



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Estudio comparativo de perfiles de disolución de tabletas de esomeprazol, obtenidos por el aparato IV USP y cuantificados mediante dos técnicas analíticas; espectrofotometría UV y HPLC”

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN FARMACIA**

P R E S E N T A

LAURA ABARCA CAMACHO

ASESOR: M. en C. Elvia Adriana Morales Hipólito

COASESOR: Dra. Raquel López Arellano

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

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

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES



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

Estudio comparativo de perfiles de disolución de tabletas de esomeprazol, obtenidos por el aparato IV USP y cuantificados mediante dos técnicas analíticas; espectrofotometría UV y HPLC.

Que presenta la pasante: Laura Abarca Camacho
Con número de cuenta: 310089917 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Farmacia.

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de Mayo de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Q.B.P. Martha Elena García Corrales</u>	
VOCAL	<u>M. C. Elvia Adriana Morales Hipólito</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. Roberto Díaz Torres</u>	
1er. SUPLENTE	<u>M.I. Claudia Mariano Hernández</u>	
2do. SUPLENTE	<u>M.C. Gabriela Rodríguez Patiño</u>	

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

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Agradezco a Dios que ha permitido cada uno de los pasos que me han llevado hasta aquí y por su infinito amor y bondad.

A mis padres Rafael y Emilia que han sacrificado toda su vida y esfuerzo por darnos lo mejor siempre. Por sus consejos, sus valores, por la motivación que siempre me han brindado, y sobre todo por el amor que he recibido. No tengo palabras que describan el gran agradecimiento que les tengo, ninguno de mis logros será capaz por sí mismo, de hacerle honor a todo el trabajo que han impreso en mí. Este trabajo es de ustedes y no mío.

A mis hermanos Rafael y Lupita que siempre han creído en mí y me han apoyado en todo momento. A todos mis tíos y primos que han formado parte de mi crecimiento.

A mi amor Memo con quién he crecido de la mano y me ha enseñado que cuando el amor es fuerte puede contra todo a lo que se enfrente. A su hermosa familia que siempre me recibe con amor en su hogar y todo su apoyo se ha convertido en un pilar muy importante en mi vida.

A mis amigos Claudia, Carlos, Fer y Lupita que más que amigos son mis hermanos y han brindado siempre todo su apoyo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme formar parte de su comunidad desde el nivel preparatoria y darme la posibilidad de estudiar esta hermosa carrera.

A los profesores y colaboradores de LEDEFAR, sobre todo la doc. Raquel, Juan José y Adriana que se convirtieron en un apoyo fundamental para la elaboración de este trabajo. A cada uno de los profesores que me impartieron clases a lo largo de este proceso, mil gracias, ustedes son el alma de la UNAM.

A todos los amigos que hice durante la carrera sobre todo a Laura, Anuar, Orlando, Jazmín, Carlos y Michelle con quienes aprendí, me divertí y disfruté de nuestra estancia como universitarios.

Gracias a todos

I CONTENIDO

I CONTENIDO.....	I
II SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	iv
III. ÍNDICE DE TABLAS.....	v
IV. ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
1.1 OBJETIVO GENERAL:.....	3
1.2 OBJETIVOS PARTICULARES:.....	3
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO.....	4
1.GENERALIDADES DEL PROCESO DE DISOLUCIÓN.....	4
1.1. Teorías de la Disolución.....	5
1.1.1 Ecuación de Noyes-Whithney.....	5
1.1.2 Ecuación de Nernst y Brunner.....	6
1.2 Factores que afectan la disolución.....	7
1.3 Roles de las pruebas de disolución en la Industria Farmacéutica.....	9
1.3.1 Prueba de Disolución.....	10
1.3.2 Perfiles de Disolución.....	10
2. FACTORES QUE CONSIDERAR EN EL DESARROLLO DE PERFILES DE DISOLUCIÓN.....	12
2.1 Caracterización del fármaco.....	13
2.1.1 Solubilidad.....	13
2.1.2 Perfil de pH-Solubilidad.....	14
2.1.3 Clasificación Biofarmacéutica.....	16
2.2 Medio de Disolución.....	18
2.2.1 Selección del Medio.....	18
2.2.2 Volumen del Medio.....	19
2.2.3 Condiciones de Sumidero (Condiciones Sink).....	19
2.2.4 Temperatura del Medio.....	20
2.2.5 Desgasificación del Medio.....	20
2.2.6 Viscosidad del Medio.....	20
2.2.7 pH del Medio.....	21
2.3 Selección del Aparato.....	21
2.3.1 Aparato USP IV (Celda de Flujo).....	22

3. FACTORES QUE MODIFICAN LOS PERFILES DE DISOLUCIÓN EN EL APARATO USP IV	23
3.1. Tipo y tamaño de la celda	23
3.2 Velocidad Lineal de Flujo	24
3.3 Perlas de vidrio (Flujo turbulento o laminar).....	24
3.4 Sistema Abierto o Cerrado	25
3.5 Posición de la tableta	26
3.6 Filtración.....	26
3.7 Muestreo	27
3.8 Ventajas y Desventajas del Aparato IV USP.....	27
4. Descripción de técnicas analíticas	28
4.1 Espectrofotometría UV-Vis	28
4.1.2 Generalidades de la espectrofotometría Ultravioleta Visible (UV-Vis)	28
4.1.3 Aplicaciones.....	28
4.1.4 Consideraciones para el desarrollo del método.....	29
4.2 Cromatografía	30
4.2.1 Descripción general de los métodos cromatográficos.	30
4.2.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución.	31
4.2.3 Instrumentación de cromatografía de líquidos de alta resolución.	32
4.2.5 Detectores UV, VIS y PDA.....	33
4.2.6 Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC) o Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC).....	34
4.3 Diferencias entre espectrofotometría y HPLC.	35
5. Análisis y comparación de perfiles de disolución	36
6. Monografía de Esomeprazol magnésico trihidratado	40
CAPÍTULO II: MATERIALES Y METODOLOGÍA	44
1. Diagrama de Flujo	44
2. Materiales	45
3. Metodología	48
3.1 Determinación de la longitud de onda óptima.....	48
3.2 Preparación de Curvas de calibración.....	49
3.2.1 Linealidad para el sistema espectrofotométrico.	49
3.2.2 Linealidad para el sistema cromatográfico.	51
3.4 Perfiles de Disolución.....	52
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	54
1. Perfil pH Solubilidad	54

2.Determinación de la longitud de onda óptima	56
3.Preparación de las curvas de calibración	58
3.1 Linealidad para la técnica espectrofotométrica.....	58
3.2 Linealidad para la técnica cromatográfica.	60
3.3 Comparación de porcentaje de Recobro entre los métodos.	61
4.Perfiles de Disolución	62
4.1 Perfiles No Acumulativos	62
4.2 Perfiles Acumulativos	66
4.3 Ajuste a modelo cinético	67
5.Parámetros cinéticos	68
5.1 Concentración Máxima	69
5.2 Tiempo Máximo.....	71
5.3 Area bajo la curva:.....	73
5.3.1 Área bajo la curva de 0 t de esomeprazol disuelto, obtenido por cada técnica analítica.	73
5.3.2 Área bajo la curva de 0 a $C_{m\acute{a}x}$ de esomeprazol disuelto, obtenido por cada técnica analítica.	74
IV. CONCLUSIONES	76
V.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	78

II SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ABC	Área Bajo la Curva	mm	Milímetro
Abs	Absorbancia	Mol	Moles
BCS	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica	N	Concentración Normal
cm	Centímetro	nm	Nanómetros
C _{máx}	Concentración máxima	OMS	Organización Mundial de la Salud
cP	Centipoise	psi	Unidad de presión
EMA	European Medicines Agency	rpm	Revoluciones por minuto
f ₁	Factor de Diferencia	T _{máx}	Tiempo para alcanzar C _{máx}
f ₂	Factor de similitud	UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
FDA	Food And Drug Administration	USP	Farmacopea de los Estados Unidos Americanos
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos	Uv-Vis	Ultravioleta-visible
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	VID	Velocidad de Disolución Intrínseca
IBP	Inhibidores de la bomba de Protones	µg	Microgramos
IR	Infrarrojo	%	Porcentaje
K	Constante de Velocidad	°C	Grados Celsius
Kg	Kilogramo	±	Más, menos
M	Concentración Molar	µm	Micrómetros
mg	Miligramo	λ	Longitud de onda
min	Minuto	µL	Microlitros
mL	Mililitro		

III. ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. FACTORES QUE AFECTAN EL PROCESO DE DISOLUCIÓN	9
TABLA 2. SOLUBILIDAD EN TÉRMINOS DESCRIPTIVOS DE ACUERDO A LAS PARTES DE DISOLVENTE REQUERIDAS PARA 1 g DE SOLUTO SEGÚN LA USP	13
TABLA 3. CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA DE FÁRMACOS CONTENIDOS EN FORMAS DE DOSIFICACIÓN DE LIBERACIÓN RÁPIDA PARA PREDECIR CORRELACIONES IN VITRO/IN VIVO.....	17
TABLA 4. SELECCIÓN DE APARATOS DE DISOLUCIÓN USP PARA DIVERSAS FORMAS DE DOSIFICACIÓN	22
TABLA 5. PRINCIPALES DIFERENCIAS ENTRE LAS TÉCNICAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS Y CROMATOGRÁFICAS.	35
TABLA 6. DIFERENCIAS ENTRE F1 Y F2 PARA COMPARAR PERFILES DE DISOLUCIÓN..	37
TABLA 7. PROPIEDADES FÍSICAS DEL ESOMEPRAZOL	40
TABLA 8. PROPIEDADES FÍSICAS DE ESOMEPRAZOL MAGNÉSICO TRIHIDRATADO	41
TABLA 9. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA.....	50
TABLA 10. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA TÉCNICA CROMATOGRÁFICA.....	52
TABLA 11. CONDICIONES PARA PERFILES DE DISOLUCIÓN DE TABLETAS DE REFERENCIAS DE ESOMEPRAZOL.....	52
TABLA 12. CONDICIONES PARA CADA UNA DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS	53
TABLA 13. VALORES PROMEDIO DE SOLUBILIDAD DE ESOMEPRAZOL A DIFERENTES VALORES DE pH (1.2 A 11.3).....	54
TABLA 14. LONGITUDES DE ONDA Y MÁXIMOS DE ABSORBANCIA DE ESOMEPRAZOL EN TRES DIFERENTES MEDIOS A UNA CONCENTRACIÓN DE 18.6 mg/mL.	57
TABLA 15. RESPUESTAS ANALÍTICAS Y PARÁMETROS ESTADÍSTICOS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA.....	58
TABLA 16. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y VALORES OBTENIDOS PARA LA LINEALIDAD DEL SISTEMA ESPECTROFOTOMÉTRICO.	59
TABLA 17. RESPUESTAS ANALÍTICAS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO.....	60
TABLA 18. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y VALORES OBTENIDOS PARA LA LINEALIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO.	61
TABLA 19. INTERVALOS DE CONFIANZA DE LOS PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN PARA CADA TÉCNICA ANALÍTICA (NIVEL DE SIGNIFICANCIA 0.5).....	61

