin embargo, a nivel *in vivo* las partículas de los comprimidos desintegrados no se dispersan en todo el estómago, si no que permanecen como un agregado<sup>(Kamba, Seta et al. 2001)</sup>. Por lo tanto, esta prueba no puede ser utilizada como medida de la disolución del Meloxicam o de la biodisponibilidad a nivel *in vivo*, solamente estuvo limitada únicamente como control de calidad de los comprimidos y, en conjunto con las demás pruebas farmacopéicas, nos dio una idea de la reproducibilidad del proceso de fabricación de los productos y lotes evaluados.

## 5.7. Valoración del Principio Activo

En la tabla 36 se presentan en forma resumida los resultados del ensayo de valoración de los productos analizados. La especificación farmacopéica para el ensayo de valoración de comprimidos de Meloxicam es no menos del 90% y no más del 110% de la cantidad de Meloxicam declarado en la etiqueta.

**Tabla 35. Resultados de la valoración del principio activo de los comprimidos de Meloxicam analizados.**

Marca	Lote	Contenido de Meloxicam (mg/comprimido)	Contenido de Meloxicam (%)
Meloxi Pet's (S) <sup>®</sup>	MP375	0.958	95.795
	MP186	0.981	98.087
	MP391	1.008	100.822
Doxo 10 <sup>®</sup>	DX008	1.122	112.186
	DX009	1.129	112.897
Meloximax <sup>®</sup>	MM170	0.951	95.054



**Gráfico 16. Valoración de principio activo de los comprimidos de las diferentes marcas y lotes evaluados. Las líneas punteadas de color rojo indican los límites de aceptación farmacopéicos<sup>(USP 35 2012)</sup>.**

En el gráfico 16 se observa que los dos lotes evaluados del producto de la marca Doxo 10<sup>®</sup> rebasaron ligeramente la especificación establecida.

Debemos tener en consideración que se trata de medicamentos de uso veterinario cuya dosis es muy baja en donde la proporción del fármaco respecto a la de los excipientes es muy baja, lo cual es significativamente diferente a la mayoría de los medicamentos de uso común.

## 5.8. Uniformidad de Contenido

Debido a que el resultado de la valoración del principio activo representa el contenido promedio de Meloxicam en el lote, se realizó el ensayo de uniformidad de contenido, cuyos resultados se presentan en la tabla 36.

**Tabla 36. Porcentaje de Meloxicam en cada uno de los comprimidos analizados para evaluar la Uniformidad de Contenido.**

Observación	Meloxi Pet's (S) <sup>®</sup>			Doxo 10 <sup>®</sup>		Meloximax <sup>®</sup>
	MP375	MP186	MP391	DX008	DX009	MM170
	Contenido de Meloxicam (%)					
1	96.3	95.5	95.0	110.5	103.6	90.4
2	94.3	96.7	95.1	103.2	103.8	89.3
3	95.6	94.2	96.4	109.3	106.7	87.7
4	94.3	100.2	97.5	111.0	106.5	86.2
5	93.0	93.2	91.1	110.5	103.8	93.4
6	95.9	95.5	93.5	113.3	107.3	87.2
7	92.7	96.1	94.3	107.9	108.2	96.8
8	93.9	102.4	95.5	111.2	110.0	89.6
9	91.1	98.1	92.8	110.0	104.6	86.4
10	93.3	98.3	98.1	107.0	106.1	86.2
<i>Promedio</i>	<b>94.0</b>	<b>97.0</b>	<b>94.9</b>	<b>109.4</b>	<b>106.1</b>	<b>89.3</b>
<i>DE</i>	<b>1.599</b>	<b>2.797</b>	<b>2.145</b>	<b>2.799</b>	<b>2.125</b>	<b>3.481</b>
<i>CV (%)</i>	<b>1.701</b>	<b>2.883</b>	<b>2.259</b>	<b>2.559</b>	<b>2.003</b>	<b>3.899</b>

El valor promedio del porcentaje de Meloxicam contenido en la mayoría de los productos y lotes analizados se encontró dentro del rango de aceptación establecido en la farmacopea (del 90% al 110% de la cantidad declarada en la etiqueta)<sup>(USP 35 2012)</sup>; a excepción del producto Meloximax<sup>®</sup> (Lote MM170), el cual se encontró ligeramente fuera de este límite y fue el que presentó el mayor coeficiente de variación.

En la tabla 37 se muestran los valores de aceptación determinados de acuerdo a lo descrito en la sección 4.5.8. En ella se observa que la mayoría de los productos analizados cumplen los valores de aceptación marcados con la USP <905>, ya que el valor máximo permitido  $L1 = 15$ . La excepción fue el producto Meloximax<sup>®</sup>, cuyo valor de aceptación fue de 17.56.

**Tabla 37. Valores de Aceptación para evaluar la uniformidad de contenido, calculados para cada uno de los productos y lotes analizados.**

Marca	Lote	Valor de Aceptación
Meloxi Pet's (S) <sup>®</sup>	MP375	8.31
	MP186	8.20
	MP391	8.72
Doxo 10 <sup>®</sup>	DX008	14.610
	DX009	9.67
Meloximax <sup>®</sup>	MM170	17.56

Esto se puede atribuir al hecho de que se trata de formulaciones cuya dosis de principio activo es muy baja y, especialmente en el producto de la marca Meloximax<sup>®</sup>, la proporción de fármaco respecto a la de los excipientes es muy diferente. Las diferencias observadas en la uniformidad de contenido podrían deberse a condiciones en el proceso de mezclado, o a la combinación de factores tales como mezclado insuficiente, segregación y la formación de agregados o partículas de gran tamaño del fármaco que nos indican que la variación en el contenido de fármaco en cada unidad de dosificación puede deberse a una operación de mezclado inadecuada<sup>(Zheng 2009)</sup>. Por tal razón, para productos con bajo contenido de

principio activo, es importante diseñar una formulación y desarrollar un proceso de manufactura robusto.

Se ha propuesto una clasificación para identificar las condiciones en las cuales el tamaño de partícula puede ser una variable crítica en la formulación<sup>(Augsburger 2000)</sup>. Los parámetros que se consideran (tabla 38) son la solubilidad del fármaco y la dosis relativa en la que está presente.

**Tabla 38. Impacto del tamaño de partícula sobre las características del producto**<sup>(Martínez, Augsburger et al. 2002)</sup>.

	<b>Baja Solubilidad (Definición del SCB)</b>	<b>Alta Solubilidad (Definición del SCB)</b>
<b>Dosis Baja</b>	Disolución Uniformidad de contenido	Uniformidad de contenido
<b>Dosis Alta</b>	Disolución	No es importante

Al ser el Meloxicam un fármaco de baja solubilidad y estar presente en una dosis baja (1 mg de fármaco por comprimido), el tamaño de partícula podría ser un factor determinante para su disolución y podrían presentarse problemas en la uniformidad de contenido.

De manera general, estos pudieron haber sido los principales factores por los que el producto de la marca Meloximax<sup>®</sup> se encontró fuera de los criterios de aceptación para la uniformidad de contenido.

## 6. Caracterización de los Perfiles de Disolución

### 6.1. Estudio de los Perfiles de Disolución utilizando el Aparato II USP (Paletas) Modificado para Pequeños Volúmenes

En el presente trabajo, se utilizó buffer de fosfatos pH 7.5 para realizar los estudios de disolución, debido a que es el medio de disolución reportado en diversos artículos, en la farmacopea y en la base de datos de la FDA para estudios de disolución de formas farmacéuticas de Meloxicam<sup>(Silva, Pimentel et al. 2009, USP 35 2012, Induri, Mantripragada et al. 2012, FDA 2013)</sup>.

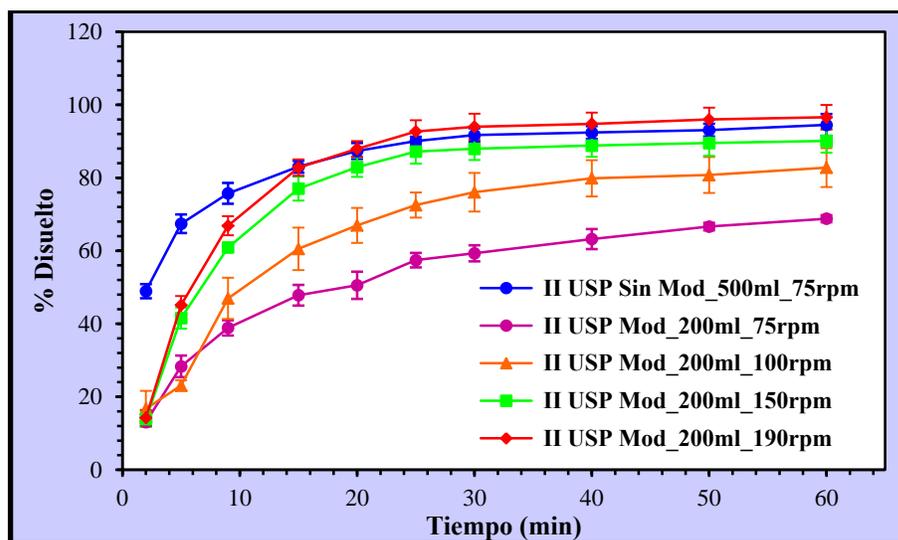
Se seleccionó el aparato de disolución modificado para pequeños volúmenes, (apartado 4.6.1 de la sección V), debido a la dosis tan baja de Meloxicam contenida en los productos estudiados, lo cual compromete la sensibilidad del método analítico por las pequeñas cantidades de principio activo disueltas en grandes volúmenes de medio de disolución.

Dado que muchos de los medicamentos de uso veterinario difieren enormemente respecto a la dosis de humanos, la aplicación de esta modificación del Aparato II USP en el desarrollo de métodos de disolución para la evaluación de medicamentos de baja dosificación, es evidente<sup>(Crail, Tunis et al. 2004)</sup>. Se ha reportado también que esta modificación del Aparato II USP posee un mayor poder discriminante cuando se evalúan formas de liberación inmediata y cuando se trata de comprimidos y cápsulas de tamaño pequeño debido a que el tamaño y la forma pueden impactar también la liberación del activo.

Las menores dimensiones que tiene este Aparato respecto a las del Aparato convencional generan condiciones hidrodinámicas distintas, esto es de particular interés ya que se ha demostrado que las condiciones hidrodinámicas del aparato de paletas influyen en la velocidad de disolución de los fármacos<sup>(Scholz, Kostewicz et al. 2003, Wu, Kildsig et al. 2004)</sup>, pudiendo sobre o subestimar su comportamiento de disolución *in vivo*. Por tal razón, el uso del Aparato modificado requiere de un ajuste en las condiciones de agitación para obtener perfiles de disolución similares a los que se obtienen con el Aparato de dimensiones normales. Se requieren velocidades de agitación mayores cuando se pretende obtener

resultados equivalentes. Se han reportado factores que oscilan entre 1 y 2.5 veces la velocidad original, dependiendo del tipo de comprimido (desintegrante o no desintegrante) y del tipo de liberación de los comprimidos (inmediata o extendida)<sup>(Scheubel, Lindenberg et al. 2010)</sup>.

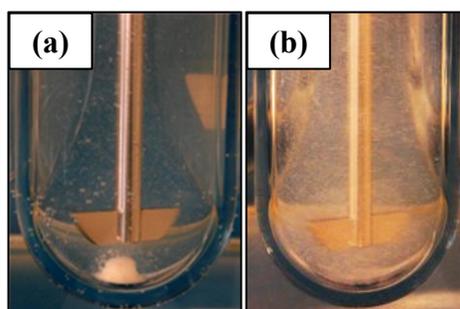
Con el propósito de determinar si el Aparato II USP modificado para pequeños volúmenes generaba perfiles de disolución diferentes a los del Aparato II USP sin modificaciones, se probaron diferentes velocidades de agitación para tratar de obtener perfiles de disolución lo más semejantes al método oficial descrito en la farmacopea. Esta determinación se realizó antes de llevar a cabo las pruebas de perfiles de disolución con el Aparato II USP modificado. El método farmacopéico para realizar los perfiles de disolución de comprimidos de Meloxicam indica que se debe utilizar el Aparato II USP con una velocidad de agitación de 75 rpm<sup>(USP 35 2012)</sup>, por lo que además de esta velocidad, se probaron las velocidades de 100, 150 y 190 rpm.



**Gráfico 17. Perfiles de Disolución de comprimidos de Meloxicam lote MP186 obtenidos con el Aparato II USP sin modificaciones (Sin Mod) y modificado para pequeños volúmenes (Mod), con diferentes volúmenes de medio de disolución y velocidades de agitación (Promedio  $\pm$  DE, n=3).**

Cuando se utilizó la misma velocidad de agitación (75 rpm) en los dos vasos del aparato de disolución (el vaso farmacopéico de 1 litro y el modificado para 200 mL), el vaso de

volumen pequeño mostró un porcentaje disuelto mucho más bajo que el porcentaje alcanzado con el vaso de mayor volumen. El porcentaje disuelto en el vaso de menor volumen fue incrementándose en función de la velocidad de agitación empleada. Tal y como se observa en el gráfico 17. Los bajos porcentajes de fármaco disuelto que se alcanzaron con las velocidades de agitación <100 rpm en el Aparato modificado se deben principalmente al efecto “coning” (formación de un cono) con los excipientes de los comprimidos en el fondo del vaso, como se observa en la figura 18. Este efecto se ha observado con mayor intensidad en formulaciones cuyo principio activo es de baja solubilidad<sup>(Mirza, Joshi et al. 2005)</sup>, como en este caso. El aumento en la velocidad de agitación ayudó a evitar el efecto “coning”, ya que esto resultó en una mejor dispersión de las partículas desintegradas y, por lo tanto, en una mejor liberación y disolución del fármaco<sup>(Klein and Shah 2008)</sup>.



**Figura 18. (a) Efecto "Coning" observado cuando se utilizó el Aparato II USP Modificado para Pequeños Volúmenes a velocidades de agitación de 75 y 100 rpm. (b) A velocidades de 150 y 190 rpm no se observa dicho efecto.**

Para estimar la diferencia entre los perfiles de disolución obtenidos con el Aparato II USP modificado y el no modificado, además de una comparación visual de los perfiles de disolución donde se estima la forma y la meseta de las curvas (gráfico 17), la cercanía de los perfiles se evaluó mediante el cálculo de la relación del porcentaje disuelto en cada tiempo y la relación media para todos los puntos de muestreo de acuerdo a las siguientes ecuaciones<sup>(Scheubel, Lindenberg et al. 2010)</sup>.

$$\theta(t) = \frac{D_{Mod}(t)}{D_{Sin Mod}(t)} \qquad \theta_{Prom} = \frac{\sum_{t=1}^n R(t)}{n}$$

$\theta(t)$  representa la relación al tiempo  $t$ ,  $D_{Mod}$  el porcentaje disuelto con el Aparato modificado para pequeños volúmenes,  $D_{Sin Mod}$  el porcentaje disuelto con el Aparato sin modificaciones.  $\theta_{Prom}$  representa el valor promedio de  $\theta(t)$ .

Un valor de  $\theta_{Prom}$  cercano a la unidad indica una relación entre los porcentajes disueltos en ambos Aparatos estable a lo largo de todo el perfil. Un valor de  $\theta_{Prom}$  por encima de la unidad significaría que los perfiles obtenidos con el Aparato modificado tienden a ser más rápidos que los obtenidos con el Aparato sin modificaciones, y por el contrario, un valor de  $\theta_{Prom}$  por debajo de la unidad indicaría los perfiles del Aparato modificado tienen la tendencia a ser más lentos. Aplicando esta relación se asume que las curvas de disolución exhiben perfiles similares con solo la diferencia en la velocidad de disolución<sup>(Scheubel, Lindenberg et al. 2010)</sup>. Adicionalmente se calculó el factor de similitud ( $f_2$ ) de los perfiles de disolución promedio, tomando como referencia el método farmacopéico de disolución utilizando el Aparato II USP a una velocidad de agitación de 75 rpm. Los resultados se muestran en la tabla 39.

**Tabla 39. Promedio de la relación ( $\theta_{Prom}$ ) y Factor de Similitud ( $f_2$ ) del porcentaje disuelto entre el Aparato II USP Modificado para Pequeños Volúmenes y el Aparato II USP sin modificaciones a diferentes velocidades de agitación.**

Aparato II USP Modificado para Pequeños Volúmenes	Método de Referencia	
	Aparato II USP (Sin Modificación) 75 rpm	
	$\theta_{Prom}$	$f_2$
75 rpm	0.58	21.71
100 rpm	0.70	25.55
150 rpm	0.84	34.04
190 rpm	0.90	36.18

Se encontró que tanto el promedio de la relación ( $\theta_{Prom}$ ) como el factor de similitud ( $f_2$ ) incrementaron su valor conforme se aumentó la velocidad de agitación. Se observa que los

valores de  $\Theta_{Prom}$  obtenidos se encuentran por debajo de la unidad, esto significa que los perfiles del Aparato modificado tienen la tendencia a ser más lentos, sobre todo en la fase ascendente. Los valores de  $f_2$  son menores de 50, lo cual significa que los perfiles no son similares respecto a los obtenidos con el Aparato II sin modificaciones.

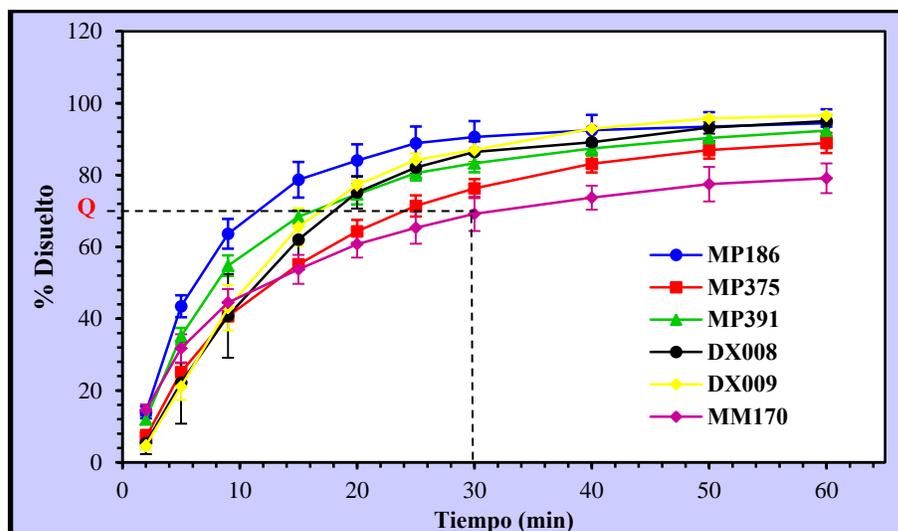
Una vez seleccionadas las condiciones de agitación del Aparato II USP modificado para pequeños volúmenes, se llevaron a cabo las pruebas de los perfiles de disolución. En la tabla 40 se presentan los resultados de los valores promedio del porcentaje de Meloxicam disuelto a los diferentes tiempos de muestreo de los productos que se evaluaron empleando las condiciones descritas en la tabla 11. En ella se puede observar que la mayoría de los productos cumple con la especificación de Q requerida en la farmacopea<sup>(USP 35 2012)</sup> (no menos del 70% disuelto en 30 minutos). El producto MM170, se encuentra ligeramente por debajo de la especificación ( $69.20\% \pm 4.76$ ).

**Tabla 40. Valores promedio del porcentaje de Meloxicam disuelto de los productos evaluados utilizando el Aparato II USP modificado para pequeños volúmenes (n =6).**

Tiempo (min)	% Disuelto (Promedio $\pm$ DE)					
	MP186	MP375	MP391	DX008	DX009	MM170
2	13.92 $\pm$ 1.63	6.94 $\pm$ 2.08	11.96 $\pm$ 1.30	5.33 $\pm$ 3.04	4.64 $\pm$ 1.15	14.56 $\pm$ 1.56
5	43.45 $\pm$ 3.06	25.12 $\pm$ 2.59	35.16 $\pm$ 2.28	22.17 $\pm$ 11.41	21.06 $\pm$ 3.66	31.76 $\pm$ 3.91
9	63.63 $\pm$ 4.15	40.68 $\pm$ 0.85	54.78 $\pm$ 2.84	40.80 $\pm$ 11.66	43.05 $\pm$ 6.30	44.49 $\pm$ 3.75
15	78.70 $\pm$ 4.96	55.12 $\pm$ 1.28	68.39 $\pm$ 1.85	62.01 $\pm$ 8.00	65.55 $\pm$ 5.27	53.74 $\pm$ 4.04
20	84.07 $\pm$ 4.48	64.33 $\pm$ 3.19	74.64 $\pm$ 2.81	75.18 $\pm$ 4.53	77.23 $\pm$ 1.27	60.76 $\pm$ 3.74
25	88.86 $\pm$ 4.69	71.40 $\pm$ 2.95	80.57 $\pm$ 2.08	82.09 $\pm$ 1.66	84.24 $\pm$ 1.78	65.31 $\pm$ 4.42
30	90.63 $\pm$ 4.41	76.29 $\pm$ 2.59	83.28 $\pm$ 2.50	86.46 $\pm$ 2.86	87.01 $\pm$ 3.53	69.20 $\pm$ 4.76
40	92.49 $\pm$ 4.29	83.15 $\pm$ 2.43	87.42 $\pm$ 1.95	89.16 $\pm$ 3.21	92.89 $\pm$ 0.83	73.71 $\pm$ 3.34
50	93.47 $\pm$ 4.04	86.96 $\pm$ 2.40	90.32 $\pm$ 3.34	93.21 $\pm$ 1.66	95.81 $\pm$ 0.59	77.47 $\pm$ 4.81
60	94.46 $\pm$ 3.85	88.93 $\pm$ 2.82	92.38 $\pm$ 2.46	95.05 $\pm$ 1.61	96.57 $\pm$ 0.55	79.11 $\pm$ 4.13

La posibilidad de considerar a cualquiera de los productos como medicamentos de muy rápida disolución se descarta ya que en ninguno de los casos se disuelve 85% o más del fármaco dentro de los primeros 15 minutos<sup>(FDA 2000)</sup>. No obstante, los productos MP186, MP391, DX008 y DX009 pueden ser considerados productos de rápida disolución, ya que se disuelve más del 85% en 30 minutos.

En el gráfico 18 se muestran los perfiles de disolución obtenidos en un pH de 7.5 de los productos y lotes analizados.



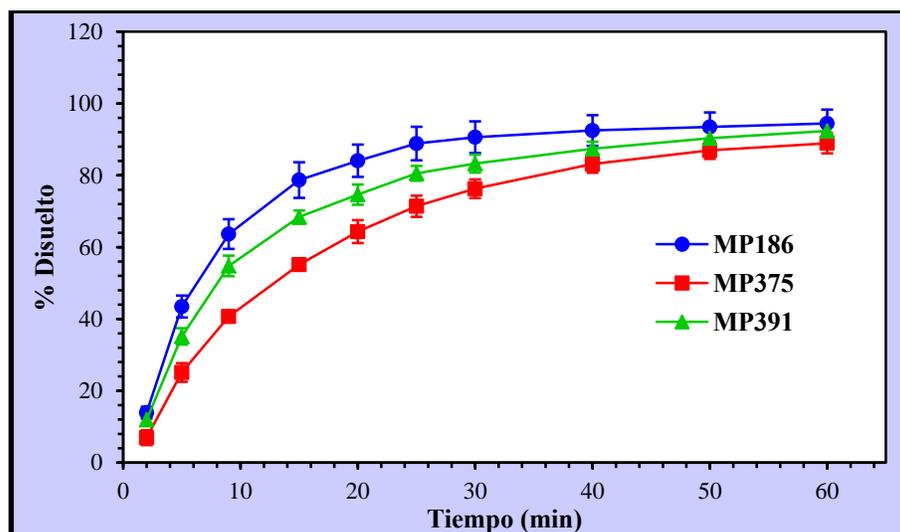
**Gráfico 18. Perfiles de Disolución de los comprimidos de Meloxicam (1 mg) analizados, en buffer de fosfatos pH 7.5 utilizando el Aparato II USP modificado para pequeños volúmenes (Promedio  $\pm$  DE, n=6). Las líneas punteadas indican la especificación de Q requerida en la monografía farmacopéica.**

En el gráfico 18 se aprecian las diferencias en el comportamiento de disolución de los productos en estudio. El producto MP186 mostró un perfil característico, correspondiente a una completa disolución y a la más rápida velocidad; mientras que el producto MM170 liberó menos de 80% de la cantidad declarada en la etiqueta a los 60 minutos. Al establecer la relación entre el tamaño (cantidad de excipientes) se encontró que este producto (MM170) fue el que contenía mayor cantidad de excipientes lo cual podría afectar la liberación del Meloxicam a partir de los comprimidos y por lo tanto su disolución. El hecho de poseer una cantidad mayor de excipientes potencializa además la posibilidad de alguna interacción entre el fármaco-excipiente y modificar el proceso de disolución del Meloxicam, por ser un fármaco de baja solubilidad.

Con el fin de evidenciar las diferencias entre lotes de un mismo fabricante se graficaron los lotes respecto al fabricante (Gráficos 19, 20 y 21). En el gráfico 19 se presentan los

perfiles de disolución de los lotes analizados de la marca Meloxi Pet's (S)<sup>®</sup>, donde se puede observar que el lote MP375 es el que peor comportamiento respecto a la disolución presenta. El lote MP391 presentó la mayor semejanza con el lote MP186, siendo el que mejor comportamiento de disolución mostró. Estas diferencias en disolución, hacen pensar que probablemente el laboratorio fabricante modificó alguna condición del proceso de fabricación o haya realizado un cambio de proveedor de materia prima o modificado los componentes en la formulación.

Los perfiles de disolución de los dos lotes evaluados de la marca Doxo 10<sup>®</sup> no mostraron diferencias uno respecto del otro en cuanto a su disolución, tal y como se muestra en el gráfico 20. Por otra parte, el laboratorio fabricante del producto Meloximax 1<sup>®</sup> únicamente nos proporcionó un lote debido a que durante el tiempo que duró el estudio solamente fabricaron un lote (MM170).



**Gráfico 19. Perfiles de Disolución de los comprimidos de la marca Meloxi Pet's (S)<sup>®</sup>, en buffer de fosfatos pH 7.5 utilizando el Aparato II USP modificado para pequeños volúmenes (Promedio ± DE, n=6).**

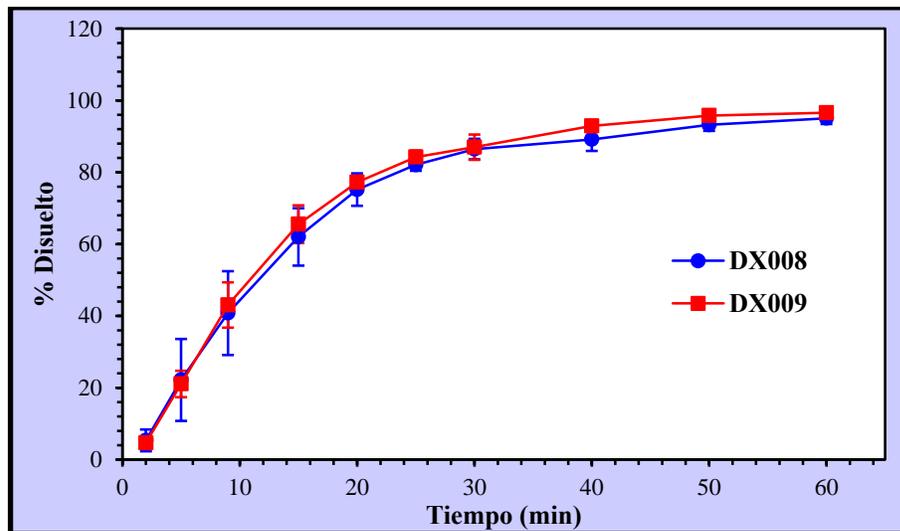


Gráfico 20. Perfiles de Disolución de los comprimidos de la marca Doxo 10<sup>®</sup>, en buffer de fosfatos pH 7.5 utilizando el Aparato II USP modificado para pequeños volúmenes (Promedio  $\pm$  DE, n=6).

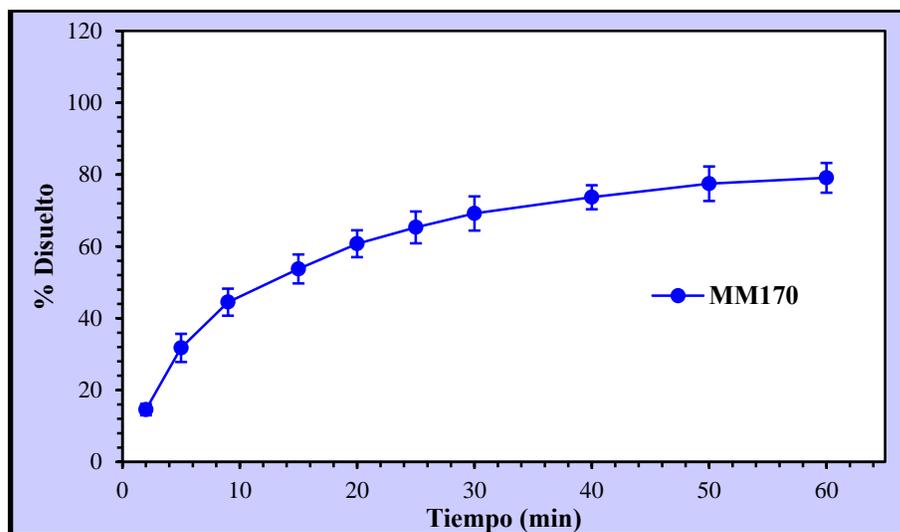


Gráfico 21. Perfil de Disolución de comprimidos de la marca Meloximax 1<sup>®</sup>, en buffer de fosfatos pH 7.5 utilizando el Aparato II USP modificado para pequeños volúmenes (Promedio  $\pm$  DE, n=6).

## 6.2. Estudio de los Perfiles de Disolución utilizando el Aparato IV USP (Celdas de Flujo Continuo)

En la tabla 42 se presentan los perfiles de disolución promedio de los productos que se evaluaron utilizando el Aparato IV USP bajo las condiciones descritas en la tabla 12.

Tabla 41. Valores promedio del porcentaje de Meloxicam disuelto de los productos evaluados utilizando el Aparato IV USP (n =6).

Tiempo (min)	% Disuelto (Promedio ± DE)					
	MP186	MP375	MP391	DX008	DX009	MM170
3	29.57 ± 2.18	13.45 ± 3.97	29.81 ± 1.74	8.51 ± 3.72	4.06 ± 2.24	3.32 ± 0.62
5	51.84 ± 1.42	28.37 ± 3.72	45.96 ± 1.10	18.16 ± 7.08	20.45 ± 5.77	7.17 ± 0.93
9	72.38 ± 1.50	46.95 ± 1.97	64.68 ± 1.22	39.20 ± 12.89	42.76 ± 11.73	15.47 ± 2.25
15	84.40 ± 1.62	63.35 ± 1.49	78.44 ± 2.50	60.38 ± 15.55	65.51 ± 15.84	30.54 ± 5.53
20	88.72 ± 1.92	72.02 ± 2.25	85.53 ± 1.11	72.28 ± 14.83	79.29 ± 11.95	41.87 ± 6.37
25	91.34 ± 2.01	78.13 ± 2.66	89.47 ± 1.00	80.76 ± 12.47	89.05 ± 10.54	53.28 ± 6.41
30	93.11 ± 2.53	82.97 ± 1.92	92.18 ± 1.32	88.34 ± 8.70	96.47 ± 6.25	65.27 ± 5.76
40	93.83 ± 2.08	89.16 ± 1.91	94.11 ± 1.42	95.09 ± 3.78	102.14 ± 2.88	78.61 ± 3.90
50	94.46 ± 2.17	91.49 ± 2.60	94.99 ± 1.35	99.42 ± 1.94	104.27 ± 1.76	86.71 ± 3.01
60	94.86 ± 2.15	92.64 ± 2.14	95.56 ± 0.88	100.73 ± 2.75	105.89 ± 1.59	91.22 ± 1.42

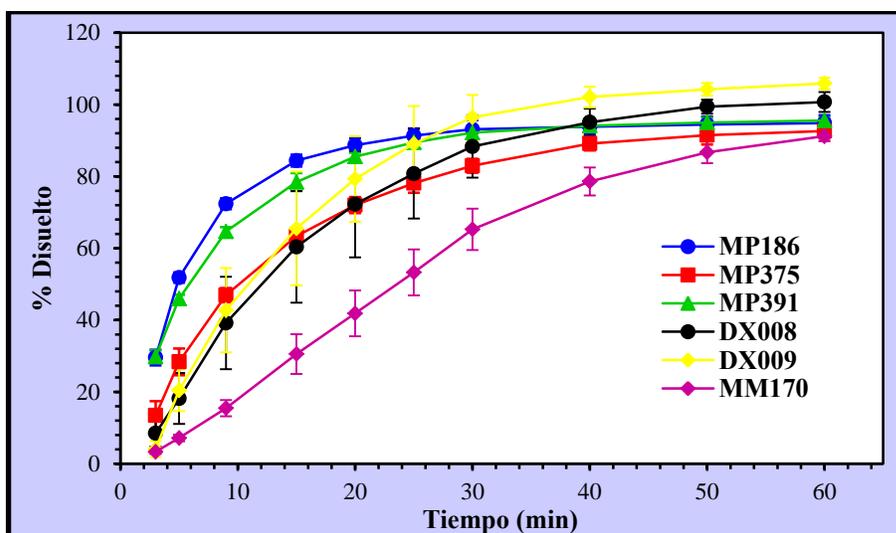


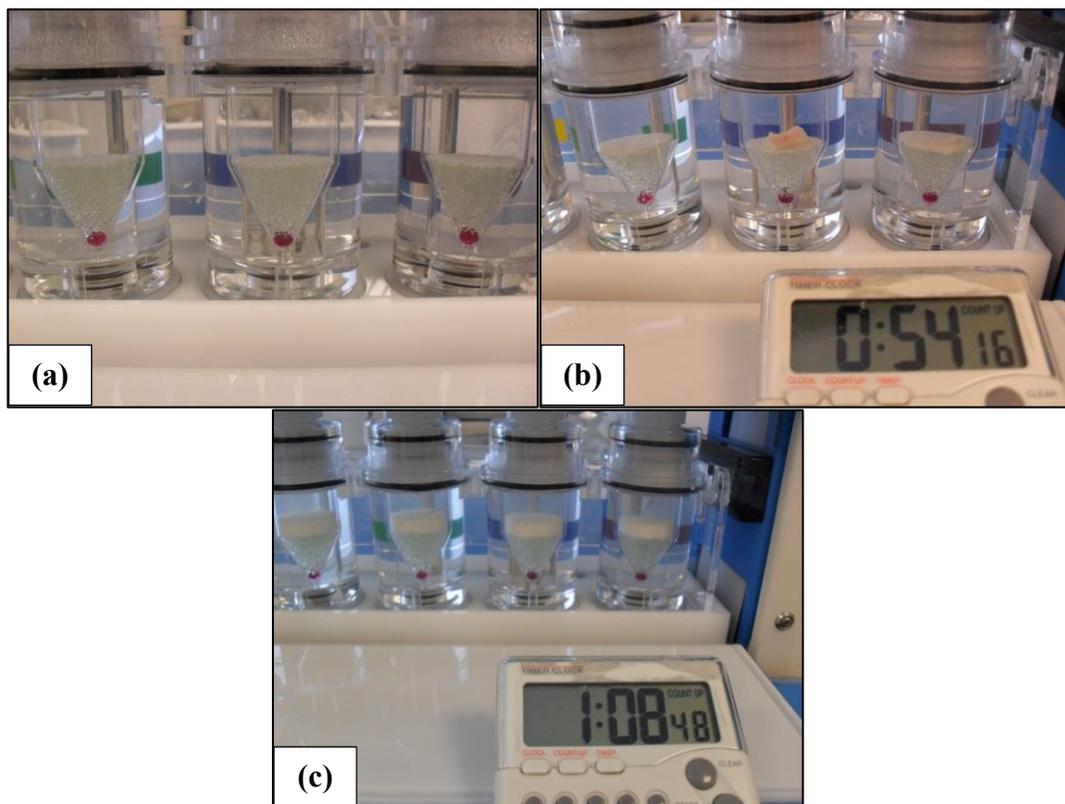
Gráfico 22. Perfiles de Disolución de los comprimidos de Meloxicam (1 mg) analizados, en buffer de fosfatos pH 7.5 utilizando el Aparato IV USP (Promedio ± DE, n=6). Las líneas punteadas indican la especificación de Q requerida en la monografía farmacopéica.

Al utilizar el Aparato IV, se puede observar el mismo comportamiento de disolución que en el Aparato II pero de una forma más discriminativa. De los tres lotes analizados de la marca Meloxi Pet's (S)<sup>®</sup>, el lote MP375 fue el que peor comportamiento mostró. Los dos lotes restantes (MP186 y MP391) se comportaron de forma similar en cuanto a su disolución, lo que reafirma la idea de que el laboratorio productor modificó alguna condición en el proceso de fabricación o cambió alguna variable de la formulación para la fabricación del lote MP375, hecho que se vio reflejado en su disolución (gráfico 23). Una cuestión observada con esta marca fue que con el Aparato IV USP la desviación estándar fue más pequeña. Lo cual sugiere que la hidrodinámica generada en el medio de disolución por Aparato IV USP permite homogenizar los resultados obtenidos ya que el flujo laminar del medio de disolución generado con este equipo carece de los problemas asociados con el mecanismo de agitación.

En el gráfico 24 se observa que los perfiles de disolución de los dos lotes de la marca Doxo 10<sup>®</sup> (DX008 y DX009) exhiben un comportamiento similar; sin embargo, la desviación estándar fue mayor. Una posible explicación es que el flujo turbulento generado en el medio de disolución por la paleta del Aparato II USP ayuda a la completa desintegración de los comprimidos de esta marca, mientras que el flujo laminar del Aparato IV USP no permite la desintegración uniforme de todos los comprimidos y por lo tanto la liberación del activo se ve modificada. Esto se pudo corroborar cuando se observaban las celdas del Aparato IV USP después del ensayo de disolución, con los comprimidos de esta marca era notorio que la desintegración era muy variable respecto a la que tenían los comprimidos de las otras marcas, tal y como se observa en la figura 19.

El perfil de disolución del producto MM170 obtenido con el Aparato IV USP fue el que mayor diferencia presentó respecto al perfil obtenido con el Aparato II USP. Esta diferencia puede ser explicada por las condiciones hidrodinámicas que caracterizan al Aparato IV USP, ya que son menos violentas que las del Aparato II USP<sup>(Medina-López and Ortiz-Quintero 2006)</sup>. En este sentido el Aparato IV USP refleja mejor las condiciones que se presentan *in vivo* y permite diferenciar con mayor claridad el proceso de disolución. Es importante señalar que este producto (MM170) fue el que mayor cantidad de excipientes contenía. Como se puede

observar en la figura 19, durante los ensayos de disolución con el Aparato IV USP se formaba una base de excipientes de un grosor bastante considerable dentro de las celdas del equipo, la cual permanecía durante todo el desarrollo del ensayo. Este efecto pudo haber contribuido en gran medida a la menor velocidad de disolución observada. Este fenómeno no se presentó al realizar los ensayos en el Aparato II USP debido a que el mecanismo de agitación del medio de disolución y el flujo turbulento generado impiden la formación de cúmulos de excipientes que impidan la pronta disolución del activo.