TABLA 20. INTERVALOS DE CONFIANZA DE LAS MEDIAS DE CONCENTRACIÓN MÁXIMA OBSERVADAS EN LOS LOTES A, B Y C POR ESPECTROFOTOMETRÍA Y CROMATOGRAFÍA. (NIVEL DE SIGNIFICANCIA 0.5) 69

TABLA 21. VALORES-P DE LA PRUEBA-F (ANOVA DE UN SOLO FACTOR) DE CONCENTRACIÓN MÁXIMA A DOS DIFERENTES MÉTODOS ANALÍTICOS Y LOTES 71

TABLA 22. INTERVALOS DE CONFIANZA DE LAS MEDIAS DE TIEMPO MÁXIMO OBSERVADOS EN LOS LOTES A, B Y C POR ESPECTROFOTOMETRÍA Y CROMATOGRAFÍA. (NIVEL DE SIGNIFICANCIA 0.5) 71

TABLA 23. VALORES-P DE LA PRUEBA-F (ANOVA DE UN SOLO FACTOR) DE TIEMPO MÁXIMO A DOS DIFERENTES MÉTODOS ANALÍTICOS Y LOTES. 72

TABLA 24. INTERVALOS DE CONFIANZA DE LAS MEDIAS DE LAS ÁREAS BAJO LA CURVA DESDE EL TIEMPO CERO AL ÚLTIMO TIEMPO DE MUESTREO OBSERVADOS EN LOS LOTES A, B POR ESPECTROFOTOMETRÍA Y CROMATOGRAFÍA. (NIVEL DE SIGNIFICANCIA 0.5) 73

TABLA 25. VALORES-P DE LA PRUEBA-F (ANOVA DE UN SOLO FACTOR) DE ÁREA BAJO LA CURVA DE 0 A T A DOS DIFERENTES MÉTODOS ANALÍTICOS Y LOTES. 74

TABLA 26. INTERVALOS DE CONFIANZA DE LAS MEDIAS DE LAS ÁREAS BAJO LA CURVA DESDE EL TIEMPO CERO AL TIEMPO MÁXIMO OBSERVADOS EN LOS LOTES A, B POR ESPECTROFOTOMETRÍA Y CROMATOGRAFÍA. (NIVEL DE SIGNIFICANCIA 0.5) 74

TABLA 27. VALORES-P DE LA PRUEBA-F (ANOVA DE UN SOLO FACTOR) DE ÁREA BAJO LA CURVA DE 0 A CMÁX A DOS DIFERENTES MÉTODOS ANALÍTICOS Y LOTES. 75

IV. ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL PROCESO DE DISOLUCIÓN DE UN SÓLIDO EN EL SENO DE UN LÍQUIDO, SEGÚN EL MODELO DE PELÍCULA	7
FIGURA 2. ILUSTRACIÓN ESQUEMÁTICA DE UN PROCESO DE DISOLUCIÓN DE UNA FORMA DE DOSIFICACIÓN SÓLIDA (MODIFICADO DE WAGNER 1970).....	8
FIGURA 3. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL PORCENTAJE DE PRINCIPIO ACTIVO DISUELTO, EN ORDENADAS, FRENTE A LOS TIEMPOS EN ABSCISAS. PERFILES OBTENIDOS CON EL APARATO II USP	11
FIGURA 4. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE CONCENTRACIÓN DE PRINCIPIO ACTIVO, EN LAS ORDENADAS, FRENTE A LOS TIEMPOS EN LAS ABSCISAS. PERFILES OBTENIDOS CON EL APARATO IV USP.....	11
FIGURA 5. ECUACIÓN DE HENDERSON-HASSELBACH; RELACIÓN DE LA PORCIÓN IONIZADA Y SIN IONIZAR DE UN ELECTROLITO DÉBIL EN FUNCIÓN DEL pH Y SU pKa	15
FIGURA 6.PORCENTAJES DE UNA ESPECIE ÁCIDA DEPENDIENTE DEL pH.	15
FIGURA 7.APARATO DE DISOLUCIÓN USP IV (SOTAX).....	23
FIGURA 8.(A) CELDA DE FLUJO GRANDE Y (B) PEQUEÑA PARA ADMINISTRACIÓN DE FORMAS SÓLIDAS ORALES	24
FIGURA 9.DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE LA CONFIGURACIÓN DE SISTEMA ABIERTO PARA EL APARATO IV.	25
FIGURA 10.DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE LA CONFIGURACIÓN DE SISTEMA CERRADO PARA EL APARATO IV.	26
FIGURA 11.CELDAS ESTÁNDAR (A) Y CON APERTURA (B).	29
FIGURA 12.COMPONENTES BÁSICOS DE LA INSTRUMENTACIÓN PARA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.	32
FIGURA 13.ESQUEMA DE UN DETECTOR ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-VISIBLE DE DIODOS EN FILA	34
FIGURA 14.REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS VALORES DE CONCENTRACIÓN FRENTE A LOS TIEMPOS DE TOMA DE MUESTRA.	38
FIGURA 15.DIAGRAMA DE FLUJO DE LAS ACTIVIDADES A DESARROLLAR.	44
FIGURA 16.PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA LINEALIDAD DEL SISTEMA ESPECTROFOTOMÉTRICO	50
FIGURA 17.PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA LINEALIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO	51

FIGURA 18.PERFIL pH-SOLUBILIDAD DE ESOMEPRAZOL EN 5 DIFERENTES VALORES DE pH.	54
FIGURA 19.TUBOS DE ENSAYE ADICIONADOS CON ESOMEPRAZOL EN 5 DIFERENTES VALORES DE pH.	54
FIGURA 20.DIAGRAMA DE DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES DE ESOMEPRAZOL DEPENDIENTE DE pH.....	55
FIGURA 21.ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE ESOMEPRAZOL EN TRES DIFERENTES MEDIOS: FOSFATOS 6.8, ACETATOS 4.5 Y ÁCIDO CLORHÍDRICO 1.2 M EN UNA CONCENTRACIÓN DE 18.6 mg/mL.	56
FIGURA 22.CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL SISTEMA ESPECTROFOTOMÉTRICO.....	58
FIGURA 23.CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL SISTEMA CROMATOGRÁFICO.....	60
FIGURA 24.GRÁFICO DE INTERVALOS DE CONFIANZA DE LOS PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN PARA CADA TÉCNICA ANALÍTICA (NIVEL DE SIGNIFICANCIA 0.5)	62
FIGURA 25.PERFILES DE DISOLUCIÓN NO ACUMULATIVOS PROMEDIO DE CADA LOTE A, B Y C DE TABLETAS DE ESOMEPRAZOL POR CADA TÉCNICA ANALÍTICA.....	63
FIGURA 26.PERFILES DE DISOLUCIÓN NO ACUMULATIVOS PROMEDIO DE TABLETAS DE ESOMEPRAZOL LOTE A PARA CADA TÉCNICA ANALÍTICA.....	63
FIGURA 27. PERFILES DE DISOLUCIÓN NO ACUMULATIVOS PROMEDIO DE TABLETAS DE ESOMEPRAZOL LOTE B PARA CADA TÉCNICA ANALÍTICA.....	64
FIGURA 28.PERFILES DE DISOLUCIÓN NO ACUMULATIVOS PROMEDIO DE TABLETAS DE ESOMEPRAZOL LOTE C PARA CADA TÉCNICA ANALÍTICA.....	64
FIGURA 29.PORCENTAJES DISUELTOS PROMEDIOS DE ESOMEPRAZOL CONTRA TIEMPO DE LOS LOTES A, B Y C OBTENIDOS POR LAS TÉCNICAS ESPECTROFOTOMÉTRICA Y CROMATOGRÁFICA.	66
FIGURA 30. RECTA DE REGRESIÓN OBTENIDA CON EL MODELO CINÉTICO DE ORDEN UNO PARA LA TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA.	67
FIGURA 31.RECTA DE REGRESIÓN OBTENIDA CON EL MODELO CINÉTICO DE ORDEN UNO PARA LA TÉCNICA CROMATOGRÁFICA.....	68
FIGURA 32.GRÁFICO DE COMPARACIÓN DE LOS INTERVALOS DE CONFIANZA DE LAS MEDIAS DE CONCENTRACIÓN MÁXIMA OBSERVADOS EN LOS LOTES A, B Y C POR ESPECTROFOTOMETRÍA Y CROMATOGRAFÍA. (NIVEL DE SIGNIFICANCIA 0.5)	70
FIGURA 33. GRÁFICO DE COMPARACIÓN DE LOS INTERVALOS DE CONFIANZA DE LAS MEDIAS DE TIEMPO MÁXIMO OBSERVADOS EN LOS LOTES A, B Y C POR ESPECTROFOTOMETRÍA Y CROMATOGRAFÍA. (NIVEL DE SIGNIFICANCIA 0.5)	72
FIGURA 34.GRÁFICO DE COMPARACIÓN DE LOS INTERVALOS DE CONFIANZA DE LAS MEDIAS DE LAS ÁREAS BAJO LA CURVA DESDE EL TIEMPO CERO AL ÚLTIMO TIEMPO DE MUESTREO OBSERVADOS EN LOS LOTES A, B Y C POR ESPECTROFOTOMETRÍA Y CROMATOGRAFÍA. (NIVEL DE SIGNIFICANCIA 0.5)	73



FIGURA 35. GRÁFICO DE COMPARACIÓN DE LOS INTERVALOS DE CONFIANZA DE LAS MEDIAS DE LAS ÁREAS BAJO LA CURVA DESDE EL TIEMPO CERO AL TIEMPO MÁXIMO OBSERVADOS EN LOS LOTES A, B Y C POR ESPECTROFOTOMETRÍA Y CROMATOGRFÍA. (NIVEL DE SIGNIFICANCIA 0.5) 75

INTRODUCCIÓN

La absorción de un fármaco administrado en una forma farmacéutica sólida por vía oral depende de su liberación desde ésta, su disolución o solubilización bajo condiciones fisiológicas y su permeabilidad a través del tracto gastrointestinal. Lo anterior hace que la disolución *In vitro* sea una prueba relevante para la predicción de la eficiencia *In vivo* del fármaco y para la identificación de problemas potenciales de biodisponibilidad *In vivo* ^[1]. La liberación *In vitro* de un fármaco a partir de la forma farmacéutica que lo contiene, depende de las características fisicoquímicas del fármaco, de los excipientes empleados y de la tecnología utilizada para su fabricación. Los estudios comparativos de disolución *In vitro* son útiles cuando la disolución es el paso limitante de la absorción ^[2]. Las pruebas de disolución *In vitro* para formas farmacéuticas sólidas de liberación inmediatas, tales como comprimidos y cápsulas, se usan para:

- Evaluar calidad entre lotes de producción
- Guiar el desarrollo de formulaciones
- Asegurar la continuidad de la calidad y eficiencia después de cambios en la formulación, el proceso de manufactura, el sitio de fabricación o aumento en escala del proceso de fabricación ^[1].
- Sustituir los estudios *In vivo*, y poder conseguir la bioexención en los casos que está documentada la correlación *In vitro-In vivo* ^[2].

Organismos como la FDA, EMA, OMS y la USP proporcionan directrices sobre el desarrollo y validación de los procedimientos de disolución; (Guía para la Industria 1997, Guía ICH 2005 y Guideline on the investigation of bioequivalence) ^[3].

Actualmente la USP señala 7 aparatos, los cuales se disponen para las diferentes formas de dosificación que existen. Siendo los aparatos I y II, los más utilizados para formas de dosificación sólidas orales, sin embargo en los últimos años se ha dado énfasis a realizar los estudios por el aparato 4 de USP (célula de flujo continuo) debido que posee varias ventajas sobre los demás aparatos entre las cuales está que simula de mejor manera las condiciones fisiológicas y que la forma de dosificación se aísla del depósito de medio, el muestreo y los cambios de medio pueden ocurrir sin perturbar la hidrodinámica dentro de la celda de flujo ^[4].

Además de establecer las condiciones de la prueba, debe desarrollarse un método analítico para cuantificar las muestras que se obtengan de los ensayos. Comúnmente se analizan por espectrofotometría o mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC en sus siglas en inglés). Ambas técnicas están comúnmente disponibles en laboratorios farmacéuticos. La espectrofotometría es generalmente más rápida y barata; HPLC se puede elegir cuando hay interferencia del placebo o para abordar la sensibilidad ^[5].

La elección de las condiciones de prueba a utilizar en los estudios de disolución debe estar basada en el estudio de las características fisicoquímicas del fármaco y de la forma farmacéutica. Este desarrollo resulta ser un reto para fármacos que poseen una baja solubilidad en medios acuosos. En este caso, nuestro objeto de estudio es esomeprazol, clase II de la BCS.

Esomeprazol es un enantiómero de omeprazol que presenta efectos farmacodinámicos similares, pero diferente farmacocinética. Presenta un aclaramiento 3 veces más lento que el omeprazol racémico lo cual tiene implicaciones posológicas ^[6]. Tanto omeprazol como esomeprazol pertenecen al grupo de inhibidores de la bomba de protones (IBP) que se ha convertido en uno de los pilares básicos de los tratamientos de la enfermedad por reflujo gastroesofágico y de la úlcera péptica. Dada su buena tolerabilidad, perfil de seguridad y efectividad, su utilización ha aumentado mucho en los últimos años, y ha pasado de representar el 65.4% del consumo total de antiulcerosos en el año 2000 al 96.2% en 2012 ^[6].

En el presente estudio se determinarán las condiciones a las que deben ser sometidas tabletas de esomeprazol (medicamento de Referencia) en el aparato IV USP para obtener perfiles de disolución caracterizados según la normatividad mexicana y, además, cuantificarlos mediante dos técnicas analíticas: Espectrofotometría y cromatografía. Se compararán los parámetros cinéticos ($T_{m\acute{a}x}$, $C_{m\acute{a}x}$, y ABC) de los perfiles no acumulativos promedio obtenidos por cada técnica y se definirá si existen diferencias significativas, siendo que, en caso de no existir, poder elegir el método espectrofotométrico por sus ventajas de rapidez y bajo costo.

La importancia radica en que estos estudios podrán utilizarse a futuro para realizar estudios de bioequivalencia, entre el medicamento de referencia y un genérico que se encuentre en su etapa de desarrollo, incluso si existe una correlación "*In vitro-In vivo*" lograr la bioexención, reduciendo costos de análisis al utilizar una técnica espectrofotométrica.

OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL:

Comparar los perfiles de disolución de tabletas de esomeprazol obtenidos en el aparato USP IV, cuantificados mediante dos técnicas analíticas: Espectrofotometría UV y HPLC, para determinar si existen diferencias significativas entre los dos métodos de cuantificación.

1.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Encontrar las condiciones óptimas para realizar perfiles de disolución de tres lotes de tabletas de esomeprazol en el aparato IV USP mediante una serie de ensayos para obtener perfiles similares a los perfiles obtenidos en estudios de disolución *In-vivo*.
- Cuantificar la cantidad disuelta de esomeprazol en las muestras utilizando una técnica espectrofotométrica UV.
- Cuantificar la cantidad disuelta de esomeprazol en las muestras utilizando una técnica cromatográfica de líquidos de alta resolución (HPLC).
- Comparar los parámetros Cinéticos ($C_{máx}$, $T_{máx}$, y ABC) de los perfiles de disolución obtenidos por cada método analítico y definir si existen diferencias significativas entre los perfiles.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1. GENERALIDADES DEL PROCESO DE DISOLUCIÓN

La administración oral de formas farmacéuticas sólidas ha sido la ruta más común de administración durante casi un siglo. Sin embargo, la importancia de la disolución en los procesos de absorción oral de fármacos fue reconocido hace unos 50 años cuando Nelson publicó su hallazgo que mostró relación entre los niveles en sangre de sales de teofilina administradas por vía oral y su velocidad de disolución *In vitro*. La necesidad de pruebas de disolución se puede entender fácilmente al considerar la importancia de la disolución en la absorción oral de fármacos [7].

Cuando un medicamento de acción sistémica se administra en formas de dosificación sólidas, tales como una tableta o cápsula, su absorción en la circulación sistémica puede generarse en un proceso descrito por cuatro pasos consecutivos. El primer paso implica la entrega del fármaco en su sitio de absorción a través del vaciamiento gástrico y el tránsito intestinal. Le sigue el segundo paso, en el que tiene lugar la disolución en el estómago y/o en el intestino delgado. El tercer paso se caracteriza por la penetración del fármaco disuelto a través de la membrana gastrointestinal. Finalmente, el fármaco absorbido alcanza la circulación sistémica. Aunque esta es una descripción simplificada del proceso de absorción del fármaco, muestra que el tránsito (vaciado gástrico), disolución y absorción a través de la membrana intestinal constituyen los procesos fundamentales de absorción oral de fármacos. Si el proceso de disolución es lento en relación con los otros tres procesos, que es generalmente el caso de la mayoría de los fármacos poco solubles formulados en una forma de dosificación convencional, la disolución será el paso limitante de la velocidad de absorción. Como resultado, la velocidad de disolución determinará la velocidad global y grado de absorción del fármaco en una circulación sistémica, y por lo tanto biodisponibilidad [7].

Desde un punto de vista macroscópico, la disolución de un sólido corresponde a la desintegración de la estructura cristalina bajo la acción del disolvente que lo rodea. Así las partículas liberadas se distribuyen en la fase disolvente mediante el proceso de difusión que tiene lugar a partir de la superficie del sólido. Asimismo, puede ser considerada como el fenómeno inverso a la cristalización; es decir, es el proceso por

el cual un compuesto químico o fármaco sólido llega a estar disuelto en un disolvente, formando una solución homogénea [8].

1.1. TEORÍAS DE LA DISOLUCIÓN

1.1.1 Ecuación de Noyes-Whitney

La disolución es el proceso mediante el cual una sustancia sólida entra en solución y puede considerarse compuesto de dos etapas consecutivas. Primero una reacción interfacial, el sólido entra y el disolvente rompe el cristal sólido para las sustancias cristalinas y abre la red amorfa para las sustancias amorfas. Esto crea cavidades en el disolvente, un llamado cambio de fase, moléculas de sólido se convierten en moléculas de soluto. En segundo lugar, las moléculas de soluto son transportadas fuera de la interfaz a través de una capa límite por medio de difusión o convección. La capa límite está cerca de una superficie mojada y es estática o de movimiento muy lento debido a las fuerzas de fricción y atracción, la transferencia de masa aquí es lenta. Así, un gradiente de concentración surge con un perfil decreciente a partir de la solución saturada, C_s en contacto directo con el sólido a la concentración C de la masa [9].

La velocidad global de disolución dependerá del paso más lento, la primera reacción interfacial es aproximadamente instantánea, el paso que determina la velocidad es la difusión a través de la capa límite. La ley de difusión de Fick establece que el cambio en la concentración es directamente proporcional a la diferencia de concentración sobre la capa de difusión [9].