**Figura 19. Análisis visual de los comprimidos de la marca (a) Meloxi Pet's (S)<sup>®</sup>, (b) Doxo 10<sup>®</sup> y (c) Meloximax 1<sup>®</sup> después del ensayo de disolución utilizando el Aparato IV USP.**

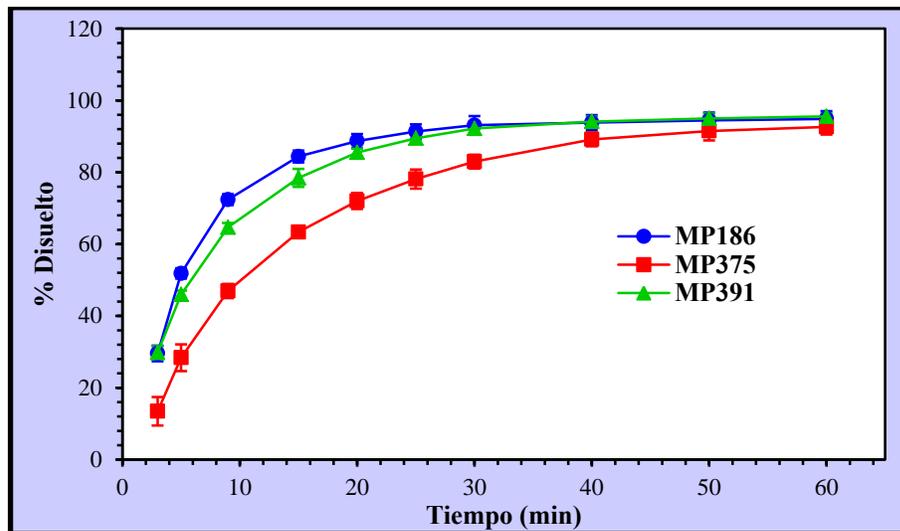


Gráfico 23. Perfiles de Disolución de los comprimidos de la marca Meloxi Pet's (S)<sup>®</sup>, en buffer de fosfatos pH 7.5 utilizando el Aparato IV USP (Promedio ± DE, n=6).

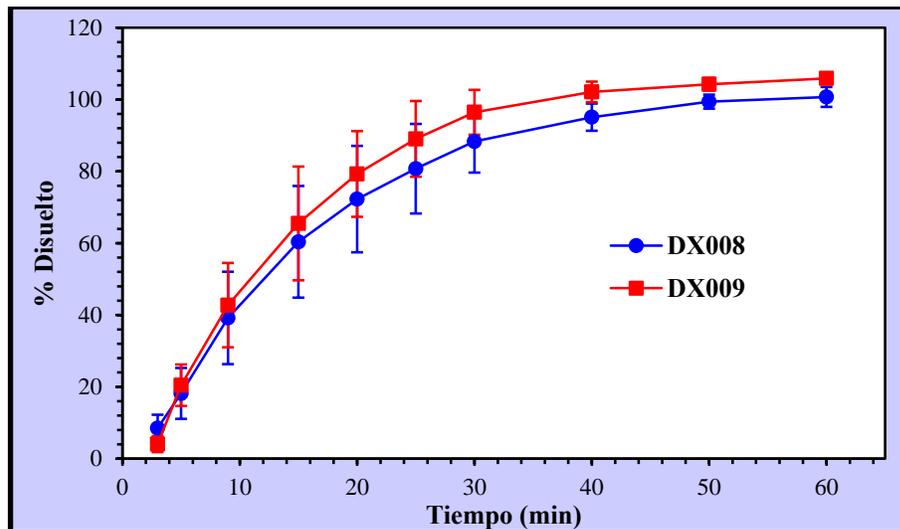
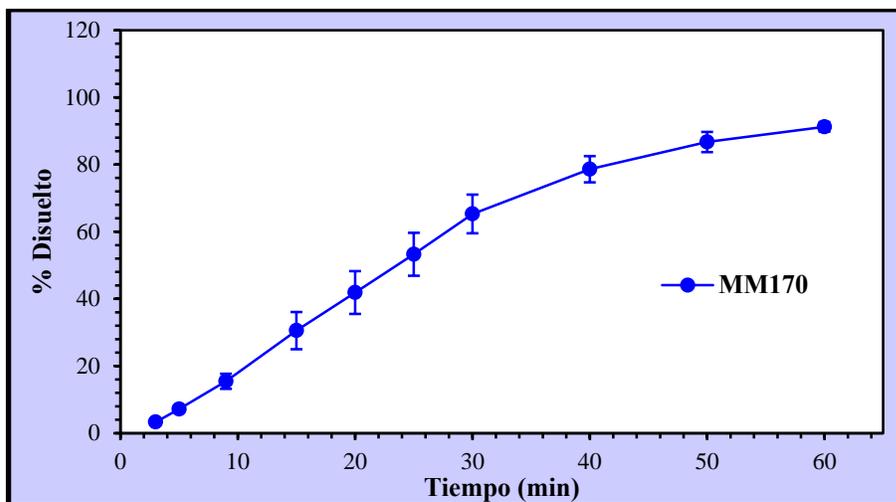


Gráfico 24. Perfiles de Disolución de los comprimidos de la marca Doxo 10<sup>®</sup>, en buffer de fosfatos pH 7.5 utilizando el Aparato IV USP (Promedio ± DE, n=6).



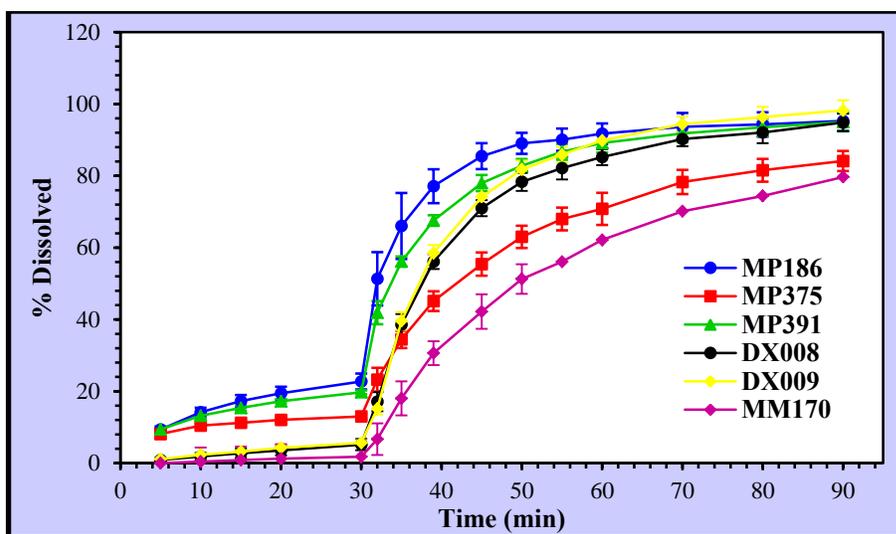
**Gráfico 25.** Perfil de Disolución de comprimidos de la marca Meloxicam 1<sup>®</sup>, en buffer de fosfatos pH 7.5 utilizando el Aparato IV USP (Promedio ± DE, n=6).

Los resultados de los ensayos de disolución en el Aparato IV USP con cambio de pH se resumen en la tabla 42.

**Tabla 42.** Valores promedio del porcentaje de Meloxicam disuelto de los productos evaluados utilizando el Aparato IV USP utilizando buffer pH 1.2 durante 30 minutos y buffer pH 7.5 durante 60 minutos (n =6).

Tiempo (min)	% Disuelto (Promedio ± DE)						
	pH	MP186	MP375	MP391	DX008	DX009	MM170
5	1.2	9.37 ± 0.81	8.13 ± 1.38	9.40 ± 0.53	0.88 ± 0.48	1.12 ± 0.21	0.00 ± 0.00
10		14.17 ± 1.26	10.45 ± 0.64	13.21 ± 0.70	1.87 ± 0.99	2.32 ± 0.35	0.42 ± 0.21
15		17.29 ± 1.69	11.22 ± 0.63	15.37 ± 0.74	2.77 ± 1.26	3.22 ± 0.44	0.86 ± 0.13
20		19.48 ± 1.78	12.06 ± 0.71	17.23 ± 0.58	3.56 ± 1.39	4.27 ± 0.59	1.23 ± 0.30
30		22.75 ± 2.22	13.00 ± 0.74	19.73 ± 0.53	5.16 ± 1.57	5.64 ± 0.73	1.79 ± 0.36
32		51.33 ± 7.43	23.26 ± 3.30	41.91 ± 3.22	17.11 ± 2.67	15.18 ± 1.66	6.67 ± 1.78
35	7.5	66.05 ± 9.18	34.45 ± 2.43	56.15 ± 1.41	38.58 ± 2.92	39.58 ± 2.49	18.04 ± 3.60
39		77.13 ± 4.72	45.11 ± 2.74	67.56 ± 1.48	56.13 ± 2.07	58.52 ± 2.21	30.63 ± 4.57
45		85.48 ± 3.59	55.42 ± 3.23	78.00 ± 2.23	71.02 ± 2.24	74.13 ± 2.53	42.20 ± 4.73
50		89.05 ± 2.93	63.01 ± 3.10	82.81 ± 1.85	78.34 ± 2.52	81.80 ± 2.46	51.27 ± 5.25
55		90.06 ± 3.11	67.99 ± 3.17	86.72 ± 2.21	82.15 ± 3.14	85.89 ± 2.20	56.09 ± 5.50
60		91.74 ± 2.84	70.81 ± 4.46	89.15 ± 2.67	85.22 ± 2.23	89.83 ± 2.07	62.16 ± 4.99
70		93.66 ± 3.83	78.27 ± 3.37	91.79 ± 2.41	90.24 ± 2.00	94.40 ± 2.14	70.15 ± 3.91
80		94.31 ± 3.38	81.55 ± 3.16	93.55 ± 2.44	92.07 ± 2.96	96.36 ± 2.85	74.39 ± 3.86
90		95.29 ± 2.79	84.12 ± 2.79	95.00 ± 2.56	94.85 ± 2.43	98.22 ± 2.85	79.67 ± 2.57

En el gráfico 26 se observa que el comportamiento del Meloxicam en los dos medios utilizados fue el mismo en todos los casos. Como era de esperarse, al utilizar buffer pH 1.2 la disolución es muy baja e incrementa considerablemente al realizar el cambio de medio de disolución a buffer pH 7.5.



**Gráfico 26.** Perfiles de Disolución de los comprimidos de Meloxicam (1 mg) analizados, en buffer pH 1.2 durante 30 minutos y buffer pH 7.5 durante 60 minutos, utilizando el Aparato IV USP (Promedio  $\pm$  DE, n=6).

La intención de estos ensayos fue simular el comportamiento de disolución del Meloxicam durante el tránsito gastrointestinal en perros y gatos. El tiempo total de tránsito gastrointestinal que tienen los comprimidos en estas especies depende en gran medida del tiempo de vaciamiento gástrico, el cual a su vez depende de factores como el tamaño y la densidad de las partículas, el volumen de los líquidos luminales, el estado prandial y la viscosidad del contenido gástrico<sup>(Ehrlein and Pröve 1982, Meyer, Dressman et al. 1985, Kaniwa, Aoyagi et al. 1988, Gupta and Robinson 1995, Martinez, Amidon et al. 2002)</sup>. Esto es un factor determinante para su biodisponibilidad, particularmente en este caso, donde la disolución del Meloxicam es el factor limitante para su absorción. De acuerdo con los resultados obtenidos, la disolución del Meloxicam se llevaría a cabo a nivel intestinal, por lo que si su tránsito intestinal es más rápido que su velocidad de disolución, la absorción sería incompleta o deficiente (a pesar

de que el Meloxicam es un fármaco de alta permeabilidad). Sin embargo, se ha reportado que el tiempo de tránsito intestinal en gatos y perros es de entre 2 y 3 horas<sup>(Miyabayashi, Morgan et al. 1986, Wilding, Davis et al. 1994, Martinez, Amidon et al. 2002)</sup>, suficiente tiempo para que se logre la completa disolución del Meloxicam a partir de los productos evaluados y pueda ser absorbido para alcanzar la circulación sistémica.

### 6.3. Comparación Estadística de los Perfiles de Disolución

Para realizar la comparación de los perfiles de disolución se aplicó el factor de similitud ( $f_2$ ). La comparación mediante el factor de similitud ( $f_2$ ) se realiza siempre comparando el perfil de disolución de los medicamentos en estudio con el perfil de disolución del medicamento de referencia, el cual en el ámbito de los medicamentos para uso humano es aquel medicamento indicado por la Secretaría de Salud, que cuenta con el registro de dicha dependencia y se encuentra disponible comercialmente. Generalmente es aquel que cuente con la patente y sea reconocido como el medicamento innovador. De no existir un medicamento que cumpla con estos criterios, se puede seleccionar al medicamento de referencia aquel producto cuya bioequivalencia esté determinada, aquel que cuente con el registro más antiguo ante la autoridad sanitaria y que haya demostrado su eficacia y seguridad o el producto con una correlación *in vitro-in vivo* establecida, en ese orden de prioridad<sup>(SSA 1998)</sup>.

Para el caso de los medicamentos de uso veterinario, las autoridades competentes aún no han establecido los criterios para la comparación de perfiles de disolución, y por lo tanto tampoco existen criterios de selección para los medicamentos de referencia. En el caso de México, el medicamento de uso veterinario con Meloxicam que tiene la patente (Metacam<sup>®</sup>) solamente se comercializa en Europa. Por ello se decidió no seleccionar alguno de los productos como medicamento de referencia y la comparación se realizó entre todos los productos evaluados.

Los valores del factor de similitud obtenidos de la comparación entre los perfiles de disolución del Aparato II USP se resumen en la tabla 43. En ella se pueden observar en color rojo los valores de  $f_2$  inferiores a 50, y que por lo tanto indican que esos productos no son similares en cuanto a su perfil de disolución. Según estos resultados, los productos que se comportan con mayor diferencia son MP186 y MM170, lo cual puede ser corroborado en el gráfico 17. Los productos MP375, MP391, DX008 y DX009 tienen un comportamiento en cuanto a su disolución con mayor semejanza entre sí. De los tres lotes analizados de la marca Meloxi Pet's (S)<sup>®</sup>, solamente el lote MP391 resultó tener un perfil similar al de los

otros dos lotes (MP186 y MP375); los cuales a su vez resultaron no ser similares entre sí. Por otro lado, los lotes de la marca Doxo 10<sup>®</sup> (DX008 y DX009) fueron los que mayor semejanza tuvieron entre sí. El producto MP170 solamente resultó ser similar al producto MP375.

**Tabla 43. Valores de  $f_2$  obtenidos de la comparación de todos los productos y lotes evaluados utilizando el Aparato II USP (modificado). Las columnas indican el producto considerado el medicamento de referencia y las filas el medicamento de prueba.**

Producto de Prueba	Producto de Referencia					
	MP186	MP375	MP391	DX008	DX009	MM170
MP186	100.00	38.88	55.05	41.90	43.51	36.28
MP375	36.05	100.00	50.46	56.04	51.87	57.43
MP391	53.85	51.57	100.00	54.36	55.06	45.59
DX008	40.37	56.86	55.71	100.00	82.39	43.64
DX009	41.96	51.77	55.77	82.39	100.00	40.86
MM170	35.75	58.62	45.98	45.56	43.21	100.00

Los valores del factor de similitud obtenidos de la comparación entre los perfiles de disolución del Aparato IV USP tuvieron un comportamiento similar a los obtenidos con el Aparato II USP, sin embargo, como se observa en la tabla 44 el Aparato IV USP resultó más discriminativo obteniéndose valores de  $f_2$  más bajos y logrando discriminar entre productos que parecían ser similares (con valores de  $f_2$  apenas por encima de 50) cuando se utilizó el Aparato II USP.

Al igual que con el Aparato II USP, el producto que se comporta con mayor diferencia es el MM170, el cual mostró un comportamiento diferente al resto de todos los productos analizados (gráfico 22), a pesar de que este producto había mostrado cierta similitud con el producto MP375 cuando se utilizó en Aparato II USP. Los productos MP375, DX008 y DX009 tuvieron un comportamiento similar entre sí pero diferente al resto de los productos analizados. De todos los lotes analizados de la marca Meloxi Pet's (S)<sup>®</sup>, solamente MP186 y MP391 resultaron similares ya que cuando se compararon con lote MP375 se obtuvieron valores de  $f_2$  inferiores a 50. Los lotes de la marca Doxo 10<sup>®</sup> (DX008 y DX009), por el contrario, resultaron semejantes entre sí.

Tabla 44. Valores de  $f_2$  obtenidos de la comparación de todos los productos y lotes evaluados utilizando el Aparato IV USP. Las columnas indican el producto considerado el medicamento de referencia y las filas el medicamento de prueba.

Producto de Prueba	Producto de Referencia					
	MP186	MP375	MP391	DX008	DX009	MM170
MP186	100.00	37.69	65.11	32.02	32.63	20.56
MP375	33.99	100.00	40.53	61.60	55.81	32.28
MP391	63.46	42.84	100.00	36.29	36.89	22.65
DX008	28.78	61.53	34.69	100.00	62.59	33.13
DX009	30.68	51.39	36.89	60.96	100.00	28.26
MM170	16.42	31.06	19.30	31.58	27.35	100.00

En el gráfico 27 se puede observar que la mayoría de los valores de  $f_2$  calculados al usar el Aparato IV USP son menores que los obtenidos con el Aparato II USP. La similitud o diferencia de los perfiles es la misma con ambos equipos, a excepción de las comparaciones MP375-MP391, MP375-MM170, MP391-DX008 y MP391-DX009, en donde sus perfiles son similares utilizando el Aparato II USP pero diferentes utilizando el Aparato IV USP.

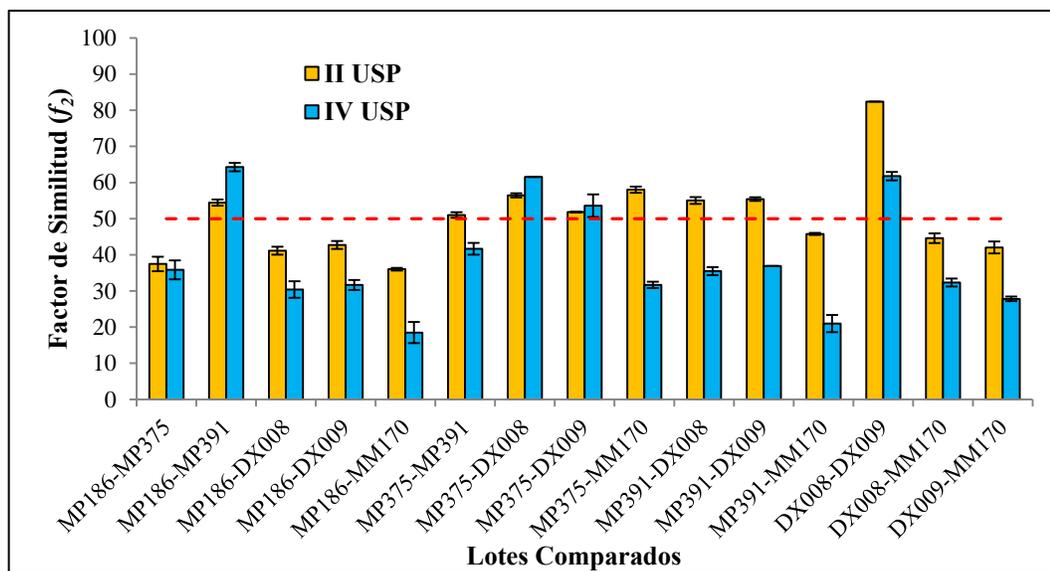


Gráfico 27. Valores del Factor de Similitud ( $f_2$ ) calculados con los datos generados en los Aparatos II y IV USP a partir de la disolución de Meloxicam de los productos analizados. La línea punteada indica el criterio de decisión del Factor de Similitud.

Además del cálculo del factor de similitud, se determinaron los parámetros modelo independiente Área Bajo la Curva (ABC), Eficiencia de Disolución (ED) y Tiempo Medio de Disolución (TMD); estos parámetros no proporcionan información sobre el proceso de disolución en sí, o de su evolución; más bien indican la “capacidad de disolución”<sup>(Aiche, Devisasaguet et al. 1983)</sup> y al mismo tiempo son esenciales para el establecimiento de algún nivel de correlación *in vitro-in vivo*<sup>(Cardot, Beyssac et al. 2007)</sup>.