En 1897 Noyes y Whithney estudiaron la velocidad de disolución del ácido benzoico y del cloruro de plomo, dos sustancias prácticamente insolubles, por medio de la rotación de un cilindro de cada compuesto en agua a una velocidad constante y tomando muestras de la solución para su análisis con intervalos específicos. Para poder examinar sus datos cuantitativamente, Noyes y Whithney desarrollaron una ecuación sobre la base de la segunda ley de Fick para describir el fenómeno de la disolución: [10]

$$\frac{dC}{dt} = -k * (C_s - C) \quad (1.1)$$

Dónde:

dC/dt = Variación de la concentración de fármaco en solución libre por unidad de tiempo (velocidad de disolución)

k = constante de velocidad que depende de las condiciones experimentales

C = concentración de fármaco en solución libre a un tiempo t .

C_s =concentración a saturación del fármaco en el disolvente (si el disolvente es agua C_s es la hidrosolubilidad del fármaco)

En sus experimentos Noyes y Whitney mantuvieron un área de superficie constante por medio del uso de varillas de la sustancia insoluble. Sin embargo, dado que esta condición no siempre es aplicable, Brunner y Tolloczko modificaron la ecuación 1.1 para incorporar el área de superficie, S , como una variable separada: ^[10,11].

$$\frac{dC}{dt} = -k * S * (C_s - C) \quad (1.2)$$

1.1.2 Ecuación de Nernst y Brunner

Por su parte, en 1904, Nernst propuso la teoría del modelo de película. Bajo la influencia de fuerzas no reactivas o químicas, una partícula sólida sumergida en un líquido es sometida a dos pasos consecutivos:

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

El primer paso, la solución, es casi instantáneo; el segundo, la difusión, es mucho más lento y por lo tanto es el paso limitante de la velocidad (Fig. 1)

Durante el mismo año Brunner estaba investigando otros factores, además del área de superficie, que afectan el proceso de disolución para poder determinar los componentes fundamentales de la constante de proporcionalidad en la ecuación 1.2 para incluir el coeficiente de difusión, D , el espesor de la capa de difusión estática, h , y el volumen del medio de disolución, v , llegando a: ^[10].

$$\frac{dC}{dt} = k_2 \frac{DS}{vh} * (C_s - C) \quad (1.3)$$

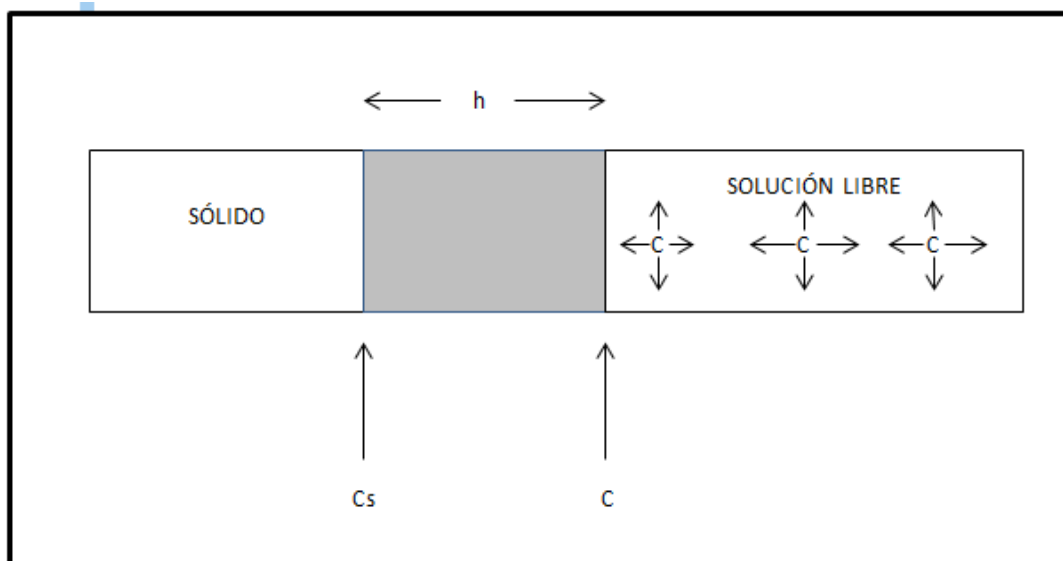


Figura 1. Representación gráfica del proceso de disolución de un sólido en el seno de un líquido, según el modelo de película ^[12]

1.2 FACTORES QUE AFECTAN LA DISOLUCIÓN

Varios procesos fisicoquímicos deben considerarse junto con el fármaco en el proceso de disolución para determinar la velocidad de disolución de los fármacos a partir de formas de dosificación sólidas en condiciones estandarizadas. El proceso de disolución para una forma de dosificación sólida en solución comienza con la humectación y la penetración del medio de disolución en la formulación sólida. Enseguida ocurre la desintegración y / o disgregación en gránulos o partículas finas. Sin embargo, este paso no es un requisito previo para la disolución. El último paso involucra solubilización (o disolución) del fármaco en el medio de disolución. En la Figura 2 se muestra un diagrama donde Wagner explica los procesos involucrados en la disolución de formas sólidas.

Cabe señalar que estos pasos también pueden ocurrir simultáneamente durante el proceso de disolución. Para la mayoría de los fármacos poco solubles, la solución se considera controlada por disolución, ya que la solubilización de las partículas del fármaco es lenta con respecto a la desintegración o la disgregación de la forma de dosificación. Si el paso de desintegración o disgregación limita la velocidad, la disolución se considera como desintegración controlada. ^[7].

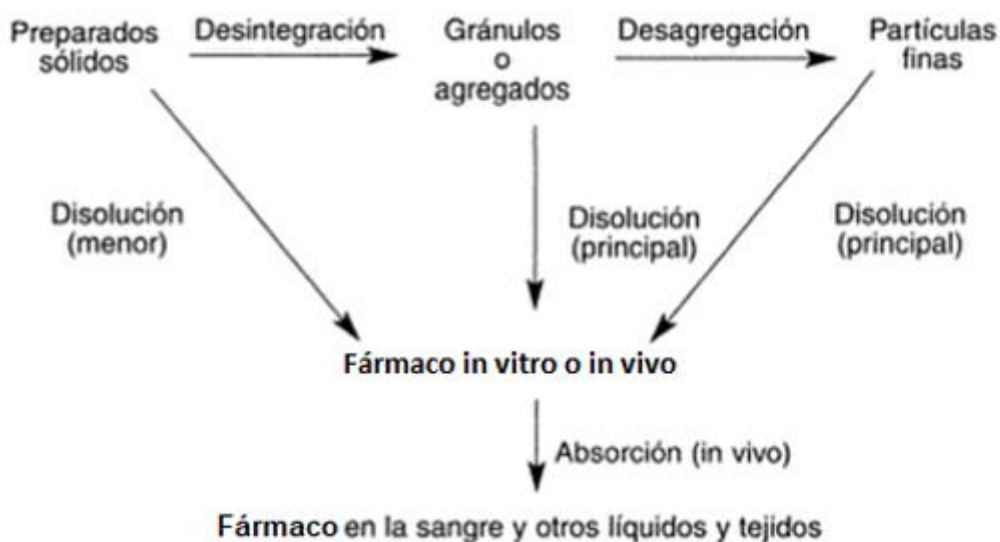


Figura 2 Ilustración esquemática de un proceso de disolución de una forma de dosificación sólida (modificado de Wagner 1970)

Los factores que afectan la velocidad de disolución de formas de dosificación sólidas se pueden clasificar en cuatro categorías principales (1) Factores fisicoquímicos del principio activo, (2) Composición y métodos de fabricación del medicamento, (3) Propiedades de la forma de dosificación y (4) Factores de la prueba, que son resumidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Factores que afectan el proceso de disolución ^[13]

Factores Físicoquímicos del principio activo	Composición y métodos de fabricación del medicamento.	Propiedades de la forma de dosificación.	Factores de la Prueba.
-Solubilidad -Polimorfismo -Estado amorfo y solvatación. -Porosidad -Naturaleza Química (ácido, base, sal) -Formación de complejos -Tamaño de partícula -Presencia de agentes activos de superficie -Variables de fabricación	-Cantidad y tipo de excipientes utilizados. -Procedimiento de tableteado. -Tamaño y distribución de los gránulos. -Contenido de humedad antes de comprimir. -Tipo y cantidad del agente de desintegración. -Cantidad de agentes activos de superficie. -Presión y velocidad de formación de comprimidos.	-Contenido de Humedad. -Dureza -Tiempo de desintegración	-Intensidad, velocidad y tipo de agitación -Dinámica de fluidos y factores geométricos. -Gradiente de concentración entre superficie y volumen -Composición del medio de disolución (acidez, viscosidad, tensión superficial, sales u otros compuestos) -Temperatura del medio de disolución

1.3 ROLES DE LAS PRUEBAS DE DISOLUCIÓN EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

Las pruebas de disolución desempeñan muchas funciones clave en el desarrollo y la producción de formas de dosificación sólidas:

- En la etapa inicial de la investigación y desarrollo de fármacos (Fases 0 y 1), las pruebas de disolución se usan para la caracterización de ingredientes farmacéuticos activos y la selección de la formulación.
- Desarrollo y evaluación de nuevas formulaciones al examinar la liberación del fármaco de las formas de dosificación.

- Uso de la prueba de disolución en la optimización de la formulación, desarrollo del proceso y escalamiento durante las Fases II y III.
- Obtener una correlación *In vitro* - *In vivo* (IVIVC) y otra información útil que guie la evaluación de la biodisponibilidad y / o bioequivalencia de productos farmacéuticos.
- Las pruebas de disolución sirven como una importante herramienta en el control de calidad que se utiliza para verificar la fabricación y la consistencia del producto.
- Evaluar la calidad del producto durante su vida útil, así como evaluar los cambios posteriores a la aprobación y examinar la necesidad de estudios de bioequivalencia. [7].

Según la USP las pruebas de disolución son consideradas como pruebas que evalúan el desempeño del producto, el cual es un atributo específico de calidad generalmente vinculado a los estudios de biodisponibilidad y de bioequivalencia. Las pruebas de desempeño de medicamentos están diseñadas para evaluar la liberación de fármacos *In vitro* a partir de las formas farmacéuticas, por ejemplo, la disolución y liberación de fármacos. Los procedimientos *In vitro* para determinar el desempeño del producto son la prueba de disolución y el perfil de disolución. [14].

1.3.1 Prueba de Disolución

La prueba de disolución "*In vitro*" es la prueba que se realiza a las formas farmacéuticas sólidas orales (tabletas y cápsulas), por medio de condiciones creadas en el laboratorio. Esta prueba se realiza con el fin de verificar que el principio activo se disuelve al menos, el mínimo permisible según las especificaciones de la monografía individual de cada medicamento, que encontramos en la farmacopea oficial.

La prueba generalmente requiere de una sola medición y sus resultados se expresan en términos del tiempo requerido para que una fracción específica del medicamento presente se disuelva. [15]

1.3.2 Perfiles de Disolución

Se define como perfil de disolución a la determinación experimental de la velocidad o cantidad con la que el principio activo se disuelve en todo un intervalo de tiempo, bajo condiciones experimentales controladas a partir de la forma farmacéutica. [16]

De acuerdo al equipo utilizado podemos obtener dos tipos de gráficos. Para los datos obtenidos mediante los aparatos I y II, la representación gráfica es de curvas acumulativas de los porcentajes disueltos, en ordenadas, frente a los tiempos, en abscisas (Figura 3), para los datos obtenidos por el aparato IV los gráficos son del tipo no acumulativos, donde se grafica la concentración en términos de concentración (mg/mL) contra los tiempos de muestreo y se obtiene, de manera general, una campana. (Figura 4).

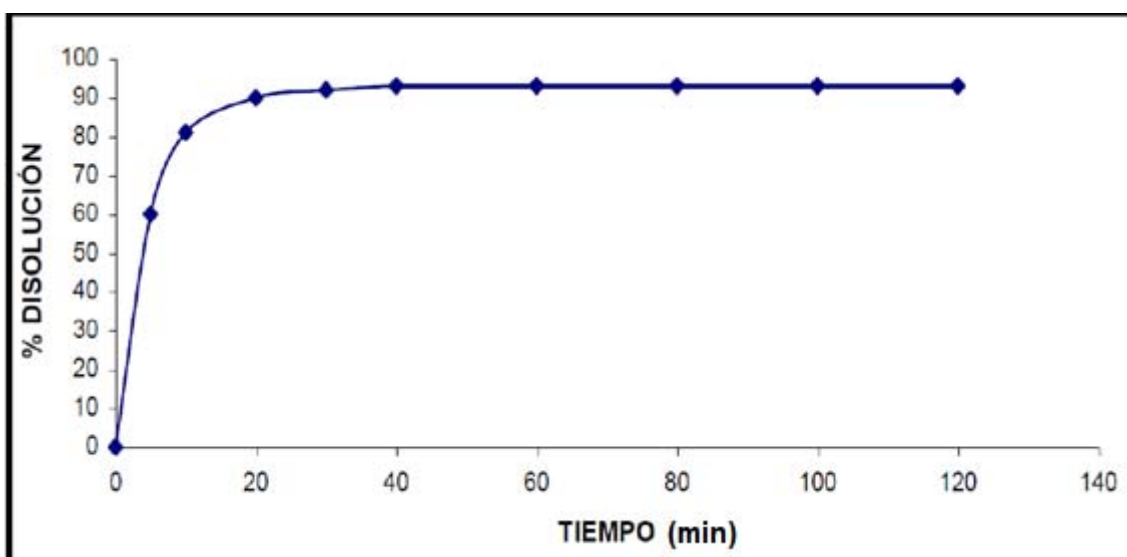


Figura 3 Representación gráfica del porcentaje de principio activo disuelto, en ordenadas, frente a los tiempos en abscisas. Perfiles obtenidos con el aparato II USP [12].

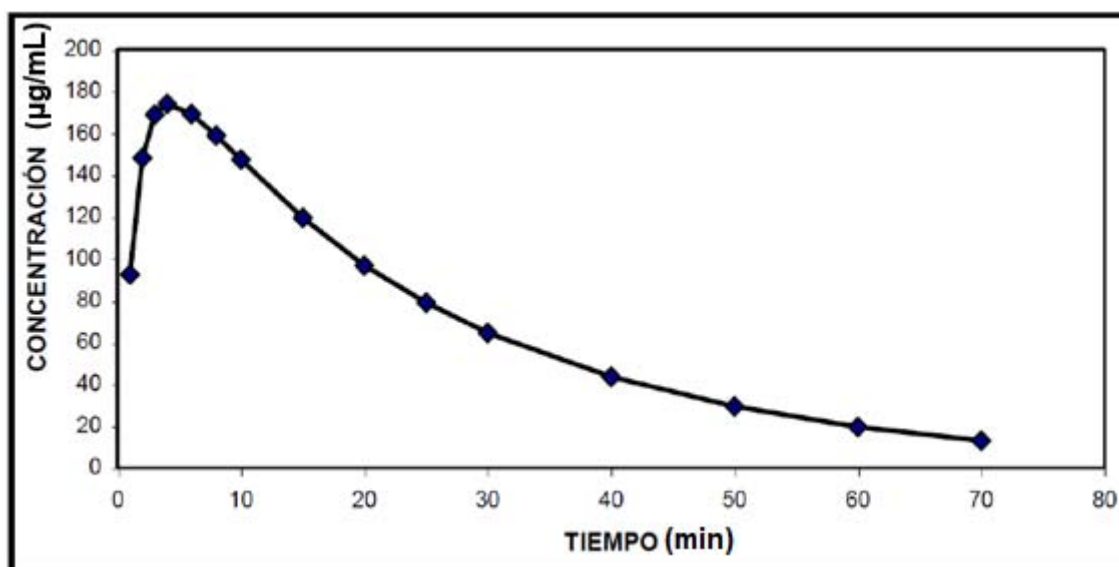


Figura 4 Representación gráfica de concentración de principio activo, en las ordenadas, frente a los tiempos en las abscisas. Perfiles obtenidos con el aparato IV USP.

La NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 establece que ^[16]:

- Todos los métodos analíticos empleados para la cuantificación de muestras provenientes de un perfil de disolución, deben ser validados.
- Se deben realizar los perfiles de disolución con 12 unidades, tanto del medicamento de prueba como el de referencia, en cada uno de los medios de disolución.
- Para realizar el perfil de disolución, deben seleccionarse por lo menos 5 tiempos de muestreo, que permitan caracterizar apropiadamente la curva ascendente y la fase de meseta. Únicamente dos puntos estarán en la meseta de la curva y los otros tres distribuidos entre la fase ascendente y de inflexión.
- Cuando el 85% del fármaco se disuelve en un tiempo menor o igual a 15 minutos, no es necesario caracterizar la curva ascendente, pero los tiempos de muestreo deben estar suficientemente espaciados a lo largo del perfil de disolución.
- En cada uno de los medios de disolución utilizar una curva de calibración de la sustancia de referencia para calcular por interpolación la concentración del fármaco disuelto.

Esto aplica generalmente para los perfiles obtenidos por aparato II, en el caso de Aparato IV, debido a que simula de mejor manera lo que sucede en el organismo cuando se le administra un medicamento por vía extravascular, a partir de este perfil, se obtienen una serie de parámetros cinéticos que sirven para caracterizar a una forma farmacéutica. A través de estos parámetros es posible realizar comparaciones cuantitativas y cualitativas entre dos formulaciones. ^[17].

2. Factores a considerar en el desarrollo de perfiles de disolución.

La utilidad de los perfiles de disolución se determina por su capacidad, para discriminar entre formulaciones y su correlación con la biodisponibilidad *In vivo*. En ausencia de datos de biodisponibilidad *In vivo*, la selección de las condiciones iniciales de la prueba se establece con base en las propiedades fisicoquímicas del principio activo, el diseño de la formulación y la dosis pretendida. Los parámetros principales que se necesitan investigar son los siguientes:

- Medio de Disolución
- Medio de Desgasificación
- Tipo de Aparato
- Velocidad de Agitación

- Temperatura
- Método de muestreo
- Filtro ^[18].
- Volumen del Medio
- Método
- Características del fármaco

2.1 Caracterización del fármaco

2.1.1 Solubilidad

La solubilidad es un parámetro termodinámico que representa la concentración de la solución de un principio activo en equilibrio con el soluto. Según la ecuación de Noyes-Whithney, la solubilidad de una sustancia representa el factor más importante en la velocidad de disolución. Varios factores pueden modificar la solubilidad de una sustancia sólida:

- Hábito de cristal
- Cristalinidad
- Amorfismo
- Polimorfismo
- Pseudopolimorfismo
- Tamaño de partícula y superficie ^[18].

La solubilidad aproximada de una sustancia, según la USP, se indica mediante uno de los siguientes términos descriptivos:

Tabla 2. Solubilidad en términos descriptivos de acuerdo a las partes de disolvente requeridas para 1 g de soluto según la USP ^[14].

Termino Descriptivo	Partes de Disolvente requerida para 1 parte de soluto
Muy soluble	Menos de 1
Fácilmente soluble	Menos de 1 a 10
Soluble	De 10 a 30
Moderadamente Soluble	De 30 a 100
Poco soluble	De 100 a 1000
Muy poco soluble	De 1000 a 10000
Prácticamente Insoluble o Insoluble	Mayor que o igual a 10000

Dentro de las metodologías existentes para la medición de la solubilidad de los fármacos, el método tradicional corresponde a la medición de la solubilidad termodinámica por el método de agitación de matraces saturados propuesto por Higuchi y Connors.

Este método parte de la premisa de que, para poder cuantificar la solubilidad, la fase sólida (soluta) debe alcanzar un estado de equilibrio con la fase líquida (solución). Para lograr esta condición de equilibrio, se debe añadir un exceso de muestra sólida a una solución, con el objetivo de asegurar que coexista el soluto y el solvente en forma simultánea.