Los valores promedio de estos parámetros calculados a partir de los datos de disolución de todos los productos en estudio con los dos aparatos de disolución se presentan en las tablas 45 y 48.

**Tabla 45. Valores promedio del Área Bajo la Curva, Eficiencia de Disolución y Tiempo Medio de Disolución obtenidos a partir de los perfiles de disolución de los productos evaluados en el Aparato II USP (modificado para pequeños volúmenes).**

Marca	Lote	Promedio ± DE		
		ABC (% min)	ED (%)	TMD (min)
Meloxi Pet's (S) <sup>®</sup>	MP186	4814 ± 234	80.23 ± 3.90	9.05 ± 0.54
	MP375	4008 ± 99	66.81 ± 1.65	14.92 ± 0.61
	MP391	4443 ± 121	74.05 ± 2.01	11.90 ± 0.79
Doxo 10 <sup>®</sup>	DX008	4370 ± 182	72.83 ± 3.03	14.03 ± 1.81
	DX009	4491 ± 99	74.85 ± 1.65	13.50 ± 0.84
Meloximax 1 <sup>®</sup>	MM170	3722 ± 225	62.04 ± 3.75	12.96 ± 0.71

**Tabla 46. Valores promedio del Área Bajo la Curva, Eficiencia de Disolución y Tiempo Medio de Disolución obtenidos a partir de los perfiles de disolución de los productos evaluados en el Aparato IV USP.**

Marca	Lote	Promedio ± DE		
		ABC (% min)	ED (%)	TMD (min)
Meloxi Pet's (S) <sup>®</sup>	MP186	5011 ± 104	83.52 ± 1.73	7.17 ± 0.24
	MP375	4345 ± 108	72.41 ± 1.81	13.10 ± 0.33
	MP391	4902 ± 61	81.71 ± 1.01	8.70 ± 0.33
Doxo 10 <sup>®</sup>	DX008	4480 ± 410	74.67 ± 6.84	15.47 ± 4.53
	DX009	4804 ± 335	80.07 ± 5.59	14.60 ± 3.53
Meloximax 1 <sup>®</sup>	MM170	3350 ± 186	55.83 ± 3.09	23.27 ± 2.18

La comparación estadística se realizó mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, para determinar si los valores promedio de los parámetros puntuales ABC, ED y TMD de los lotes analizados fueron significativamente diferentes entre sí.

**Tabla 47. Análisis de Varianza para la comparación del Área Bajo la Curva (ABC) de los perfiles de disolución de los productos analizados en los Aparato II (modificado) y IV USP.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.61827E7	11	1.47115E6	<b>34.33</b>	<b>0.0000</b>
Intra grupos	2.57101E6	60	42850.1		
Total (Corr.)	1.87537E7	71			

**Tabla 48. Análisis de Varianza para la comparación de la Eficiencia de Disolución (ED) en los perfiles de disolución de los productos analizados en los Aparato II (modificado) y IV USP.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4495.79	11	408.708	<b>34.34</b>	<b>0.0000</b>
Intra grupos	714.171	60	11.9029		
Total (Corr.)	5209.96	71			

**Tabla 49. Análisis de Varianza para la comparación del Tiempo Medio de Disolución (TMD) de los perfiles de disolución de los productos analizados en los Aparato II (modificado) y IV USP.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1127.41	11	102.492	<b>28.06</b>	<b>0.0000</b>
Intra grupos	219.118	60	3.65196		
Total (Corr.)	1346.53	71			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05 en el ANOVA de todos los parámetros modelo independiente (tablas 47, 48 y 49), se concluye que existe una diferencia estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95.0% entre al menos alguno de los valores promedio del ABC, ED o TMD.

Para determinar qué valores fueron significativamente diferentes de otros se utilizó la prueba de comparación múltiple de los Intervalos de Confianza (gráfico 28, 29 y 30). Los intervalos se construyeron utilizando el método de Intervalos de Confianza con Desviación Estándar Individual<sup>(Statgraphics 2006)</sup>, con un 95% de confianza para cada valor promedio.

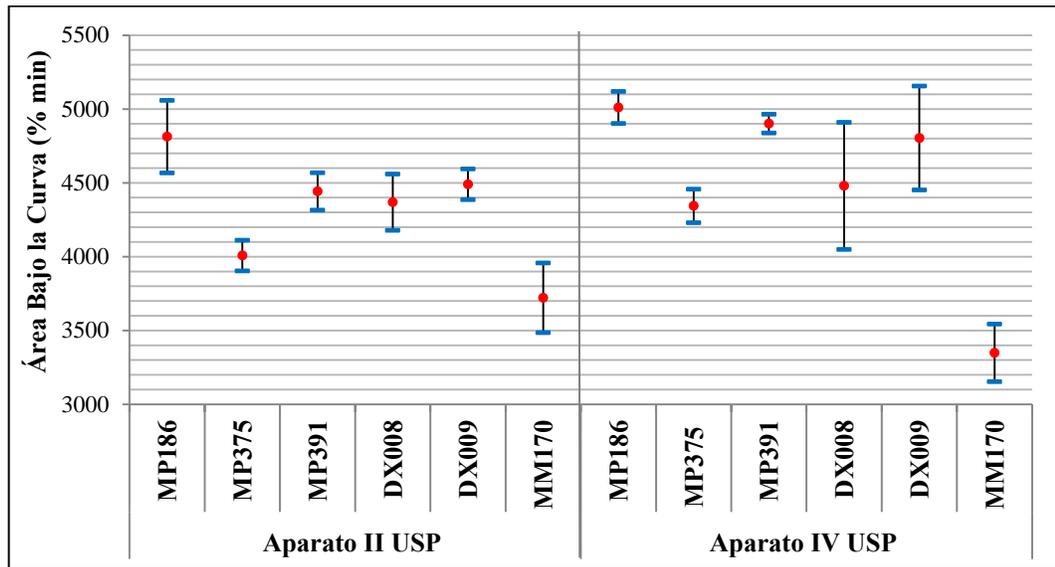


Gráfico 28. Intervalos de Confianza utilizando el método de Intervalos de Confianza con Desviación Estándar Individual para el Área Bajo la Curva (ABC) de los perfiles de disolución de los productos analizados en los Aparato II y IV USP ( $\alpha=0.05$ ,  $n=6$ ).

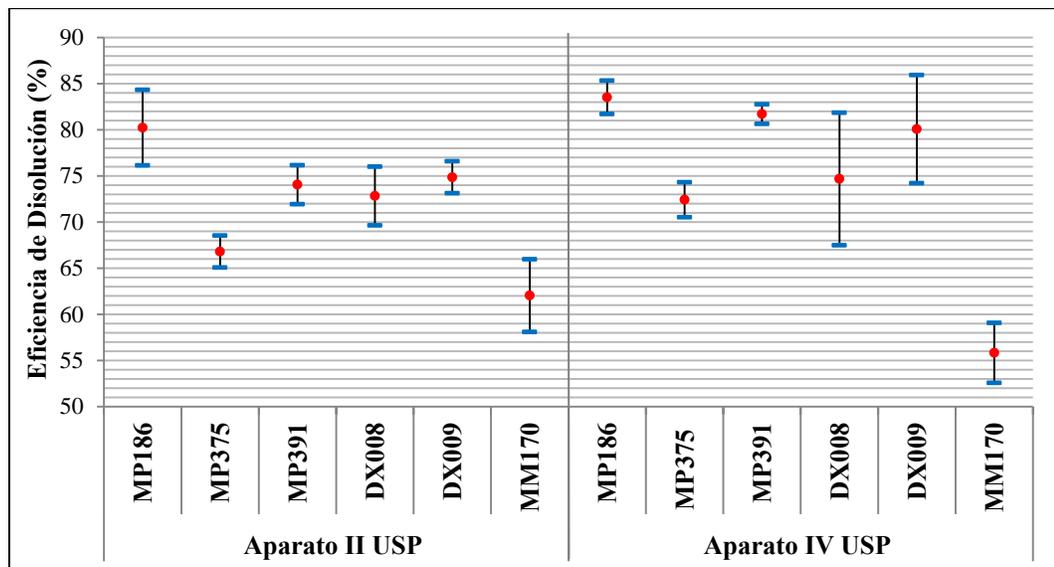
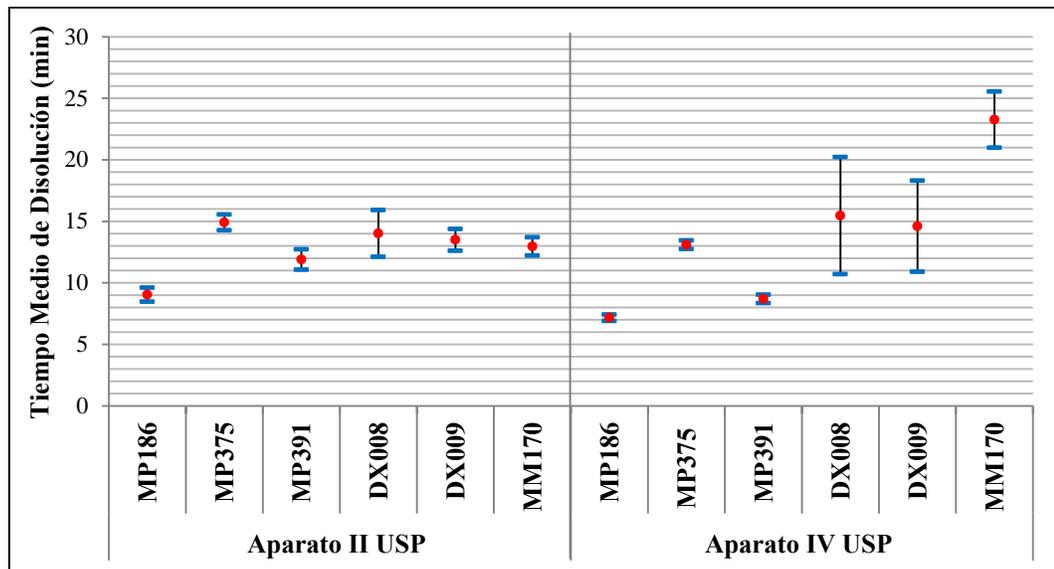


Gráfico 29. Intervalos de Confianza utilizando el método de Intervalos de Confianza con Desviación Estándar Individual para la Eficiencia de Disolución (ED) en los perfiles de disolución de los productos analizados en los Aparato II y IV USP ( $\alpha=0.05$ ,  $n=6$ ).



**Gráfico 30. Intervalos de Confianza utilizando el método de Intervalos de Confianza con Desviación Estándar Individual para el Tiempo Medio de Disolución (TMD) de los perfiles de disolución de los productos analizados en los Aparato II y IV USP ( $\alpha=0.05$ ,  $n=6$ ).**

Esta prueba mostró que las diferencias entre los parámetros modelo independiente de ABC, ED y TMD fueron prácticamente las mismas que se encontraron con aquellos valores de  $f_2$  que resultaron inferiores a 50. Es decir, si el valor de  $f_2$  resultante de la comparación de dos perfiles de disolución fue menor de 50, entonces los intervalos de confianza de estos mismos lotes no se traslaparon en dirección vertical y los perfiles también se consideraron diferentes. Este comportamiento se presentó en los dos equipos de disolución, sin embargo, al igual que con el valor de  $f_2$ , las diferencias fueron más claras cuando se utilizó el Aparato IV USP.

Con el objetivo de evaluar la cinética de liberación del Meloxicam, bajo los ambientes hidrodinámicos generados por los Aparatos II (modificado) y IV USP, los datos de disolución se ajustaron por regresión no lineal a los siguientes modelos cinéticos de disolución (Polli, Reki et al. 1997, Yuksel, Kanik et al. 2000, Zhang, Huo et al. 2010): Orden cero, Primer orden, Hixson-Crowell, Korsmeyer-Peppas, Higuchi y Weibull.

Estos modelos matemáticos han sido ampliamente utilizados para la representación paramétrica de los perfiles de disolución. Los modelos estándar en el análisis de datos de disolución son los modelos de orden cero y primer orden<sup>(Gibaldi and Feldman 1967, Wagner 1969, Varelas, Dixon et al. 1995)</sup>; el de Hixson-Crowell o modelo de la raíz cúbica<sup>(Hixson and Crowell 1931)</sup>; el de Higuchi o modelo de la raíz cuadrada del tiempo<sup>(Higuchi 1963)</sup> y el modelo de Korsmeyer-Peppas<sup>(Korsmeyer, Gurny et al. 1983, Peppas 1985)</sup>. La distribución de Weibull<sup>(Weibull 1951)</sup>, que fue adaptada para los procesos de disolución/ liberación<sup>(Langenbucher 1972)</sup>, es capaz de describir la forma sigmoidea de los perfiles de disolución.

La selección del modelo estuvo basada en las siguientes características de los modelos: el máximo valor del coeficiente de determinación ajustado ( $r^2_{Ajust}$ )<sup>(Costa and Sousa-Lobo 2001)</sup>; el menor valor del criterio de información de Akaike (AIC)<sup>(Akaike 1974)</sup> y el mayor valor del criterio de selección del modelo (MSC)<sup>(MicroMath 1995)</sup>.

Considerando estos criterios, el modelo de Weibull fue el que mejor se ajustó a los perfiles de disolución de todos los productos analizados (tabla 50). Este comportamiento se observó tanto para los datos de disolución obtenidos con el Aparato II USP (modificado) como para los datos del Aparato IV USP.

**Tabla 50. Criterios calculados para la selección del mejor modelo cinético de disolución.**

Criterio	Aparato	Lote	Orden Cero	Primer Orden	Hixson-Crowell	Korsmeyer-Peppas	Higuchi	Weibull
$r^2_{Ajust}$	II USP	MP186	-0.584	0.963	0.883	0.820	0.672	0.972
		MP375	0.441	0.978	0.935	0.931	0.935	0.989
		MP391	-0.102	0.956	0.895	0.887	0.827	0.977
		DX008	0.360	0.966	0.954	0.869	0.861	0.981
		DX009	0.418	0.980	0.980	0.870	0.880	0.990
		MM170	-0.099	0.806	0.658	0.943	0.873	0.983
	IV USP	MP186	-1.998	0.949	0.693	0.779	0.300	0.962
		MP375	0.199	0.982	0.947	0.901	0.891	0.987
		MP391	-1.296	0.970	0.835	0.856	0.557	0.989
		DX008	0.507	0.965	0.984	0.885	0.868	0.996
		DX009	0.501	0.935	0.967	0.856	0.855	0.987
		MM170	0.930	0.952	0.975	0.958	0.861	0.996

Tabla 50. Continuación.

AIC	II USP	MP186	94.237	54.116	68.078	73.226	78.449	52.681
		MP375	84.572	50.869	62.345	64.291	63.041	45.682
		MP391	90.433	57.712	66.642	68.412	71.820	52.133
		DX008	87.713	57.540	58.700	73.675	73.096	52.513
		DX009	88.323	54.257	54.153	74.228	72.648	48.482
		MM170	85.865	68.308	74.114	56.840	64.025	44.357
	IV USP	MP186	96.828	54.235	73.869	71.601	82.268	53.438
		MP375	88.064	48.955	60.201	68.013	68.266	46.956
		MP391	94.970	50.541	68.492	68.110	78.486	41.947
		DX008	84.484	60.775	52.480	72.159	73.571	38.783
		DX009	87.721	68.938	61.825	76.794	76.554	53.648
		MM170	65.435	63.030	56.554	62.053	74.062	38.482
MSC	II USP	MP186	-0.658	3.354	1.958	1.443	0.920	3.497
		MP375	0.387	3.758	2.610	2.415	2.540	4.276
		MP391	-0.294	2.978	2.085	1.908	1.567	3.536
		DX008	0.352	3.369	3.253	1.756	1.814	3.872
		DX009	0.356	3.763	3.773	1.766	1.924	4.340
		MM170	-0.286	1.470	0.889	2.616	1.898	3.865
	IV USP	MP186	-1.294	2.966	1.002	1.229	0.162	3.045
		MP375	0.033	3.944	2.819	2.038	2.012	4.144
		MP391	-1.028	3.415	1.620	1.658	0.620	4.274
		DX008	0.813	3.183	4.013	2.045	1.904	5.383
		DX009	0.658	2.537	3.248	1.751	1.775	4.066
		MM170	2.642	2.882	3.530	2.980	1.779	5.337

Los parámetros derivados de este modelo se presentan en la tabla 51.

Tabla 51. Valores de los parámetros estimados con el modelo de Weibull calculados a partir de los datos de disolución de los productos analizados en los Aparatos II (modificado) y IV USP (Promedio  $\pm$  DE, n=6).

Aparato	Lote	$\alpha$	$\beta$	$T_d$
II USP	MP186	7.933 $\pm$ 1.431	0.897 $\pm$ 0.132	10.204 $\pm$ 1.527
	MP375	14.037 $\pm$ 2.752	0.875 $\pm$ 0.074	20.221 $\pm$ 1.329
	MP391	8.260 $\pm$ 0.718	0.800 $\pm$ 0.040	14.020 $\pm$ 1.213
	DX008	32.194 $\pm$ 20.902	1.171 $\pm$ 0.233	15.903 $\pm$ 2.469
	DX009	28.164 $\pm$ 9.628	1.212 $\pm$ 0.104	15.066 $\pm$ 1.209
	MM170	7.046 $\pm$ 0.798	0.612 $\pm$ 0.032	24.636 $\pm$ 5.453
IV USP	MP186	5.865 $\pm$ 1.063	0.854 $\pm$ 0.110	7.825 $\pm$ 0.376
	MP375	13.375 $\pm$ 3.038	0.927 $\pm$ 0.080	16.059 $\pm$ 1.090
	MP391	6.183 $\pm$ 0.750	0.817 $\pm$ 0.054	9.243 $\pm$ 0.387
	DX008	58.074 $\pm$ 38.074	1.403 $\pm$ 0.078	16.666 $\pm$ 5.062
	DX009	76.021 $\pm$ 32.376	1.612 $\pm$ 0.050	14.440 $\pm$ 3.883
	MM170	160.147 $\pm$ 65.709	1.466 $\pm$ 0.120	30.065 $\pm$ 2.713

En este modelo, el parámetro de escala ( $\alpha$ ) define la escala temporal del proceso de disolución. Sin embargo, en el caso del ajuste de perfiles de disolución, el parámetro  $\alpha$  puede ser reemplazado por un parámetro que brinda más información, el valor del Tiempo de Disolución, ( $T_d$ )<sup>(Costa and Sousa-Lobo 2001)</sup>, que representa el intervalo de tiempo necesario para disolver o liberar el 63.2% del Meloxicam presente en los comprimidos evaluados.

El factor de forma ( $\beta$ ) caracteriza al perfil de disolución, ya sea exponencial ( $\beta = 1$ ; caso 1); sigmoidea, con una curvatura hacia arriba seguida por un punto de inflexión ( $\beta > 1$ ; caso 2); o parabólica, con una pendiente inicial mayor y después de esto, consistente con la exponencial ( $\beta < 1$ ; caso 3)<sup>(Costa and Sousa-Lobo 2001, Zhang, Huo et al. 2010)</sup>.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el valor  $\beta (<1)$  de los perfiles de disolución de todos los lotes del producto Meloxi Pet's (S)<sup>®</sup> sugiere que su forma es parabólica, con una rápida velocidad de disolución al inicio de la prueba y donde posteriormente la velocidad es exponencial (Figura 20).