Es importante también señalar que el tiempo de agitación que demore en alcanzar el estado estacionario de solubilidad va a depender de múltiples factores, en donde además, se debe tener en consideración que es necesario inspeccionar que al momento de alcanzar el estado de equilibrio termodinámico, éste se mantenga en el tiempo ya que podrían existir transformaciones polimórficas o degradación del fármaco, que interferirán en la investigación y no permitirán encontrar el valor real de la solubilidad.

Si bien es posible sónicar la muestra para reducir el tiempo de agitación, en términos generales, para los fármacos que presenten baja solubilidad, se estima que el equilibrio de solubilidad se alcanza luego de 24 horas de agitación constante.

Una vez transcurrido el tiempo de agitación necesario, se debe realizar una separación de la fase sólida, respecto de la solución saturada (fase líquida) en donde se cuantifica el fármaco disuelto. Esta separación puede realizarse mediante técnicas sencillas como filtración o centrifugación ^[1,17].

2.1.2 Perfil de pH-Solubilidad

La solubilidad de los fármacos ionizables, como los ácidos y bases débiles, depende tanto del pH del medio como del pKa del compuesto. Por lo tanto, es importante determinar la solubilidad acuosa del fármaco sobre el rango de pH fisiológicamente relevante de 1-7.5 con el fin de predecir el efecto de la solubilidad en la disolución.

Los fármacos de carácter débil poseen la capacidad de disociarse parcialmente, en su forma ionizada y no ionizada dependiendo del pH del sitio en el cual se encuentren y de su valor de pka, característica intrínseca de cada fármaco. Así, cuando éstos se

encuentren en su estado ionizado, los fármacos serán más solubles que cuando se encuentren en su estado no ionizado [1,17].

El pka se define como la transformación logarítmica de la constante de disociación ácida, que es la medida cuantitativa de la fuerza con la que los protones se encuentran unidos a una molécula en solución.

La ecuación de Handerson-Hasselbach es una expresión matemática que permite cuantificar como varía la fracción protonada o ionizada y la fracción no ionizada de la molécula en función de su pka, dependiendo del pH del medio en el cual se encuentre:

$$pK_a = pH + \log \left[\frac{HA}{A^-} \right]$$

Figura 5. Ecuación de Henderson-Hasselbach; relación de la porción ionizada y sin ionizar de un electrolito débil en función del pH y su pKa.

Aplicando esta ecuación se puede observar que al pH en donde la especie ionizada y no ionizada se encuentren en una proporción de 50%, éste corresponderá al pKa de la molécula. De acuerdo a esta ecuación, para el caso de los ácidos débiles, cuando el pH sea inferior en 2 unidades al valor de pKa de la molécula, la especie se encontrará 99% en su forma no ionizada, mientras que cuando el pH sea 2 unidades superior al pKa, la especie se encontrara 99% en su fracción ionizada, como se muestra en la Figura 6. Caso contrario ocurre en los compuestos de carácter básico débil.

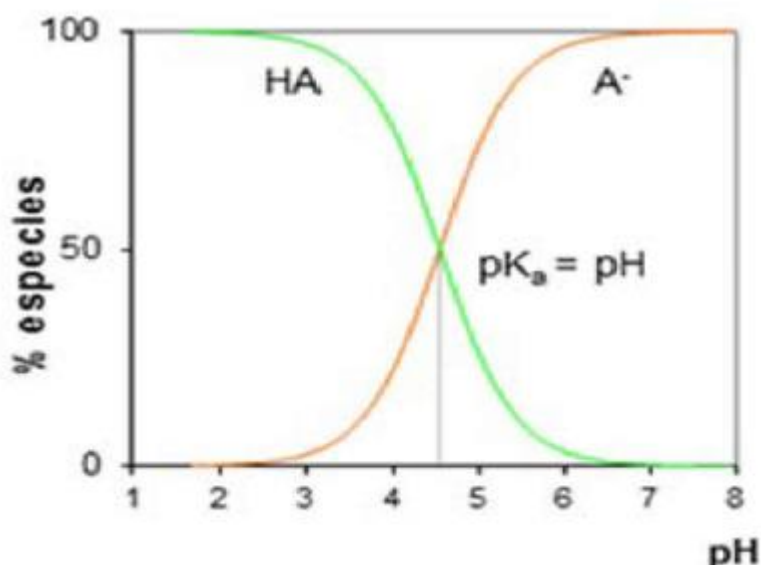


Figura 6. Porcentajes de una especie ácida dependiente del pH.

Se debe conocer la solubilidad del fármaco dentro de todo el rango de pH fisiológico y, por lo tanto, siguiendo la metodología de la agitación de los matracos saturados, se hace necesario realizar ensayos para la medición de la solubilidad en diferentes medios de pH tamponados.

De acuerdo a los lineamientos internacionales para generar un perfil de solubilidad dentro del rango de pH fisiológico, se deben escoger 5 medios tamponados en los cuales se realizará el ensayo de solubilidad. La elección de estos medios va a estar condicionada de acuerdo al valor de pKa que presente el fármaco en estudio. Así, como condición general se estableció que la solubilidad termodinámica debe ser medida a los pH 1,0; pKa +1; pKa -1 y pH 6.8 cubriendo así todo el rango de pH fisiológico.

La solubilidad intrínseca o mínima solubilidad dentro del pH de rango fisiológico, se podrá observar fácilmente graficando la solubilidad obtenida en cada uno de los medios tamponados, antes mencionados ^[1].

2.1.3 Clasificación Biofarmacéutica

El sistema de clasificación biofarmacéutico (BCS) es un marco para clasificar un fármaco basándose en su solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal. BCS introduce una correlación *In vitro* e *In vivo* y es el primer paso para aprobar un producto basado en ensayos de disolución *In vitro* en lugar de estudios de bioequivalencia en métodos para medir la solubilidad y la velocidad de disolución de fármacos escasamente solubles en sujetos humanos. Como resultado, se pueden evitar experimentos humanos innecesarios reduciendo así los costos de desarrollo de nuevos fármacos ^[19]. Esta clasificación permite predecir correlaciones *In vitro/ In vivo* para fármacos contenidos en formas de dosificación de liberación rápida ^[12].

Tabla 3. Clasificación biofarmacéutica de fármacos contenidos en formas de dosificación de liberación rápida para predecir correlaciones *In vitro*/*In vivo*.

Clase	Solubilidad	Permeabilidad	Correlación IV/IV: Posibilidad
I	Alta	Alta	Si la velocidad de disolución es más lenta que el vaciado gástrico.
II	Baja	Alta	Si la velocidad de disolución <i>In vitro</i> es similar a la velocidad de disolución <i>In vivo</i> .
III	Alta	Baja	La velocidad de absorción (permeabilidad) es el factor que limita la posibilidad de obtener correlaciones.
IV	Baja	Baja	Para fármacos de este grupo es difícil obtener correlaciones.

El sistema BCS clasifica los fármacos en cuatro categorías:

Clase I: alta permeabilidad y alta solubilidad. La disolución del 85% de la dosis del fármaco en menos de 30 minutos garantiza que la biodisponibilidad del fármaco no está limitada por la disolución. En este caso, el vaciado gástrico es el factor limitante del proceso de absorción. Si la disolución es más lenta que el vaciado gástrico, se recomienda establecer el perfil de disolución completo para la formulación.

Clase II: alta permeabilidad y baja solubilidad. La disolución del fármaco es el factor limitante del proceso de absorción. Por tanto, se recomienda el perfil completo de disolución en diferentes medios de disolución.

Clase III: baja permeabilidad y alta solubilidad. La permeabilidad es el factor limitante de la absorción del fármaco. La disolución del 85% de la dosis del fármaco debe obtenerse en menos de 15 minutos.

Clase IV: baja permeabilidad y baja solubilidad. Estos fármacos presentan problemas significativos para la administración oral. Se recomiendan especificaciones de disolución similares para los Clase II ^[1].

La solubilidad de un fármaco se determina disolviendo la dosis unitaria más alta del fármaco en 250 mL de tampón ajustado a un pH de entre 1,0 y 7.5 ^[20] (FDA) y 1.0 a 6.8 (EMA, OMS ^[21,22]). Se considera que una sustancia medicinal es altamente soluble cuando la dosis sobre el volumen de solubilidad de la solución es menor o igual a 250 mL. Por lo general los fármacos de alta permeabilidad son aquellos con un grado

de absorción mayor del 90% (FDA) Y 85% (EMEA, OMS) ante la ausencia de inestabilidad documentada en el sistema gastrointestinal o cuya permeabilidad se haya determinado experimentalmente [20, 21, 22].

2.2 Medio de Disolución.

2.2.1 Selección del medio

Cuando se utiliza un ensayo de disolución para evaluar las propiedades biofarmacéuticas de un principio activo, es más importante que la prueba biorrelevante propuesta simule estrechamente el entorno gastrointestinal en lugar de necesariamente la producción de condiciones de inmersión. Se deberá utilizar un medio acuoso con una gama de pH de 1.2 a 6.8 (la misma concentración iónica de los tampones de la USP). Para simular el fluido intestinal (SIF), se deberá emplear un medio de disolución con un pH de 6.8. Se deberá justificar un pH más alto caso por caso y, por lo general, el pH no deberá excederse de 8.0. Para simular un fluido gástrico (SGF), se deberá emplear un medio de disolución con un pH de 1.2 sin enzimas. Se deberá evaluar la necesidad de enzimas en SGF y SIF caso por caso y justificarla. El agua sin taponamiento no es un medio preferido debido a la variabilidad potencial en el pH [23].

Se prefiere un medio acuoso sin tensoactivos, pero un medio acuoso con tensoactivos se puede utilizar ya sea para aumentar la probabilidad de establecer la relación *In vivo* o para aumentar la solubilidad del fármaco en el caso de compuestos de baja solubilidad [24].

- Medios acuosos simples tales como fluido gástrico simulado sin pepsina (SGFsp) se pueden utilizar satisfactoriamente para fármacos BCS-I (alta solubilidad, alta permeabilidad).
- Para los medicamentos BCS-II (baja solubilidad, alta permeabilidad), la elección del medio de disolución dependerá del comportamiento de ionización del fármaco.
- Para los medicamentos BCS-II neutros, la presencia de mejoradores de la solubilidad parece ser necesario.
- Para los compuestos BCS-II débilmente básicas, cuya disolución en el estómago es de primordial importancia, el uso de medio SGFsp es importante

[24].

2.2.2 Volumen del Medio

El volumen recomendado de medio de disolución varía desde 500 hasta 1000 mL. Un volumen de 900 mL es el volumen más común, utilizando el aparato 1 y el aparato 2 de acuerdo con las especificaciones USP, farmacopea británica y japonesa ^[18]. Estos volúmenes se seleccionan para proporcionar condiciones sink al compuesto ^[23]. El volumen puede aumentar de 2 a 4 L en casos especiales (por ejemplo, en el caso de compuestos de baja solubilidad). El volumen se puede reducir de 100 a 250 mL en el caso de formas de dosificación de fármacos muy solubles. Por lo tanto, en ambos casos, se requiere justificación adecuada para aumentar o disminuir el volumen del medio de ensayo ^[18].

2.2.3. Condiciones Sink (Condiciones de Sumidero)

El término condición sumidero se originó en un hecho largamente conocido por los farmacólogos en cuanto a que la concentración de un fármaco a ambos lados de la capa epitelial de la pared intestinal se aproxima al equilibrio en un breve lapso y que el tracto gastrointestinal actúa como un sumidero natural; es decir, el fármaco es absorbido en forma instantánea en el momento en el que se disuelve. Por lo tanto, en condiciones *In vivo* no hay desarrollo de una concentración y por consiguiente no se produce el efecto retardador del gradiente de concentración sobre la disolución como predice la ecuación 2. ^[10].

Desde un punto de vista biofarmacéutico, interesa el caso en que C tiene un valor muy pequeño respecto al de C_s , es decir, cuando $C_s \gg C$. En esta situación se cumplen las condiciones sink o sumidero (valores de C inferiores al 20% de la concentración, C_s). Esta es la situación que se produce normalmente *In vivo*, y que debe reproducirse al máximo en los ensayos *In vitro*. Ello se consigue usando, con los aparatos usuales para este tipo de estudios, volúmenes de fluido acuoso suficientemente elevados (del orden de 900-1000 mL). En esta situación, C tiene un valor despreciable respecto a C_s , y puesto que para una determinada especie cristalina de un fármaco dado k y C_s , son constantes, la ecuación 1, puede escribirse ^[12]:

$$\frac{dC}{dt} = -k * S \quad (2)$$

2.2.4 Temperatura del Medio

Las condiciones de temperatura estándar para las pruebas de disolución de las formas de dosificación convencionales orales es de 37 ± 0.5 ° C. La solubilidad del fármaco depende de la temperatura. Según la ley de Le Chatelier, un proceso endotérmico es favorecido por el aumento de temperatura, así aquellos procesos exotérmicos, que exhiben energías de disolución negativos. La mayoría de los sólidos presentan energía de disolución positivo y, por tanto, un aumento de temperatura favorece su solubilidad y velocidad de disolución ^[8]. Por lo tanto, el control de la temperatura durante el ensayo de disolución es crucial. Sin embargo, para los productos que están destinados a ser disueltos o dispersados en agua y después administrados por vía oral, se necesita emplear una temperatura de 17.5 ± 2.5 ° C. ^[8]

2.2.5 Desgasificación del Medio

El gas / aire disuelto en el medio de disolución puede influir en la disolución de las partículas del fármaco. El aire disuelto puede dar lugar a un cambio en el pH del medio de disolución. Además, las burbujas de aire pueden actuar como una barrera para la disolución si están presentes en la forma de dosificación o en la malla de la cesta. La aireación puede retardar la disolución, ya que puede empujar las partículas de distancia desde el centro y hacia las paredes del recipiente de disolución. Los métodos más comunes de desgasificación son ^[25]:

- Método de filtración al vacío de USP (predeterminado a menos que se valide otro enfoque)
- Separación de Helio *
- Desgasificación Automática *
- Supercalentamiento * ^[25].

* Cuando se valida contra el método USP

2.2.6 Viscosidad del Medio

Si se considera que el coeficiente de difusión es inversamente proporcional a la viscosidad del medio, resulta evidente que está puede afectar en forma negativa a la velocidad de disolución de un sólido en un medio acuoso.

Para las soluciones de baja viscosidad (a 1 a 5 cps) existe una relación aproximadamente lineal entre la velocidad de disolución del principio activo y la viscosidad del medio ^[8].

2.2.7 pH del medio

Como se menciona anteriormente, el pH del medio influye en la solubilidad del fármaco. Además, puede afectar a la estabilidad de los excipientes. La selección cuidadosa de pH y tampones que componen el medio de disolución es esencial para los estudios In vitro de disolución, así como para la predicción de la biodisponibilidad ^[18].

El pH del medio líquido también tiene un efecto sobre el grado de ionización de sustancias constituidas por electrolitos. Las moléculas ionizadas son mucho más solubles en un medio acuoso que las moléculas no ionizadas; las moléculas básicas son más solubles en un medio ácido que en un medio alcalino. En sustancias ácidas suele ocurrir lo contrario, las cuales se disuelven con más rapidez en un medio alcalino ^[8].

2.3 Selección del Aparato

Existen siete aparatos oficialmente reconocidos por la USP. Los aparatos del 1 al 4 son para pruebas de disolución en tabletas. El aparato de canasta (Tipo I) se utiliza a menudo para pruebas de dosis no desintegrantes, tales como formulaciones de liberación prolongada con una velocidad de agitación de 100 rpm. La paleta (Tipo II) se usa frecuentemente para formas de dosis desintegrantes, y no desintegrantes a 50 rpm. El aparato de cilindros Tipo (III) es más aplicable a las formas de dosis no desintegrantes (liberación prolongada) o liberación retardada (capa entérica). Una ventaja establecida es la facilidad con que se pueden efectuar los cambios de pH en función del tiempo. El aparato de celda (Tipo IV) es comúnmente utilizado para formas de dosis no desintegrantes y principios activos de solubilidad acuosa muy baja en el modo de circuito abierto y se caracteriza por la capacidad de cambiar convenientemente el pH de la prueba ^[3]. Un comité de la AAPS publicó recomendaciones para el tipo de aparato recomendado para formas de dosificación nuevas o especiales resumidos en la tabla 4.

Tabla 4. Selección de aparatos de disolución USP para diversas formas de dosificación [3].

Aparato USP	Descripción	Velocidad de Rotación	Forma de Dosificación
I	Canastas	50-120 rpm	IR, DR, ER
II	Paletas	25-50 rpm	IR, DR, ER
III	Cilindros Alternativos	6-35 rpm	IR, ER
IV	Celda de Flujo Continuo	N/A	ER, APIs poco solubles
V	Paleta sobre Disco	25-50 rpm	Trasdérmicos
VI	Cilindro	N/A	Trasdérmicos
VII	Soporte Alternativo	30 rpm	ER

Donde, IR: Liberación Inmediata, DR: Liberación Retardada, ER: Liberación Prolongada

La FEUM reconoce los 7 aparatos para la prueba de disolución de tabletas o cápsulas. Si se trata de formas farmacéuticas entéricas, la prueba de disolución no aplica y se debe utilizar la prueba de liberación controlada [8, 26].

Las propiedades físicas y químicas de un fármaco, así como de formulación juegan un papel importante en la selección de un aparato de ensayo de disolución, especialmente en el caso de los compuestos poco solubles. A veces, el aparato de disolución existente puede necesitar modificaciones para dar cabida a nuevos mecanismos de liberación [23].

2.3.1 Aparato USP IV (Celda de Flujo)

El equipo se compone de un depósito y una bomba para el medio de disolución, una celda de flujo y una banda de agua que mantiene el medio de disolución a 37 ± 0.5 °. La bomba desplaza el medio de disolución a través de la celda de flujo en dirección ascendente. La bomba tiene un intervalo de operación de 240 mL a 960 mL por hora y las velocidades de flujo estándares son de 4 mL, 8 mL y 16 mL por minuto. La bomba debe suministrar un fluido constante ($\pm 5\%$ de la velocidad de flujo nominal); el perfil del flujo es sinusoidal con una pulsación de 120 ± 10 pulsos por minuto. Se puede usar también una bomba no pulsátil. 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^[14].



Figura 7. Aparato de Disolución USP IV (Sotax)

3. Factores que modifican los perfiles de disolución en el aparato USP IV

Aparato USP IV puede ser operado bajo diferentes condiciones como sistema abierto o sistema cerrado, diferentes velocidades de flujo y temperaturas. Además, la diversidad de tipos de celdas disponibles permite la aplicación de este aparato para probar una amplia gama de formas de dosificación incluyendo tabletas, polvos, supositorios y cápsulas blandas de gelatina. Es el método de elección para una extensa gama de productos de liberación y poco solubles^[27].

3.1. Tipo y tamaño de la celda

Existen diferentes tipos de celdas disponibles para las pruebas de tabletas, polvos, supositorios, cápsulas de gelatina dura y blanda, Implantes, semisólidos y supositorios^[2]. Para las formas de dosificación sólidas administradas oralmente, se describen 2 tipos de celdas (Figura 6): la celda grande (22.6 mm de diámetro interno), y la celda pequeña (12 mm de diámetro interno) que proporcionan datos aproximados de volúmenes de 19 mL y 8 mL, respectivamente, (Volúmenes de celdas sin perlas de

vidrio). La muestra puede colocarse sobre un soporte, pero también puede ser colocado dentro del lecho de cristal. El uso de una celda pequeña resulta en una rápida disolución del fármaco que al utilizar una celda grande [28].