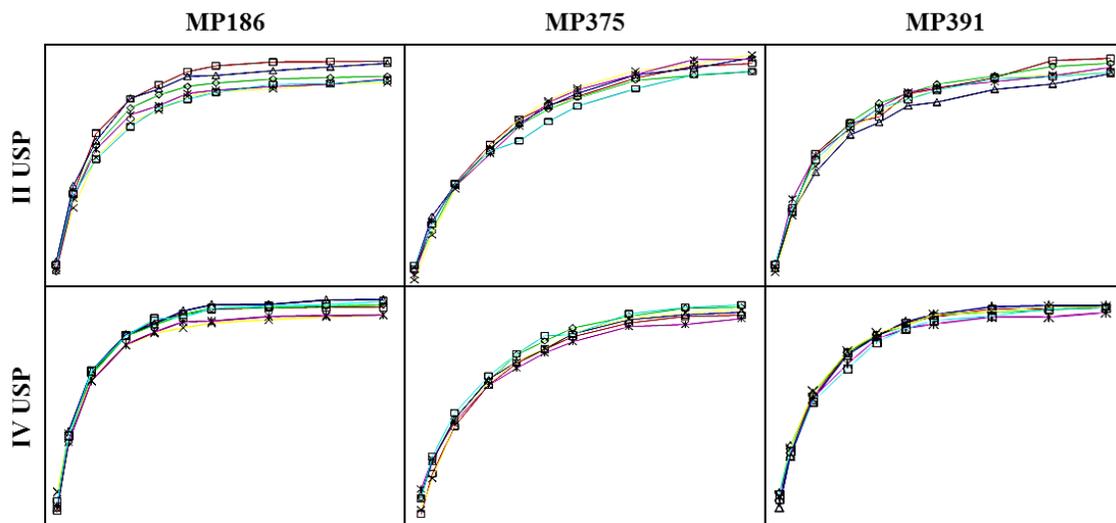
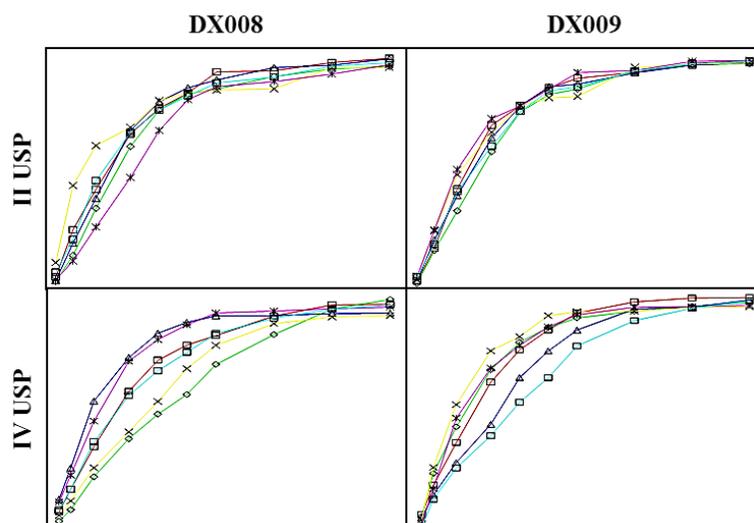


Figura 20. Forma de los perfiles de disolución de los lotes de la marca Meloxi Pet's(S)<sup>®</sup> obtenidos con los Aparatos II (modificado) y IV USP.

El valor  $\beta$  ( $>1$ ) muestra que la forma de los perfiles de disolución de los lotes de la marca Doxo 10<sup>®</sup> es sigmoidea, presentan una ligera curvatura hacia arriba y posteriormente hay un punto de inflexión (Figura 21).



**Figura 21.** Forma de los perfiles de disolución de los lotes de la marca Doxo 10<sup>®</sup> obtenidos con los Aparatos II (modificado) y IV USP.

En los dos anteriores casos, los valores del factor de forma tanto de los perfiles obtenidos con el Aparato II USP como con el Aparato IV USP coincidieron. Es decir, los lotes del producto Meloxi Pet's (S)<sup>®</sup> mostraron forma parabólica sin importar el equipo de disolución utilizado, mientras que los de la marca Doxo 10<sup>®</sup> tuvieron forma sigmoidea. La comparación estadística se realizó mediante sus intervalos de confianza, tal y como se muestran en el gráfico 31.

El valor del factor de forma de los perfiles de disolución del lote de la marca Meloximax 1<sup>®</sup>, a diferencia de las otras dos marcas estudiadas, mostró ser diferente dependiendo del equipo de disolución empleado. Cuando se utilizó el Aparato II USP el valor de  $\beta$  fue menor de la unidad, lo cual indica perfiles con forma parabólica; mientras que con el Aparato IV USP se obtuvieron perfiles de forma sigmoidea. La diferencia en la forma de los perfiles de disolución de este lote se puede observar en la figura 22. En el

gráfico 31 se puede observar estadísticamente esta diferencia, al encontrarse sus intervalos de confianza completamente separados, uno con valor promedio menor a la unidad y el otro por encima de esta.

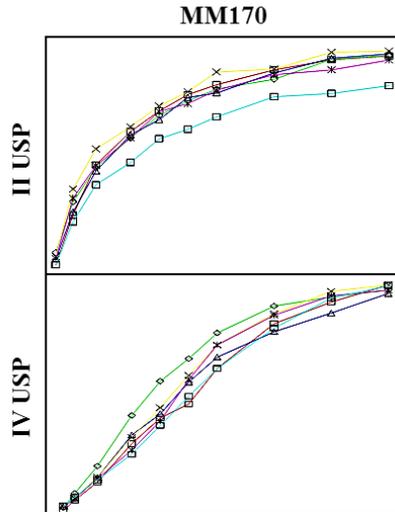


Figura 22. Forma de los perfiles de disolución del lote de la marca Meloximax 1<sup>®</sup> obtenidos con los Aparatos II (modificado) y IV USP.

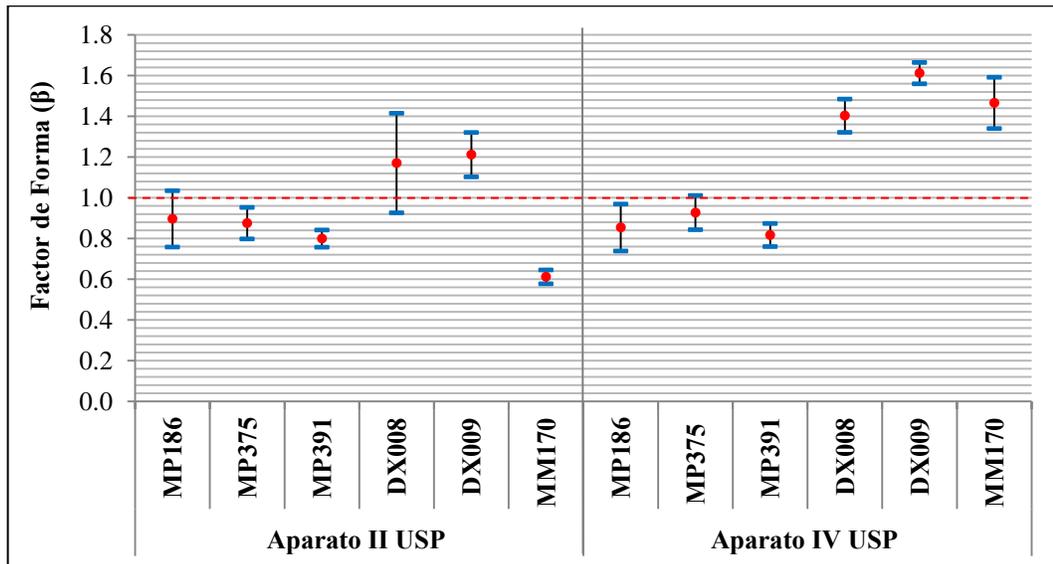
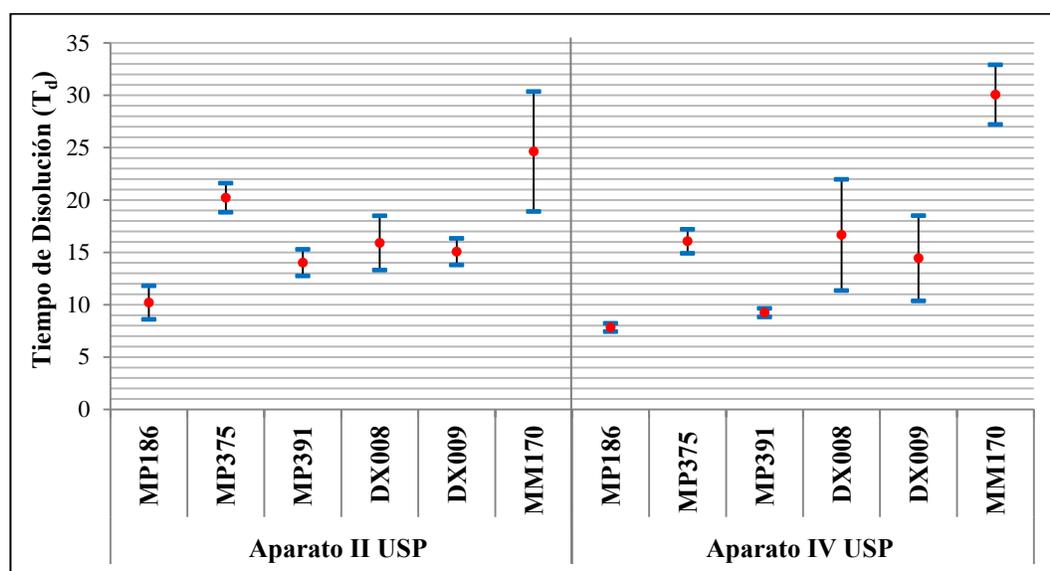


Gráfico 31. Intervalos de Confianza utilizando el método de Intervalos de Confianza con Desviación Estándar Individual para el Factor de Forma ( $\beta$ ) de los perfiles de disolución de los productos analizados en los Aparato II y IV USP ( $\alpha=0.05$ ,  $n=6$ ).

El valor del tiempo de disolución ( $T_d$ ), obtenido como uno de los parámetros del modelo de Weibull, resultó ser significativamente diferente entre algunos de los lotes analizados con el Aparato II USP. La comparación estadística de este parámetro resultó ser un método más discriminativo que el factor de similitud, ya que según este parámetro solamente hubo similitud entre los lotes MP391, DX008 y DX009; así como entre los lotes MP375 y MM170. Estas diferencias fueron todavía más claras con el Aparato IV USP, con el que solamente hubo similitud entre los lotes MP375, DX008 y DX009 (Gráfico 32).



**Gráfico 32. Intervalos de Confianza utilizando el método de Intervalos de Confianza con Desviación Estándar Individual para el Tiempo de Disolución ( $T_d$ ) de los perfiles de disolución de los productos analizados en los Aparato II y IV USP ( $\alpha=0.05$ ,  $n=6$ ).**

Una de las desventajas de esta forma estadística de comparación utilizando los intervalos de confianza, es que toma en consideración la desviación estándar<sup>(Statgraphics 2006)</sup> del parámetro evaluado para cada grupo de perfiles; por lo tanto, aquellos lotes cuyas desviaciones estándar hayan sido grandes, tendrán intervalos de confianza mucho mayores que aquellos en los que la desviación estándar haya sido menor, haciendo más fácil su traslape con los intervalos del resto de los lotes. Por esta razón, aunado el hecho de que esta forma de comparación no es un método oficial, este análisis se utilizó simplemente para

comparar los parámetros obtenidos con el modelo de Weibull, y no para establecer la similitud entre los perfiles de disolución ya que se pueden magnificar las diferencias entre los perfiles de los productos analizados en ambos equipos de disolución, sin que estas diferencias sean relevantes en el desempeño *in vivo* de los productos estudiados.

El último análisis realizado a los perfiles de disolución en el presente trabajo fue un Análisis de Componentes Principales (PCA), planteado como un método alternativo para comparar el comportamiento de disolución de los productos estudiados.

El PCA permitió obtener, a partir de todo el conjunto de datos de disolución, un reducido número de nuevas variables que no están correlacionadas entre sí, los Componentes Principales (PC). Estos PC están ordenados de acuerdo a su capacidad de explicar la variabilidad en los datos, de forma tal que los primeros PC son los que poseen mayor información de las datos originales<sup>(Maggio, Castellano et al. 2008)</sup>. De esta forma, el PCA nos permitió visualizar tendencias en los perfiles de disolución.

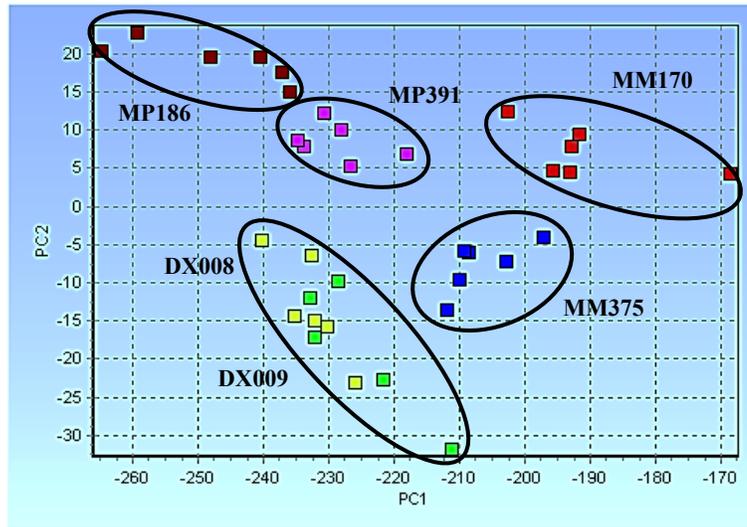
Para realizar el PCA no se aplicó ningún pretratamiento matemático a los datos de disolución. El número óptimo de PC se eligió de tal forma que se explicara al menos el 95% de la varianza. Como se observa en la tabla 52, en ambos aparatos de disolución, el primer PC explicó más del 95% de la variación de los datos.

**Tabla 52. Porcentaje de variación explicado por los primeros cinco PC.**

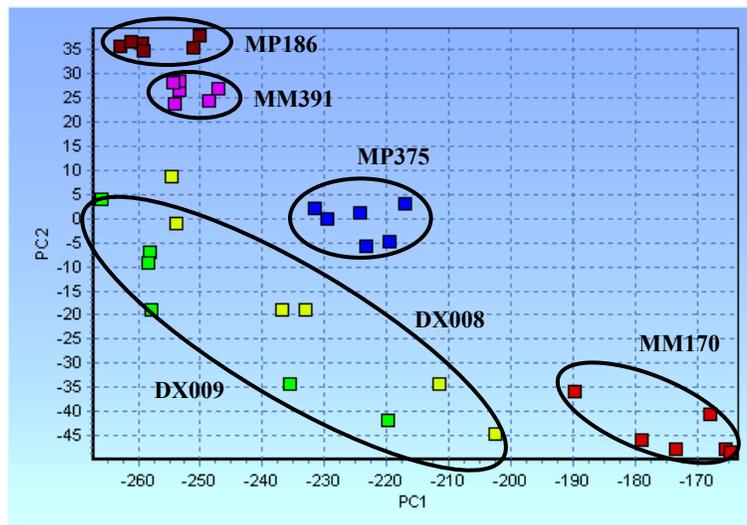
No. de PC	% Variación Explicada	
	II USP	IV USP
1	99.519%	98.250%
2	0.393%	1.577%
3	0.056%	0.141%
4	0.011%	0.015%
5	0.007%	0.008%

Los resultados del PCA resultaron mucho más discriminativos que cualquiera de los otros métodos utilizados para la comparación de los perfiles de disolución. En el gráfico 33 se presentan los valores de scores para los dos primeros PC de los perfiles del Aparato II

USP. Se puede observar que la técnica es capaz de discriminar entre casi todos los lotes evaluados, a excepción de los lotes DX008 y DX009. El mismo patrón se observa con los perfiles del Aparato IV USP (Gráfico 34).



**Gráfico 33.** Gráficos de scores obtenidos mediante el PCA para la comparación de los perfiles de disolución obtenidos con el Aparato II USP (modificado para pequeños volúmenes).



**Gráfico 34.** Gráficos de scores obtenidos mediante el PCA para la comparación de los perfiles de disolución obtenidos con el Aparato IV USP.

Con estos resultados también se puede observar el grado de dispersión que hay en cada uno de los lotes. Esto es importante de señalar debido a que algunas formas de comparación, como el factor de similitud ( $f_2$ ), no toman en cuenta la variabilidad intra-lote ya que se calcula con los valores promedio<sup>(FDA 1997)</sup>.

De acuerdo con los resultados obtenidos y con base en las pruebas estadísticas de comparación, los lotes de comprimidos MP186 y MP391, de la marca Meloxi Pet's (S)<sup>®</sup> son los que mejor comportamiento de disolución mostraron; estos tuvieron una variabilidad intra-lote muy baja y demostraron similitud en sus perfiles de disolución. El lote MP375, de la misma marca, mostró un comportamiento claramente diferente al de los dos lotes anteriores.

Los lotes DX008 y DX009, de la marca Doxo 10<sup>®</sup>, tuvieron una velocidad de disolución menor que los de la marca Meloxi Pet's(S)<sup>®</sup> y su variabilidad intra-lote fue mayor; sin embargo, el comportamiento de disolución de estos dos lotes fue similar.

El único lote evaluado de la marca Meloximax 1<sup>®</sup> (MM170) fue el que peor comportamiento de disolución presentó, y a pesar de que su variabilidad intra-lote no fue muy grande, este lote no mostró similitud con el resto de los lotes evaluados.

Este comportamiento en los perfiles de disolución de los productos evaluados se observó de manera general, independientemente del Aparato de disolución que se haya empleado. Por tanto, los medicamentos estudiados en este trabajo, no pueden ser considerados como equivalentes farmacéuticos.

## 7. Caracterización Físicoquímica de la Materia Prima de Meloxicam

### 7.1. Disolución Aparente del Meloxicam en Aparato IV USP

Para evaluar la equivalencia farmacéutica, se consideró importante conocer toda la información posible de los productos estudiados, por lo que se realizó la caracterización físicoquímica de los diferentes lotes de materia prima de Meloxicam; ya que en la literatura se encuentra reportado que el Meloxicam puede existir en varias formas cristalinas y puede presentar polimorfismo<sup>(Luger, Daneck et al. 1996, Clavo, Coppi et al. 2003)</sup>.

Los resultados de la disolución aparente de la materia prima se presentan en el gráfico 35, en el cual se pueden observar tres comportamientos distintos en cuanto a la velocidad de disolución.

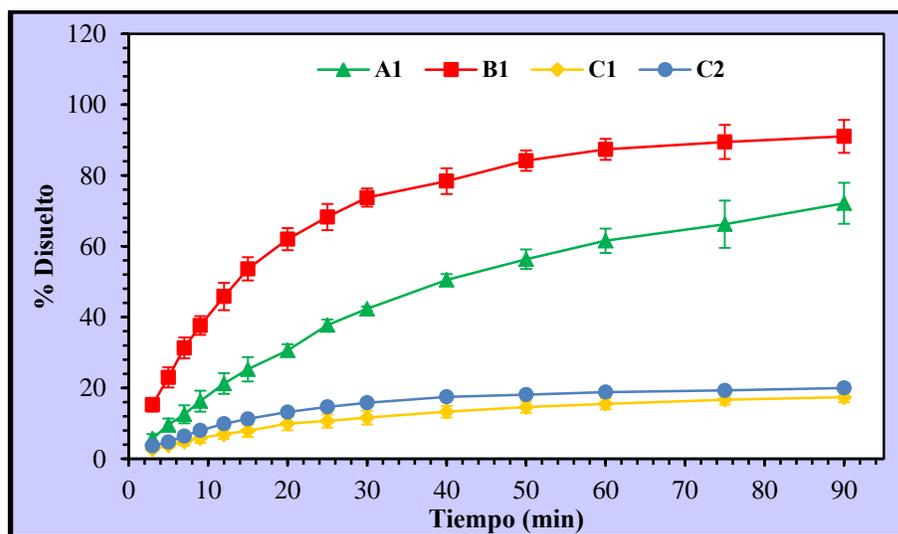
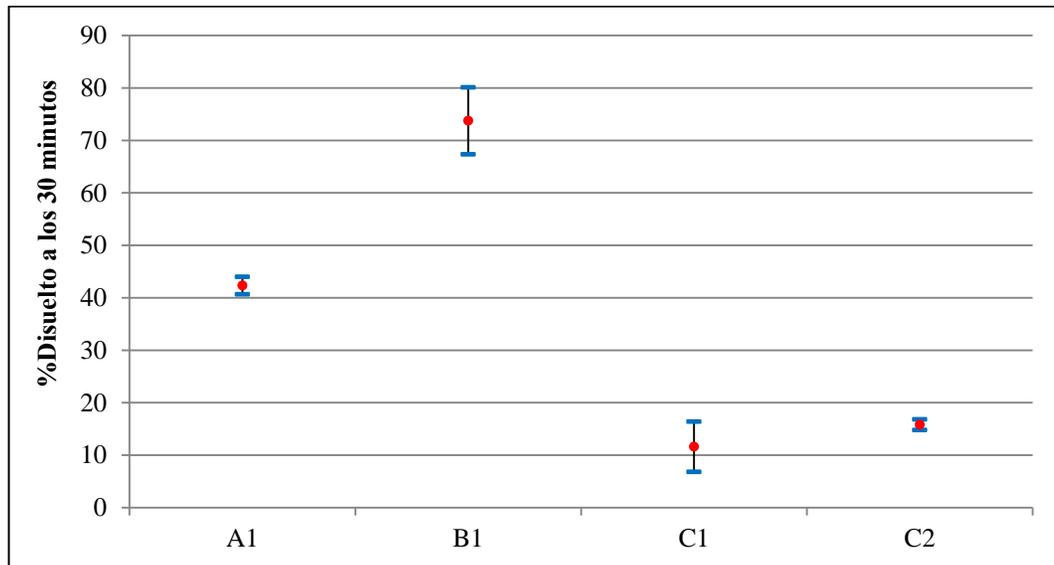


Gráfico 35. Velocidad de Disolución Aparente de las materias primas de Meloxicam obtenidos con el Aparato IV USP (Promedio  $\pm$  DE, n=3).

El porcentaje de Meloxicam disuelto a los 30 minutos de los lotes C1 y C2 fue de solamente el 12 y 16%, respectivamente; el lote A1 alcanzó el 42% y el lote B1 alcanzó el

75%. Una diferencia claramente significativa que se pudo corroborar haciendo el análisis estadístico mediante intervalos de confianza al 95%, el cual se presenta en el gráfico 36.

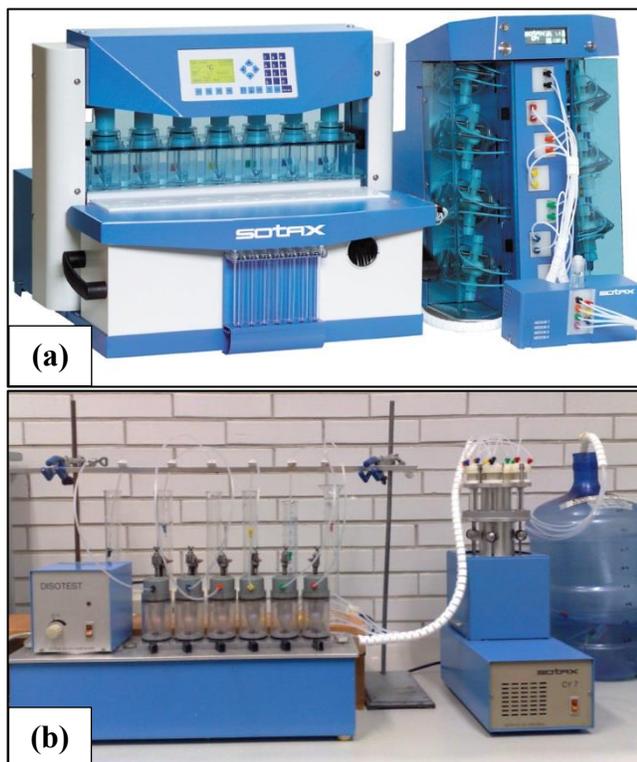


**Gráfico 36. Intervalos de Confianza utilizando el método de Intervalos de Confianza con Desviación Estándar Individual para los valores del % de Meloxicam disuelto a los 30 minutos de los lotes de Materia Prima A1, B1, C1 y C2 ( $\alpha=0.05$ ,  $n=3$ ).**

Por cuestiones de tiempo y equipo los lotes A1 y B1 se analizaron utilizando el Aparato IV USP de la marca Sotax, modelo CE7Smart (el modelo más reciente de este equipo); mientras que los lotes C1 y C2 se analizaron utilizando el Aparato IV USP también de la marca Sotax pero el modelo CE6, un modelo más antiguo (de los años 1976-1978).

La diferencia más importante entre estos equipos es la bomba con la que funcionan; el modelo CE6 utiliza una bomba de pistones, mientras que el modelo CE7Smart trabaja con una bomba digital con flujo independiente en cada canal de salida del medio de disolución<sup>(Sotax 2013)</sup>. Ésta podría ser la razón por la cual los lotes C1 y C2 alcanzaron porcentajes de fármaco disuelto tan bajos.

Las diferencias entre ambos modelos se muestran en la figura 23.



**Figura 23. Diferencias entre los dos modelos utilizados del Aparato IV USP marca Sotax. (a) Modelo CE7Smart con bomba digital. (b) Modelo CE6 con bomba de pistones.**

El lote B1, con el que se fabricaron los lotes de comprimidos DX008 y DX009, es el que mejor comportamiento de disolución presentó, lo cual se vio reflejado en las buenas características de liberación y disolución que mostraron estos comprimidos. Se esperaba que los lotes C1 y C2, con los que se fabricaron los lotes de comprimidos MP186, MP375 y MP391, mostraran también buenas características de disolución; sin embargo, muy probablemente las diferencias en el modelo del Aparato IV USP no permitieron que el porcentaje de Meloxicam disuelto fuera mayor. El lote de materia prima A1, con el que se fabricó el lote de comprimidos MM170, se disolvió con una menor velocidad y en menor cantidad; lo cual coincide con la menor liberación y disolución que mostró este lote de comprimidos.

## 7.2. Difracción de Rayos X

Se sabe que el Meloxicam presenta polimorfismo, con dos diferentes formas cristalinas: la zwitteriónica (conocida como la forma IV) y la forma enólica (forma I)<sup>(Luger, Daneck et al. 1996)</sup>. Además de estas dos formas, existen otras tres formas cristalinas (formas II, III y V) que pueden servir como intermediarios o como productos de partida para la preparación de la forma I<sup>(Coppi, Bartra Sanmarti et al. 2005)</sup>.

Los difractogramas de las materias primas de Meloxicam se presentan en la figura 24. Como se puede observar, el patrón de difracción del lote A1 difiere del patrón de los lotes B1, C1 y C2.

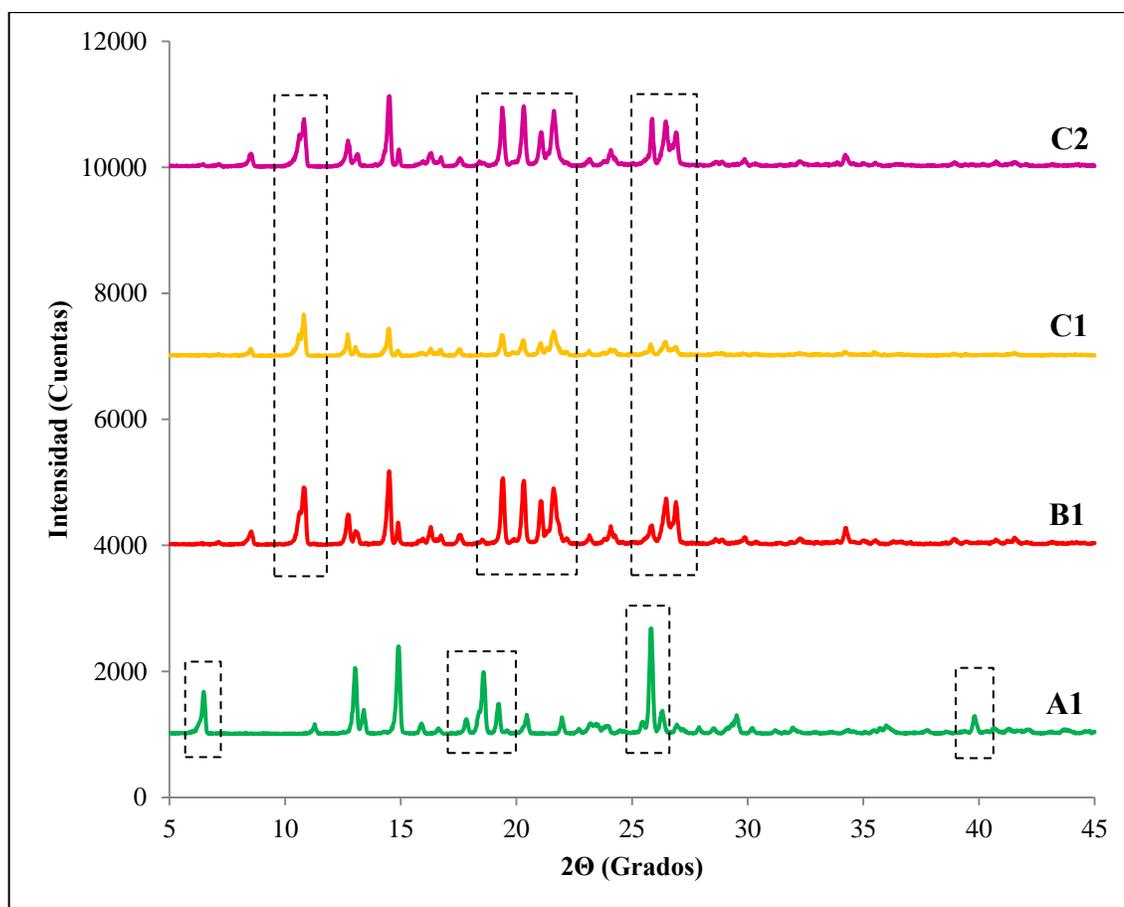


Figura 24. Patrones de Difracción de Rayos X en polvo de las materias primas de Meloxicam analizadas.

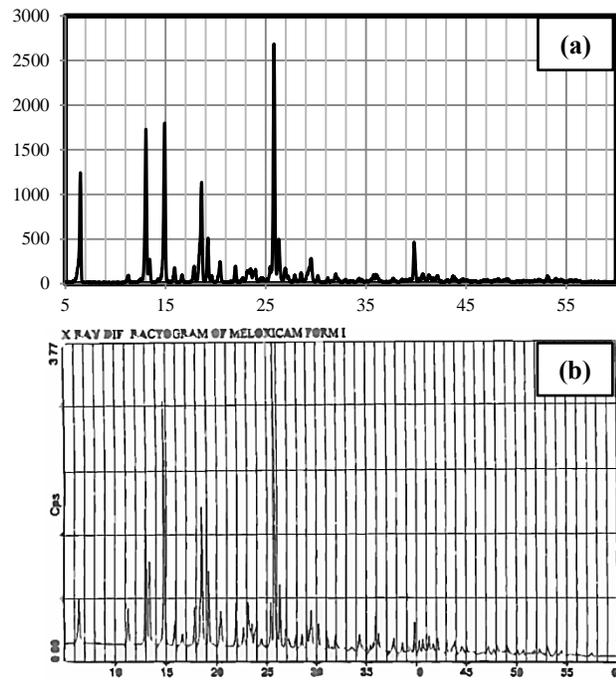


Figura 25. Patrón de Difracción de Rayos X en polvo de (a) Meloxicam materia prima lote A1; (b) Forma polimórfica I del Meloxicam reportado en la literatura (Clavo, Coppi et al. 2003).

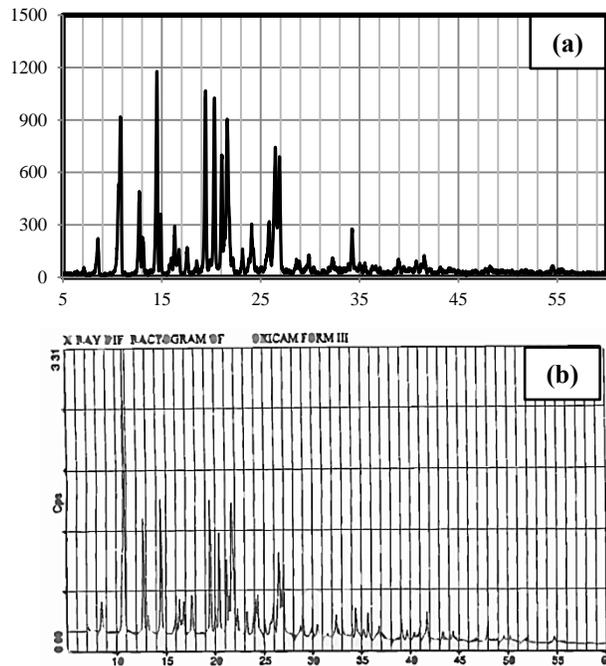


Figura 26. Patrón de Difracción de Rayos X en polvo de (a) Meloxicam materia prima lotes B1, C1 y C2; (b) Forma polimórfica III del Meloxicam reportado en la literatura (Clavo, Coppi et al. 2003).

Al comparar el patrón de difracción de los lotes B1, C1 y C2 con los difractogramas reportados en la literatura para los polimorfos del Meloxicam, estos resultaron ser similares al difractograma de la forma polimórfica III (Figura 26), mientras que el patrón de difracción del lote A1 tuvo mayor similitud con el difractograma reportado para la forma polimórfica I (Figura 25). Se podría concluir entonces que, para la fabricación de los lotes comprimidos analizados en este trabajo se emplearon estas dos formas polimórficas.

La forma polimórfica III del Meloxicam (lotes B1, C1 y C2) mostró tener una velocidad de disolución mayor, debido a su menor grado de cristalinidad. Un material menos cristalino tiene un potencial químico notablemente mayor que un material muy cristalino, esto conlleva una mayor solubilidad local del principio activo en la interfaz del medio de disolución y por lo tanto, a una velocidad de transferencia de masa más rápida hacia el medio de disolución<sup>(Hu, Rogers et al. 2002)</sup>. Esto podría explicar el hecho de que los lotes de comprimidos MP186, MP375, MP391, DX008 y DX009, fabricados con estos lotes de materia prima, mostraran una mayor velocidad de disolución en sus perfiles (gráficos 18, 22 y 26). Con el lote de materia prima B1 se fabricaron los lotes de comprimidos DX008 y DX009, los perfiles de estos lotes demostraron similitud entre sí con ambos equipos de disolución (gráficos 20 y 24). Con el lote de materia prima C1 se fabricaron los lotes de comprimidos MP186 y MP391; y con la materia prima C2 se fabricó el lote de comprimidos MP375. Los perfiles de los lotes MP186 y MP391 fueron similares con ambos equipos de disolución; sin embargo, el lote MP375 se comportó diferente en su disolución respecto a los otros dos lotes de la misma marca (gráficos 19 y 23).

El único lote de comprimidos fabricados con Meloxicam en su forma polimórfica I fue el lote MM170. En la literatura se encuentra reportado que esta forma es la que se emplea para la fabricación de medicamentos de uso veterinario<sup>(Luger, Daneck et al. 1996, EMA 2010)</sup>. De acuerdo con la figura 24, la forma I (lote A1) es la que tiene picos de mayor intensidad, esto indica un grado de cristalinidad mayor. Esto se ve reflejado en su menor velocidad de disolución en comparación con la forma III (gráfico 35), y por lo tanto, en la menor velocidad de disolución de Meloxicam que mostraron los perfiles del lote de comprimidos MM170 (gráficos 18 y 22).

### 7.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La caracterización de las materias primas del Meloxicam mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) no reveló diferencias en su comportamiento térmico. Todos los lotes del Meloxicam mostraron endotermas bien definidas correspondientes a sus puntos de fusión, lo que indica su naturaleza cristalina. No hubieron cambios apreciables en las endotermas de fusión de los lotes de materia prima analizados (A1=255.09°C, B1=256.57°C, C1=256.56°C y C2=257.06°C), como se puede observar en la figura 27. La endoterma de fusión del Meloxicam está seguida por un pico exotérmico, el cual podría ser debido a su descomposición o a su recristalización (Nassab, Rajko et al. 2006, Pomázi, Ambrus et al. 2011).

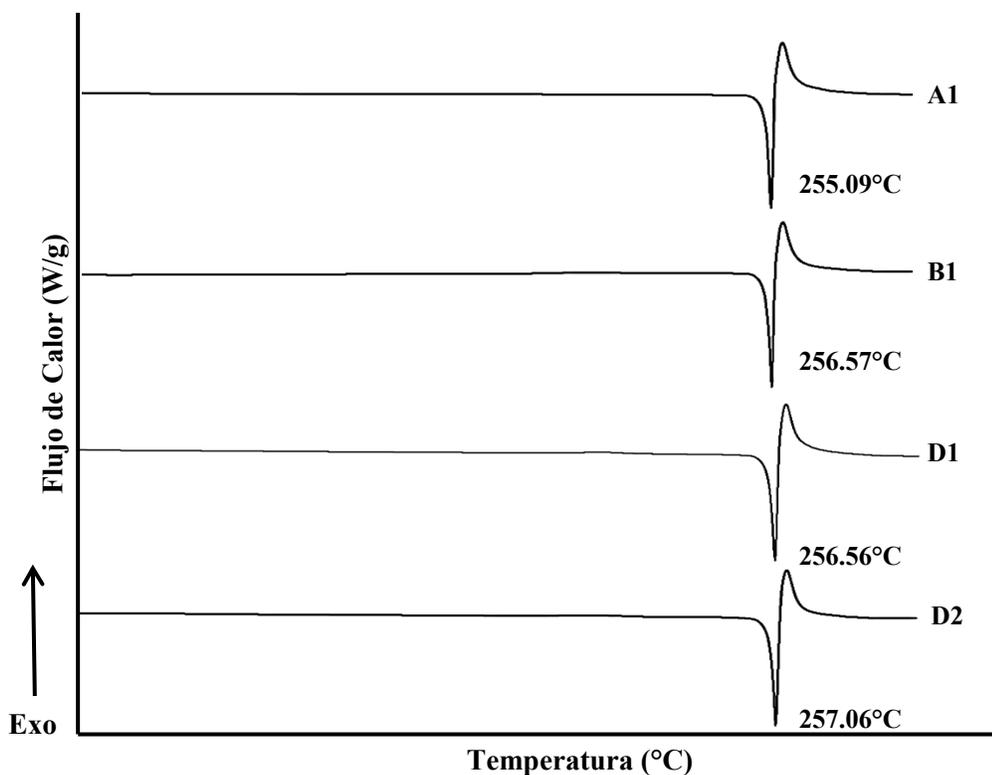


Figura 27. Termogramas por DSC de los lotes de materia prima del Meloxicam analizados.

#### 7.4. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La caracterización morfológica y del hábito cristalino de las materias primas de Meloxicam se realizó mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Las micrografías de los lotes de materia prima analizados se muestran en la figura 28. En las imágenes se pueden observar los grandes cristales anisodimensionales de las materias primas del Meloxicam. La mayoría de los lotes de Meloxicam analizados mostraron superficies lisas con una forma prismática regular, a excepción del lote A1, que mostró una forma irregular con una superficie áspera.

La diferencia en el hábito cristalino puede ser la causa de la menor velocidad de disolución observada para el lote A1. Cabe resaltar que el lote A1 fue identificado como la forma polimórfica I del Meloxicam (la forma enólica) que, según la literatura, cristaliza como un sistema triclinico con dos moléculas en la celda unitaria<sup>(Luger, Daneck et al. 1996)</sup>. Por el contrario, los lotes B1, C1 y C2 fueron identificados como la forma polimórfica III, cuyo sistema cristalino no ha sido identificado pero que podría ser monoclinico, triclinico u ortorrómbico, con cuatro, dos u ocho moléculas en la celda unitaria respectivamente<sup>(Luger, Daneck et al. 1996)</sup>, dependiendo del solvente y método de cristalización empleado. De forma que, a pesar de la similitud en el hábito cristalino de las dos formas polimórficas, las diferencias que afectan la velocidad de disolución entre una y otra podrían estar relacionadas con la red cristalina de cada polimorfo, más que en las características superficiales de los cristales.

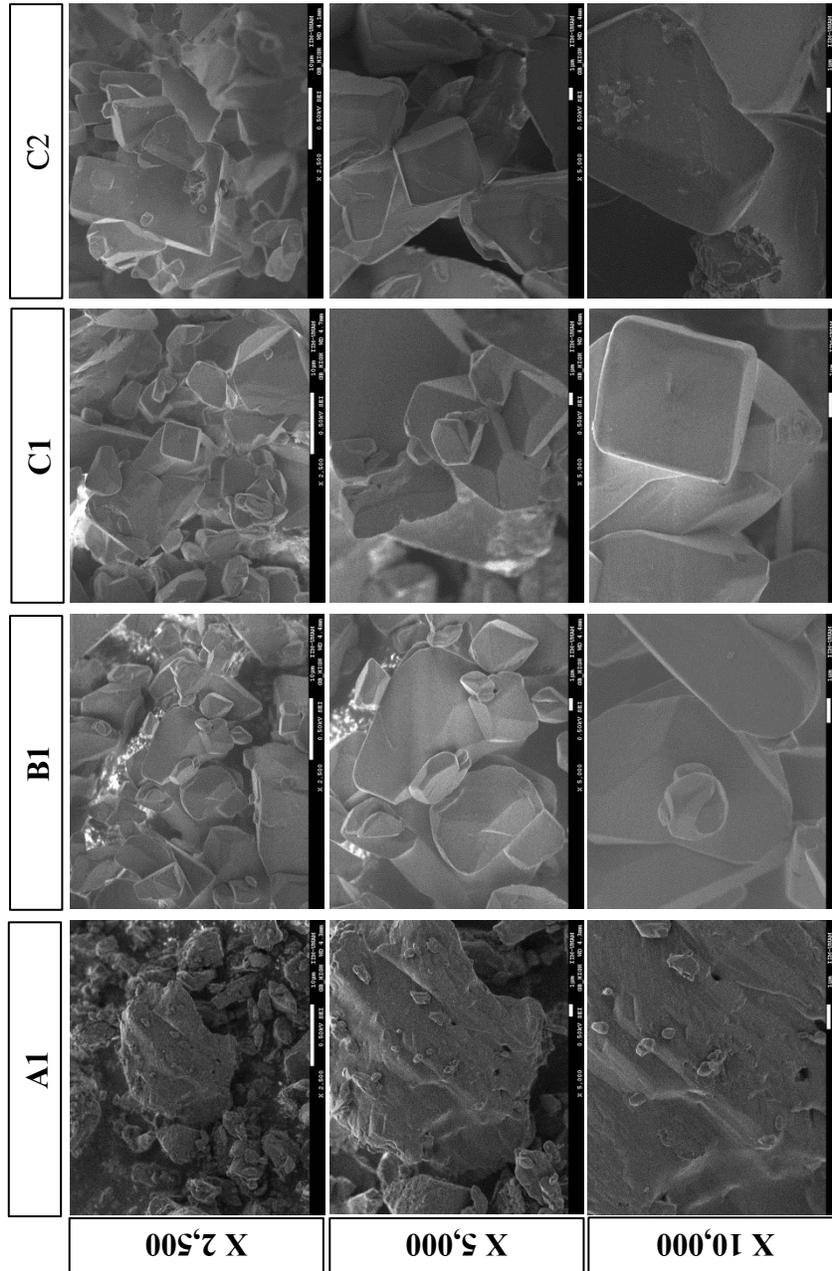


Figura 28. Imágenes de los lotes de materia prima de Meloxicam obtenidas mediante Microscopía Electrónica de Barrido a diferentes aumentos.

## VII. CONCLUSIONES

El método analítico por CLAR desarrollado para la cuantificación de Meloxicam demostró ser exacto, preciso, reproducible, repetible y específico. El método fue lineal en un amplio rango de concentraciones y utilizó una fase móvil que puede ser fácilmente preparada, por lo que puede ser utilizado con confianza para el análisis rutinario de materia prima de Meloxicam y en formas farmacéuticas que contengan este principio activo.

Los laboratorios fabricantes de los medicamentos de Meloxicam analizados, cumplieron con los controles farmacopéicos para asegurar la calidad tanto del proceso de fabricación como del producto terminado; sin embargo, no demostraron equivalencia farmacéutica debido a las diferencias encontradas en la liberación y disolución *in vitro* del principio activo. Los comprimidos de la marca Meloxi Pet's (S)<sup>®</sup> fueron los que mejor comportamiento de disolución mostraron, mientras que los de la marca Meloximax 1<sup>®</sup> fueron los que tuvieron menor velocidad de disolución.

Tanto el Aparato II USP modificado para pequeños volúmenes, como el Aparato IV USP, mostraron claras ventajas de aplicación para la evaluación de medicamentos de uso veterinario, ya que estos equipos permitieron simular de manera más real las condiciones fisiológicas de la especie animal para la que estaban destinados los medicamentos evaluados. Ambos equipos permitieron el desarrollo de ensayos de disolución fiables y sensibles, como herramienta de predicción del comportamiento de la biodisponibilidad del fármaco *in vivo*.

La evaluación de las diferencias en el comportamiento de disolución del Meloxicam en los productos estudiados estuvo respaldada por pruebas estadísticas confiables, que mostraron una mayor sensibilidad y capacidad de discriminación del Aparato IV USP para detectar dichas diferencias.

La caracterización del estado sólido de las muestras de materia prima de Meloxicam mediante difracción de rayos X evidenció que los laboratorios fabricantes de los

medicamentos evaluados en el presente trabajo, utilizaron las formas polimórficas I y III de Meloxicam para su fabricación; hecho que muy probablemente contribuyó a las diferencias observadas en los perfiles de disolución de dichos medicamentos. Por otra parte, los datos obtenidos mediante Calorimetría Diferencial de Barrido mostraron que no hay diferencias entre los puntos de fusión de las formas polimórficas I y III del Meloxicam. Las imágenes obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido nos permitieron observar diferencias en la morfología y tamaño de los cristales de Meloxicam. Estas pruebas indican que se requiere mayor control en la selección de materias primas que serán utilizadas para la fabricación de los comprimidos de Meloxicam, ya que esto influyó en la disolución de dicho fármaco.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdou, H. M. (1989). Dissolution, Bioavailability & Bioequivalence. Easton, Pennsylvania, Mack Publishing Co.
- Aguilar-Díaz, J. E. (2008) "Aspectos Generales del Ensayo de Disolución USP I y USP II para Formas Farmacéuticas Sólidas."
- Aiache, J. M., J. Devisasaguet and A. M. Guyot-Hermann (1983). Biofarmacia. Mexico, D.F., El Manual Moderno.
- Akaike, H. (1974). "A New Look at the Statistical Model Identification." IEEE Transactions on Automatic Control **19**(6): 716-723.
- Altınöz, S., E. Nemetlu and S. Kır (2002). "Polarographic behaviour of meloxicam and its determination in tablet preparations and spiked plasma." Il Farmaco **57**(6): 463-468.
- APVMA Bioequivalence Guidelines for Veterinary Chemical Products - Guideline No. 13, Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority.
- Augsburger, L. (2000). Personal communication.
- Aulton, M. E. (2004). Farmacia: La Ciencia del Diseño de las Formas Farmacéuticas. Madrid, España, Elsevier.
- Baggot, J. D. and S. A. Brown (2010). Basis for Selection of the Dosage Form. Development and formulation of veterinary dosage forms. G. E. Hardee and J. D. Baggot. New York, Drugs and the Pharmaceutical Sciences. Informa Healthcare. . **88**: 7-144.
- Bandarkar, S. and P. Vavia (2009). "A Stability Indicating HPLC Method for the Determination of Meloxicam in Bulk and Commercial Formulations." Tropical Journal of Pharmaceutical Research **8**(3): 257-264.
- Banker, G. S. and N. R. Anderson (1986). Tablets The Theory and Practice of Industrial Pharmacy. L. Lachman, Lieberman, H. A. and Kanig, J. L. Philadelphia, Lea & Febiger: 301-303.
- Baum, C., D. L. Kennedy and M. B. Forbes (1985). "Utilization of nonsteroidal antiinflammatory drugs." Arthritis and Rheumatism **28**(6): 686-692.
- Bebawy, L. I. (1998). "Stability-Indicating Method for the Determination of Meloxicam and Tetracaine Hydrochloride in the Presence of their Degradation Products." Spectroscopy Letters: An International Journal for Rapid Communication **31**(4): 797-820.
- Bertolini, G., C. Minelli and N. e. a. Latronico (2002). "The use of analgesic drugs in postoperative patients: the neglected problem of pain control in intensive care units. An observational, prospective, multicenter study in 128 Italian intensive care units." European Journal of Clinical Pharmacology **58**(1): 73-77.

- Brideau, C., C. Van Staden and C. Chan Chi (2001). "In vitro effects of cyclooxygenase inhibitors in whole blood of horses, dogs and cats." American Journal of Veterinary Research **62**(11): 1755–1760.
- Bruner, L. and S. Tolloczko (1901). "Über die Auflösungsgeschwindigkeit fester Körper." Zeitschrift für anorganische Chemie **28** (1): 314–330.
- Brunner, E. (1904). "Reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen Systemen." Zeitschrift für Physikalische Chemie **43** 56–102.
- Busch, U., J. Schmid, G. Heinzl, H. Schmaus, J. Baierl, C. Huber and W. Roth (1998). "Pharmacokinetics of meloxicam in animals and the relevance to humans." Drug Metabolism and Disposition **26**(6): 576-584.
- Capner, C., B. Lascelles and A. Waterman-Pearson (1999). "Current British veterinary attitudes to perioperative analgesia for dogs." The Veterinary Record **145**(4): 95-99.
- Cardot, J.-M., E. Beyssac and M. Alric (2007). "In Vitro–In Vivo Correlation: Importance of Dissolution in IVIVC." Dissolution Technologies **14**(1): 15-19.
- Clavo, M., L. Coppi and M. Sanmarti (2003). Crystalline forms of meloxicam and processes for their preparation and interconversion, Google Patents.
- CNQFB Guía de Validación de Métodos Analíticos México Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C.: Comisión de validación de métodos analíticos 123.
- Code of Federal Regulations Title 21, C. (1992). Part 320. Bioavailability and Bioequivalence Requirements. F. a. D. A. D. o. H. a. H. Services. USA.
- Code of Federal Regulations Title 21, C. (2011). Title 21 - Food and Drugs. Sec. 320.1 Definitions. **5**.
- Coppi, L., M. Bartra Sanmarti and M. Closa Clavo (2005). New crystalline forms of meloxicam and processes for their preparation and interconversion.
- Costa, P. and J. M. Sousa-Lobo (2001). "Modeling and comparison of dissolution profiles." European Journal of Pharmaceutical Sciences **13**(2): 123-133.
- CPMP, C. f. P. M. P. (2001). Note for Guidance on the Investigation Of Bioavailability and Bioequivalence. CPMP/EWP/QWP/140/98.
- Crail, D. J., A. Tunis and R. Dansereau (2004). "Is the use of a 200 ml vessel suitable for dissolution of low dose drug products?" International Journal of Pharmaceutics **269**(1): 203-209.
- Dasandi, B., B. Shivaprakash, H. Saroj and K. M. Bhat (2002). "LC determination and pharmacokinetics of meloxicam." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **28**(5): 999-1004.
- Ding, L., H. Chen, H. Jiang, Y. Y. Hou and Z. X. Zhang (2002). "Determination of meloxicam in human plasma by HPLC and relative bioavailability of meloxicam dispersible tablets." Chinese Journal of Pharmaceutics **33**(3): 131–133.

- Distel, M., C. Mueller, E. Bluhmki and J. Fries (1996). "Safety of meloxicam: a global analysis of clinical trials." British Journal of Rheumatology **35**: 68–77.
- Dohoo, S. and I. Dohoo (1996). "Postoperative use of analgesics in dogs and cats by Canadian veterinarians." Canadian Veterinary Journal **37**(9): 546–551.
- Ehrlein, H. J. and J. Pröve (1982). "Effect of viscosity of test meals on gastric emptying in dogs." Quarterly Journal of Experimental Physiology (Cambridge, England) **67**(3): 419-425.
- Elbary, A., N. Foda and M. Elkhateeb (2001). "Reversed phase liquid chromatographic determination of meloxicam in human plasma and its pharmacokinetic application." Analytical Letters **34**(7): 1175-1187.
- EMA (2010). Scientific Discussion for the Approval of Meloxoral. V. M. a. P. D. Management, European Medicines Agency
- EMA (2011). Guidelines for the Conduct of Bioequivalence Studies for Veterinary Medicinal Products. C. f. V. M. Products. London EMEA/CVMP/016/00-corr-FINAL.
- Engelhardt, G. (1996). "Pharmacology of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory drug with an improved safety profile through preferential inhibition of COX-2." British Journal of Rheumatology **35**: 4-12.
- Engelhardt, G., R. Bögel, C. Schnitzler and R. Utzmann (1996). "Meloxicam: influence on arachidonic acid metabolism Part 1. In Vitro findings." Biochemical Pharmacology **51**(1): 21-28.
- Ermer, J. (2005). Method Validation in Pharmaceutical Analysis. Weinheim, Republic of Germany, Wiley-VCH: 15-19, 21, 30, 55, 63, 80, 120 y 170.
- Europea, P. E. y. C. d. I. U. (2001). DIRECTIVA 2001/82/CE por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios, Diario Oficial de la Unión Europea.
- FD&C, T. F. D. a. C. A. (2006). "Chapter V: Drugs and Devices Sec. 512 New animal drugs."
- FDA (1994). Reviewer Guidance. Validation of Chromatographic Methods. C. f. D. E. a. R. (CDER), Food and Drug Administration 30.
- FDA (2000). Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation. . C. f. D. E. a. R. (CDER), Food and Drug Administration: 33.
- FDA (2002). Bioequivalence Guidance. C. f. V. Medicine. Rockville.
- FDA (2013). Dissolution Methods Database Disclaimer. Quarterly.
- FDA, C. (2000). Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Dosage Forms Based on a Biopharmaceutical Classification System. C. f. D. E. a. Research.
- FDA, F. a. D. A. (1997). Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms.

FDA, F. a. D. A. (2003). "Guidance for Industry. Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products - General Considerations."

FID (1995). "Guidelines for Dissolution Testing of Solid Oral Products."

Fleischer, S., M. Sharkey, K. Mealey, E. A. Ostrander and M. N. Martinez (2008). "Pharmacogenetic and Metabolic Differences Between Dog Breeds: Their Impact on Canine Medicine and the Use of the Dog as a Preclinical Animal Model." American Association of Pharmaceutical Scientists Journal **10**(1): 110-119.

G., I. M. and F. H. G. (2011). "Intrinsic Dissolution as a Tool for Evaluating Drug Solubility in Accordance with the Biopharmaceutics Classification System." Dissolution Technologies **18**(3): 6-13.

Gajendran, J., J. Krämer and L. Timothy-Grady (2005). Historical Development of Dissolution Testing. Pharmaceutical Dissolution Testing, J. D. a. J. Krämer. New York, Informa Healthcare: 1-37.

García, M., C. Sánchez-Pedreño, M. Albero and J. Martí (2000). "Spectrophotometric methods for determining meloxicam in pharmaceuticals using batch and flow-injection procedure." European Journal of Pharmaceutical Sciences **9**(3): 311-316.

Gibaldi, M. and S. Feldman (1967). "Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations. Theoretical considerations and application to nondisintegrating dosage forms." Journal of Pharmaceutical Sciences **56**(10): 1238-1242.

Glantzmann, J. M. (2007) "A Review of Dissolution tests with the Flow Through Method (USP 4)."

Glasser, A. C. (1987). "Aspects for bioavailability and bioequivalence revision: possible implications on clinical pharmacology." Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology **9**(7): 449-452.

González-Canga, A., A. M. Sahagún-Prieto, M. Diez-Liébana, N. Fernández-Martínez, M. Sierra-Vega and J. J. García-Vieitez (2009). "The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species." The Veterinary Journal **179**(1): 25-37.

Gupta, P. K. and J. R. Robinson (1995). "Effect of volume and viscosity of coadministered fluid on gastrointestinal distribution of small particles." International Journal of Pharmaceutics **125**(2): 185-193.

Guyot-Hermann (1992). "Tablet disintegration and disintegrating agents." S.T.P.. Pharmaceutical Science **2**(6): 445-462.

Hansen, B. and E. Hardie (1993). "Prescription and use of analgesics in dogs and cats in a veterinary teaching hospital: 258 cases (1983-1989)." Journal of the American Veterinary Medical Association **202**(9): 1485-1494.

Hanson, W. A. (1991). Handbook of Dissolution Testing. Eugene, Oregon, Aster Publishing.

Hassan, E. M. (2002). "Spectrophotometric and fluorimetric methods for the determination of meloxicam in dosage forms." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **27**(5): 771-777.

- Hayashida, S., L. Gutiérrez, J. Luna del Villar, F. Osnaya and H. Sumano (2011). "Bioequivalencia de dos formulaciones de amoxicilina-ácido clavulánico para uso oral en perros." Veterinaria México **42**: 197-205.
- Henke, J. and W. Erhardt (2004). Control del dolor en pequeños animales y mascotas. Alemania, Mosby.
- Hernández-Herrero, G., A. Moreno-Gonzalez, F. Zaragoza-Garcia and A. Porras-Chavarino (2010). Tratado de Medicina Farmacéutica. Madrid, España, Ed. Médica Panamericana.
- Higuchi, T. (1963). "Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices." Journal of Pharmaceutical Sciences **52**(12): 1145-1149.
- Hixson, A. W. and J. H. Crowell (1931). "Dependence of Reaction Velocity upon surface and Agitation." Industrial & Engineering Chemistry **23**(8): 923-931.
- Hopkała, H. and A. Pomykalski (2003). "TLC analysis of inhibitors of cyclooxygenase and videodensitometric determination of meloxicam and tiaprofenic acid." JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC **16**(2): 107-111.
- Hu, J., T. L. Rogers, J. Brown, T. Young, K. P. Johnston and R. O. Williams, 3rd (2002). "Improvement of dissolution rates of poorly water soluble APIs using novel spray freezing into liquid technology." Pharmaceutical Research **19**(9): 1278-1284.
- Hugonnard, M., A. Leblond, S. Keroack, J. Cador and E. Troncy (2004). "Attitudes and concerns of French veterinarians towards." Veterinary Anaesthesia and Analgesia **31**: 154-163.
- IMPI, I. M. d. I. P. I. (2010). "Gaceta de Marcas Registradas, Avisos y Nombres Comerciales y Denominaciones de Origen." from <http://siga.impi.gob.mx/>.
- IMSS, I. M. d. S. S. (2014). Grupos Terapéuticos del Cuadro Básico de Medicamentos. Grupo N° 1: Analgesia
- Induri, M., M. Mantripragada, R. Yejella, P. Kunda, D. Nannapaneni and R. Boddu (2012 ). "Dissolution studies and quantification of meloxicam in tablet dosage form by spectrophotometry." Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences **25**(1): 283-287.
- Joseph-Charles, J. and M. Bertucat (1999). "Determination of Meloxicam in Tablet Formulations by Ultraviolet Spectrophotometry and High-Performance Liquid Chromatography." Analytical Letters **32**(10): 2051-2059.
- Joseph-Charles, J. and M. Bertucat (1999). "Simultaneous high performance liquid chromatographic analysis of Non-Steroidal Anti-Inflammatory oxicams in pharmaceutical preparations " Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies **22**(13): 2009-2021.
- Kamba, M., Y. Seta, A. Kusai and K. Nishimura (2001). "Evaluation of the mechanical destructive force in the stomach of dog." International Journal of Pharmaceutics **228**(1-2): 209-217.
- Kaniwa, N., N. Aoyagi, H. Ogata and A. Ejima (1988). "Gastric emptying rates of drug preparations. I. Effects of size of dosage forms, food and species on gastric emptying rates." Journal of Pharmacobio-Dynamics **11**(8): 563-570.

- Kasim, N. A., M. Whitehouse, C. Ramachandran, M. Bermejo, H. Lennernäs, A. S. Hussain, H. E. Junginger, S. A. Stavchansky, K. K. Midha, V. P. Shah and G. L. Amidon (2003). "Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification." Molecular Pharmaceutics **1**(1): 85-96.
- Kay-Mugford, P., S. J. Benn, J. LaMarre and P. Conlon (2000). "In vitro effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on cyclooxygenase activity in dogs." American Journal of Veterinary Research **61**(7): 802–810.
- King, J. N., C. Rudaz, L. Borer, M. Jung, W. Seewald and P. Lees (2010). "In vitro and ex vivo inhibition of canine cyclooxygenase isoforms by robenacoxib: a comparative study." Research in Veterinary Science **88**(3): 497–506.
- Klein, S. and V. P. Shah (2008). "A Standardized Mini Paddle Apparatus as an Alternative to the Standard Paddle." AAPS PharmSciTech **9**(4): 1179-1184.
- Korsmeyer, R. W., R. Gurny, E. Doelker, P. Buri and N. A. Peppas (1983). "Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers." International Journal of Pharmaceutics **15**(1): 25-35.
- Kuchekar, B., S. Late, A. Shingavi and D. Shinde (2001). "Spectrophotometric Estimation Of Melatonin And Meloxicam Using Folin-Ciocalteu Reagent." Indian Journal of Pharmaceutical Sciences **63** (4): 321-323.
- Laboratories, T. S. R. (2013). BCS (Biopharmaceutics Classification System).
- Lainesse, C. (2012). "International Veterinary Bioequivalence Guideline Similarities and Differences Between Australia, Canada, Europe, Japan, New Zealand and the United States." The AAPS Journal **14**(4): 792-798.
- Langenbucher, F. (1972). "Letters to the Editor: Linearization of dissolution rate curves by the Weibull distribution." Journal of Pharmacy and Pharmacology **24**(12): 979-981.
- Lasagna, L. (1969). "The pharmaceutical revolution: its impact on science and society." Science **166**(3910): 1227-1233.
- Lindenberg, M., S. Kopp and J. B. Dressman (2004). "Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **58**(2): 265-278.
- Lu, Y., S. Kim and K. Park (2011). "In vitro–in vivo correlation: Perspectives on model development." International Journal of Pharmaceutics **418**(1): 142-148.
- Luger, P., K. Daneck, W. Engel, G. Trummlitz and K. Wagner (1996). "Structure and physicochemical properties of meloxicam, a new NSAID." European Journal of Pharmaceutical Sciences **4**(3): 175-187.
- Lugo-Santos, N. A. (2006). Desarrollo y validación de procesos farmacéuticos. Desarrollo y validación de un método analítico para evaluar perfiles de disolución de clorhidrato de propafenona en tabletas por espectrofotometría ultravioleta, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

- Lui, C. Y., G. L. Amidon, R. R. Berardi, D. Fleisher, C. Youngberg and J. B. Dressman (1986). "Comparison of gastrointestinal pH in dogs and humans: Implications on the use of the beagle dog as a model for oral absorption in humans." Journal of Pharmaceutical Sciences **75**(3): 271-274.
- Luna, S. P. L., A. C. Basilio, P. V. M. Steagall, L. P. Machado, F. Q. Moutinho, R. K. Takahira and C. V. S. Brandaño (2007). "Evaluation of adverse effects of long-term oral administration of carprofen, etodolac, flunixin, meglumine, ketoprofen, and meloxicam in dog." American Journal of Veterinary Research **58**(3): 258-264.
- Maggio, R. M., P. M. Castellano and T. S. Kaufman (2008). "A new principal component analysis-based approach for testing "similarity" of drug dissolution profiles." European Journal of Pharmaceutical Sciences **34**(1): 66-77.
- Martinez, M., G. Amidon, L. Clarke, W. W. Jones, A. Mitra and J. Riviere (2002). "Applying the biopharmaceutics classification system to veterinary pharmaceutical products: Part II. Physiological considerations." Advanced Drug Delivery Reviews **54**(6): 825-850.
- Martinez, M., L. Augsburger, T. Johnston and W. W. Jones (2002). "Applying the Biopharmaceutics Classification System to veterinary pharmaceutical products: Part I: Biopharmaceutics and formulation considerations." Advanced Drug Delivery Reviews **54**(6): 805-824.
- Martinez, M., R. P. Hunter, R. Baynes, E. Bermingham, R. Claxton, C. Cole, J. Del Castillo, R. Gehring, K. Harshman, C. Lainesse, A. Lucas, S. Modric and J. Robinson (2011). "The 2010 AAVPT / EAVPT / ECVPT-VTP bioequivalence workshop." Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics **34**: 105-107.
- Martinez, M. N. and R. P. Hunter (2010). "Current challenges facing the determination of product bioequivalence in veterinary medicine." Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics **33**(5): 418-433.
- Martinez, M. N. and M. G. Papich (2009). "Factors influencing the gastric residence of dosage forms in dogs." Journal of Pharmaceutical Sciences **98**(3): 844-860.
- Martinez, M. N. H., R. P. (2012). "Introduction to the bioequivalence theme issue." Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics **35**: 1-2.
- Medina-López, J. R. and H. D. Ortiz-Quintero (2006). "Utilidad del Aparato de Celda de Flujo Continuo en la Disolución de Fármacos Altamente Solubles " inFÁRMate **2**(7).
- Meyer, H., E. Kienzle and J. Zentek (1993). "Body size and relative weight of gastrointestinal tract and liver in dogs." Journal of Veterinary Nutrition **2**: 31-35.
- Meyer, J. H., J. Dressman, A. Fink and G. Amidon (1985). "Effect of size and density on canine gastric emptying of nondigestible solids." Gastroenterology **89**(4): 805-813.
- MicroMath (1995). Scientist User Handbook. Salt Lake, MicroMath.
- Mirza, T., Y. Joshi, Q. Liu and R. Vivilecchia (2005). "Evaluation of dissolution hydrodynamics in the USP, Peak™ and Flat-Bottom Vessels using different solubility drugs." Dissolution Technologies **12**(1): 11-16.

- Miyabayashi, T., J. P. Morgan, M. A. O. Atilola and L. Muhumuza (1986). "Small intestinal emptying time in normal Beagle dogs " Veterinary Radiology **27**(6): 164-168.
- Moffat, A. C., M. D. Osselton and B. Widdop (2004). Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. London, Pharmaceutical Press.
- Montgomery, D. C. (2004). Diseño y Análisis de Experimentos Limusa
- Nageswara Rao, R., S. Meena and A. Raghuram Rao (2005). "An overview of the recent developments in analytical methodologies for determination of COX-2 inhibitors in bulk drugs, pharmaceuticals and biological matrices." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **39**(3-4): 349-363.
- Nassab, P. R., R. Rajko and P. Szabo-Revesz (2006). "Physicochemical characterization of meloxicam-mannitol binary systems." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **41**(4): 1191-1197.
- Nemutlu, E., F. Sayın, N. Başçı and S. Kır (2007). "A Validated Hplc Method for the Determination of Meloxicam in pharmaceutical preparations." Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy **27**(2): 107-118.
- Niebergall, P., G. Milosovich and J. Goyan (1963). "Dissolution rate studies II. Dissolution of particles under conditions of rapid agitation." Journal of Pharmaceutical Sciences **52**(3): 236-241.
- Noyes, A. A. and W. R. Whitney (1897). "The Rate of Solution of Solid Substances in their Own Solutions." Journal of the American Chemical Society **19**(12): 930-934.
- Osol, A. and J. E. Hoover (1975). Remington's pharmaceutical sciences. Easton, Pennsylvania, Mack Publishing Co
- Peppas, N. A. (1985). "Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers." Pharmaceutica Acta Helvetiae **60**(4): 110-111.
- Peterson, K. D. and T. J. Keefe (2004). "Effects of meloxicam on severity of lameness and other clinical signs of osteoarthritis in dogs." Journal of the American Veterinary Medical Association, **225**(7): 1056-1060.
- Polli, J. E., G. S. Rekhi, L. L. Augsburger and V. P. Shah (1997). "Methods to compare dissolution profiles and a rationale for wide dissolution specifications for metoprolol tartrate tablets." Journal of Pharmaceutical Sciences **86**(6): 690-700.
- Pomázi, A., R. Ambrus, P. Sipos and P. Szabó-Révész (2011). "Analysis of co-spray-dried meloxicam-mannitol systems containing crystalline microcomposites." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **56**(2): 183-190.
- Quattrocchi, O. A. (1992). Introducción a la HPLC: aplicación y práctica. Buenos Aires, Argentina, Artes Gráficas Farro.
- Reddy, M., T. Krishna, K. Rajita and D. Shankar (2001). "New spectrophotometric methods for the determination of meloxicam." Indian Journal of Pharmaceutical Sciences **63**(3): 245-247.

- Ricketts, A. P., K. M. Lundy and S. B. Seibel (1998). "Evaluation of selective inhibition of canine cyclooxygenase 1 and 2 by carprofen and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs." American Journal of Veterinary Research **59**(11): 1441–1446.
- Ritschel, W. A. (1987). "Aspects for bioavailability and bioequivalence revision: possible implications on clinical pharmacology." Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology **9**(7): 453-459.
- Ritschel, W. A., P. Agrawala, M. Kraeling, G. Sathyan and K. Berger (1988). "In vitro evaluation of a sustained-release veterinary peroral pellet preparation." Journal of Pharmaceutical Sciences **77**(9): 757-759.
- Sagawa, K., F. Li, R. Liese and S. C. Sutton (2009). "Fed and fasted gastric pH and gastric residence time in conscious beagle dogs." Journal of Pharmaceutical Sciences **98**(7): 2494-2500.
- Sakore, S. and B. Chakraborty (2011). "In Vitro–In Vivo Correlation (IVIVC): A Strategic Tool in Drug Development." Journal of Bioequivalence & Bioavailability **S3**. doi:10.4172/jbb.S3-001.
- Sane, R., S. Vandana and F. Mary (2000). "Extractive colorimetric determination of meloxicam from its pharmaceutical preparations." Indian Drugs 390-393.
- Scheubel, E., M. Lindenberg, E. Beyssac and J.-M. Cardot (2010). "Small Volume Dissolution Testing as a Powerful Method during Pharmaceutical Development." Pharmaceutics **2**(4): 351-363.
- Scholz, A., E. Kostewicz, B. Abrahamsson and J. B. Dressman (2003). "Can the USP paddle method be used to represent in-vivo hydrodynamics?" Journal of Pharmacy and Pharmacology **55**(4): 443-451.
- Sener, E., G. Altiocka, Z. Atkosar and M. Tuncel (2001). "Flow injection analysis of meloxicam using UV-detection." Pharmazie **56**(2): 186-187.
- Shaji, J. a. V., D. (2012). "Development of a validated stability-indicating HPTLC method for determination of Meloxicam in bulk and pharmaceutical formulations: Pertinence to ICH guidelines." International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences **4**(1): 160-169.
- Siewert, M., J. B. Dressman, C. K. Brown, V. P. Shah, J.-M. Aiache, N. Aoyagi, D. Bashaw, C. Brown, W. Brown, D. Burgess, J. Crison, P. DeLuca, R. Djerki, J. B. Dressman, T. Foster, K. Gjellan, V. Gray, A. S. Hussain, T. Ingallinera, J. Klancke, J. Kraemer, H. Kristensen, K. Kumi, C. Leuner, J. Limberg, P. Loos, L. Margulis, P. Marroum, H. Moeller, B. Mueller, M. Mueller-Zsigmondy, N. Okafo, L. Ouder Kirk, S. Parsi, S. Qureshi, J. Robinson, V. P. Shah, M. Siewert, R. Uppoor and R. Williams (2003). "FIP/AAPS guidelines to dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms." AAPS PharmSciTech **4**(1): 43-52.
- Silva, E., R. Pimentel, R. Bonfilio, D. Borges de Oliveira, G. Pereira and M. Benjamim de Araújo (2009). "Dissolution test optimization for meloxicam in the tablet pharmaceutical form." Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences **45**(1): 67-73.
- Sinha, P. K., R. M. Jeswani, K. S. Topagi and M. C. Damle (2009). "A validated RP-HPLC method for determination of Meloxicam in the Presence of its Impurities." International Journal of PharmTech Research **1**(4): 1051-1060.

- Sotax (2013). 35 years of Flow-Through Cell Dissolution: 35 years of Evolution and Flexibility. S. S. f. P. Testing.
- SSA (1990). Requisito para el Registro Sanitario de Medicamentos en México. S. d. S. D. d. G. d. C. d. I. p. l. Salud. México.
- SSA (1998). "NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas."
- SSA (2006). NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos (modifica a la NOM-059-SSA1-1993, publicada el 31 de julio de 1998). S. d. Salud.
- SSA (2013). 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. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad. S. d. Salud.
- Statgraphics (2006). Statgraphics Centurion XV: Comparación de Varias Muestras, StatPoint, Inc.
- Streppa, H. K., C. J. Jones and C. Budberg (2002). "Cyclooxygenase selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in canine blood." American Journal of Veterinary Research **63**(1): 91-94.
- Sumano, L. H., O. L. Gutiérrez and M. A. Zamora (2001). "Bioequivalence of four preparations of enrofloxacin in poultry." Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics **24**(5): 309-313.
- Sumano, L. H., C. L. Ocampo and O. L. Gutierrez (2001). "Non-bioequivalence of various trademarks of enrofloxacin and Baytril in cows." Dtsch Tierarztl Wochenschr **108**(7): 311-314.
- Sutton, S. C. (2004). "Companion animal physiology and dosage form performance." Advanced Drug Delivery Reviews **56**(10): 1383-1398.
- Taha, E., N. Salama and L. Fattah (2002). "Stability-indicating methods for the determination of meloxicam and tenoxicam in the presence of their degradation products " Spectroscopy Letters: An International Journal for Rapid Communication **35**(4): 501-516.
- Taha, E. A., N. N. Salama and L. Fattah (2004). "Stability-Indicating Chromatographic Methods for the Determination of Some Oxicams." Journal of AOAC International **87**(2): 366-373.
- Toutain, P. L. and A. Bousquet-MéLou (2004). "Bioavailability and its assessment." Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics **27**(6): 455-466.
- Türk, D., W. Roth and U. Busch (1996). "A review of the clinical pharmacokinetics of meloxicam." A review of the clinical pharmacokinetics of meloxicam **35**: 13-16.
- USP 32, N. (2008). United States Pharmacopeia and National Formulary. Rockville, MA.: Twinbrook Parkway.

- USP 35, N. (2012). United States Pharmacopeia and National Formulary. Rockville, MA.: Twinbrook Parkway. **3**: 3789-3794.
- Valtierra, D. (2007) "Artículo de Revisión: Avances en la Terapéutica con Antiinflamatorios No Esteroides." Universidad Autónoma de Baja California: Facultad de Medicina.
- Vandamme, T. F. and K. J. Ellis (2004). "Issues and challenges in developing ruminal drug delivery systems." Advanced Drug Delivery Reviews **56**(10): 1415-1436.
- Varelas, C. G., D. G. Dixon and C. A. Steiner (1995). "Zero-order release from biphasic polymer hydrogels." Journal of Controlled Release **34**(3): 185-192.
- Velpandian, T., J. Jaiswal, R. K. Bhardwaj and S. K. Gupta (2000). "Development and validation of a new high-performance liquid chromatographic estimation method of meloxicam in biological samples " Journal of Chromatography B **738**(2): 431-436.
- VICH (1998). GL1. Validation of Analytical Procedures: Definition and Terminology International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Product.
- VICH (1998). GL2. Validation of Analytical Procedures: Methodology International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Product.
- Vignaduzzo, S. E., P. M. Castellano and T. S. Kaufman (2008). "Method development and validation for the simultaneous determination of meloxicam and pridinol mesylate using RP-HPLC and its application in drug formulations." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **46**(2): 219-225.
- Wagner, J. G. (1969). "Interpretation of percent dissolved-time plots derived from in vitro testing of conventional tablets and capsules." Journal of Pharmaceutical Sciences **58**(10): 1253-1257.
- Warner, T. D., F. Giuliano, I. Vojnovic, A. Bukasa, J. A. Mitchell and V. J.R. (1991). "Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **96**(13): 7563-7568.
- Watson, A., A. Nicholson, D. Church and M. Pearson (1996). "Use of anti-inflammatory and analgesic drugs in dogs and cats." Australian Veterinary Journal **74**(3): 203-210.
- Weibull, W. (1951 ). "A Statistical Distribution Function of Wide Applicability." Journal of Applied Mechanics **18**(3): 293-297.
- Wiesner, J. L., A. D. De Jager, F. C. Sutherland, H. K. Hundt, K. J. Swart, A. F. Hundt and J. Els (2003). "Sensitive and rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of meloxicam in human plasma." Journal of Chromatography B **785**(1): 115-121.
- Wilding, I. R., S. S. Davis, K. P. Steed, R. A. Sparrow, J. Westrup and J. M. Hempenstall (1994). "Gastrointestinal transit of a drug-resinate administered as an oral suspension." International Journal of Pharmaceutics **101**(3): 263-268.
- Wu, Y., D. O. Kildsig and E. S. Ghaly (2004). "Effect of hydrodynamic environment on tablets dissolution rate." Pharm Dev Technol **9**(1): 25-37.

- Wynne, H. A. and M. Campbell (1993). "Pharmacoeconomics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)." Pharmacoeconomics **3**(2): 107–123.
- Y., H., L. M. Z., Y. Q., Q. Y. P. and Z. Y. G. (2002). "RP-HPLC determination of meloxicam in human plasma." Chinese journal of pharmaceutical analysis **22**(3): 183-185.
- Y., L., G. F. Wang, W. Y. F. and L. L. H. (2001). "HPLC determination of meloxicam in human plasma." Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis **21**(1): 33-36.
- Yazdanian, M., K. Briggs, C. Jankovsky and A. Hawi (2004). "The "high solubility" definition of the current FDA Guidance on Biopharmaceutical Classification System may be too strict for acidic drugs." Pharmaceutical Research **21**(2): 293-299.
- You, W. W., Y. Liu and Z. B. Wang (1999). "Chinese Journal of Analytical Chemistry " Determination of meloxicam by ultraviolet spectrophotometry **27**(7): 843–844.
- Yuksel, N., A. E. Kanik and T. Baykara (2000). "Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and -independent methods." International Journal of Pharmaceutics **209**(1-2): 57-67.
- Zawilla, N., M. Abdul-Azim Mohammad, N. El kousy and S. El-Moghazy Aly (2003 ). "Determination of meloxicam in bulk and pharmaceutical formulations." Journal of Pharmaceutical and Biomed Analysis **32**(6): 1135-1144.
- Zhang, Y., M. Huo, J. Zhou, A. Zou, W. Li, C. Yao and S. Xie (2010). "DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles." The AAPS Journal **12**(3): 263-271.
- Zheng, Y. J. (2009). Challenges and Strategies in Formulation Development of Oral Solid Low-Dose Drug Products. Formulation and Analytical Development for Low-Dose Oral Drug Products. Y. J. Zheng. Hoboken, New Jersey John Wiley & Sons, Inc. : 25- 48.
- Zhou, R., P. Moench, C. Heran, X. Lu, N. Mathias, T. N. Faria, D. A. Wall, M. A. Hussain, R. L. Smith and D. Sun (2005). "pH-Dependent Dissolution in Vitro and Absorption in Vivo of Weakly Basic Drugs: Development of a Canine Model." Pharmaceutical Research **22**(2): 188-192.