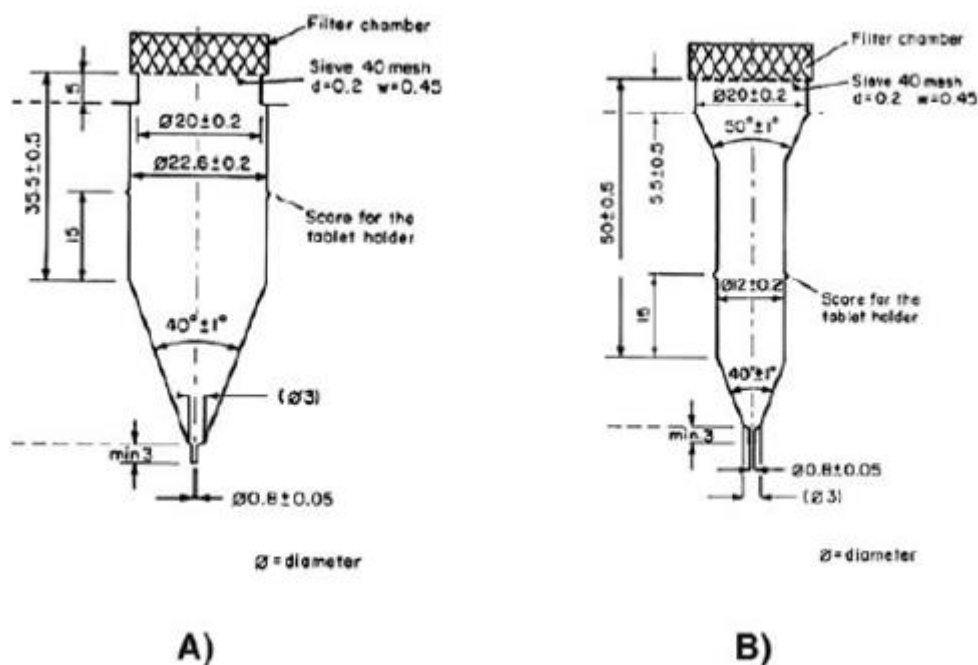


Figura 8. (A) Celda de flujo grande y (B) pequeña para administración de formas sólidas orales [14]. (USP)

3.2 Velocidad Lineal de flujo

La velocidad lineal de flujo define la hidrodinámica en la celda. Los diferentes diámetros de las celdas están asociados con velocidades axiales que corresponden al flujo. Los flujos típicos son de 4, 6 y 8 mL/min, y normalmente el flujo debe mantenerse a $\pm 5\%$ del valor nominal, por lo que se recomienda que la bomba sea calibrada regularmente. En algunos estudios se ha demostrado que al aumentar el flujo aumenta la liberación del fármaco [28].

3.3 Perlas de vidrio (Flujo turbulento o laminar)

Por lo general, el fondo de la celda se rellena con pequeñas perlas de vidrio que van entre 12 mm y 22.6 mm de diámetro, y un rubí (de aproximadamente 5 mm de diámetro) posicionado en el ápice para evitar que el material descienda. Se pueden utilizar diferentes cantidades de perlas de vidrio, dependerá de la configuración experimental.

- Sin perlas: El patrón del flujo se describe como turbulento cuando no se usan perlas, por lo regular se usa en medicamentos que necesitan una mayor agitación para liberar el activo, ya sea por su forma farmacéutica (por ejemplo, implantes) o cuando el activo es poco soluble. El flujo turbulento se caracteriza por el rápido movimiento del fluido en todas las direcciones dentro de la dirección del flujo.
- Con perlas: En este caso el patrón se describe como laminar. Un flujo laminar se caracteriza por partículas fluidas moviéndose en paralelo entre sí en la dirección del flujo. El uso de perlas no asegura un perfil de flujo laminar completamente desarrollado, ya que, en estudios de flujos por resonancia magnética, se ha comprobado que se presenta más bien un flujo laminar heterogéneo, que se caracteriza por la recirculación y el flujo hacia atrás [4, 29].

3.4 Sistema Abierto o Cerrado

El aparato IV puede funcionar de dos modos diferentes:

- Sistema abierto: Medio fresco fluye continuamente a través de la celda y se selecciona para muestras que requieren un alto volumen, es decir, compuestos de baja solubilidad y se mantienen las condiciones sink (Figura 9).
- Sistema cerrado: Un volumen fijo de medio se recicla y se utiliza cuando se necesitan pequeños volúmenes de medio. También se sugiere usarlo cuando las muestras presentan una baja carga de fármaco (Figura 10).

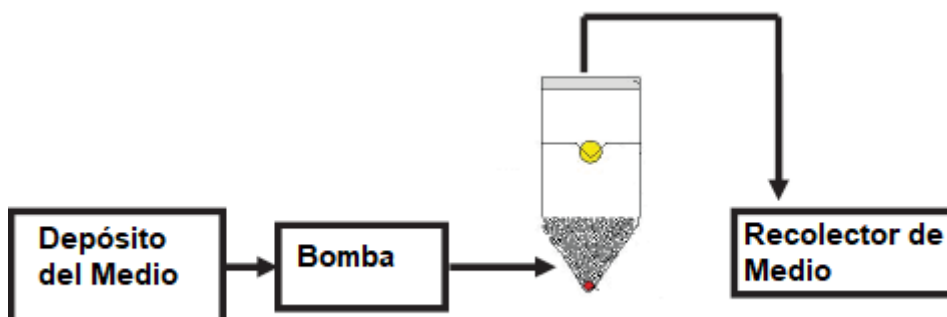


Figura 9. Diagrama esquemático de la configuración de sistema abierto para el aparato IV.

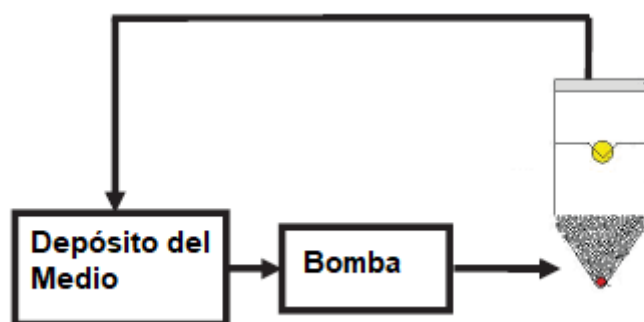


Figura 10. Diagrama esquemático de la configuración de sistema cerrado para el aparato IV.

3.5 Posición de la tableta

La posición de las formas farmacéuticas también tiene un efecto en la disolución del fármaco. Por lo general, al insertar la tableta en la celda en posición horizontal, se produce una disolución mucho más rápida que la de la tableta colocada en posición vertical [4,29].

3.6 Filtración

Un filtro se coloca en la parte superior interna de la celda para retener material no disuelto. Usualmente se utilizan filtros de fibra de vidrio (Solo o combinación de diferentes tamaños de poro). El uso de lana de vidrio se sugiere a veces para las formas de dosificación con activos insolubles y / o pegajosos. Es necesaria la selección apropiada del filtro para una filtración eficiente y evitar contrapresión creada por la resistencia del filtro [29].

La filtración de muestras de disolución debe eliminar la disolución post-muestreo de las partículas API y reducir el potencial de que las partículas excipientes puedan crear problemas de contrapresión / obstrucción en la instrumentación analítica. Los tamaños típicos de los poros del filtro oscilan entre 0.45 y 70 μm . Para el fármaco micronizado, el analista debe esforzarse por utilizar el filtro con el tamaño de poro más pequeño posible [23].

3.7 Muestreo

Las muestras obtenidas pueden ser analizadas directamente por un espectrofotómetro UV-Vis o por una sonda de fibra óptica. La recolección de muestras puede ser automatizada para garantizar la coherencia. La automatización puede ser en línea, en la que muestra se mide por UV, o por automatización fuera de línea, en la que la muestra se recoge automáticamente y se analiza después con un método apropiado [23].

3.8 Ventajas y Desventajas del Aparato USP IV

Ventajas del método:

- 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.
- Para fármacos poco hidrosolubles, es el medio ideal para obtener las condiciones de sumidero o disolución infinitas necesarias.
- El desarrollo de correlaciones *In vitro-In vivo* puede ser más fácil, ya que puede obtenerse un perfil completo simulando todo el tracto gastrointestinal cambiando los medios de disolución.
- Este método evita el problema que se presenta cuando un fármaco sufre descomposición debida a su permanencia en el medio de disolución, por largos periodos de tiempo.
- Se puede automatizar la toma de muestras.

Desventajas del método:

- La validación del método de flujo durante el tiempo de prueba es difícil.
- La obstrucción de filtros, causa variaciones graves en el flujo del medio de disolución y puede dañar la bomba.
- Pueden requerirse más de 100 litros del medio de disolución, para la prueba por sextuplicado de un producto de liberación prolongada durante 24 horas [30].

4. Descripción de técnicas analíticas

4.1 Espectrofotometría UV-Vis

4.1.2 Generalidades de la espectrofotometría Ultravioleta Visible (UV-Vis)

La espectrofotometría UV-Vis utiliza la radiación del espectro electromagnético, cuya longitud de onda está comprendida entre los 100 y 800 nm (energía comprendida entre las 286 y 36 kcal mol⁻¹), y su efecto sobre la materia es producir transiciones electrónicas entre los orbitales atómicos y/o moleculares de la sustancia. En algunos casos, los efectos y la detección pueden llegar a IR cercano (800-900 nm). En la espectrofotometría UV-Vis, una especie química (en general una molécula, aunque puede tratarse de una especie monoatómica, un ion o un complejo) absorbe UV-vis, y la energía adquirida por el sistema causa transición de un electrón de un estado basal o fundamental (EF) a uno excitado (EE). La energía de la transición está relacionada con la longitud de onda de la radiación a través de la ecuación de Planck.

Un gráfico o representación de la respuesta del sistema en función de la longitud de onda o frecuencia se denomina espectro. Para una sustancia determinada, la longitud de onda a la cual se produce el máximo de absorbancia en el espectro se conoce como $\lambda_{\text{máx}}$.

La señal espectral permite, por un lado, identificar algunos grupos funcionales presentes en las moléculas y, por el otro, estimar la concentración de una sustancia.

La espectrofotometría es usada para evaluar la concentración de una especie y utiliza un instrumento llamado espectrofotómetro ^[31].

4.1.3 Aplicaciones

La espectrometría UV-Vis se emplea generalmente en la determinación cuantitativa de la concentración en solución de especies químicas como iones metálicos de transición y compuestos orgánicos muy conjugados ^[32]. La mayor parte de la absorción de los compuestos orgánicos resulta de la presencia de enlaces π (es decir, insaturados). Un

cromóforo es un grupo molecular que, normalmente, contiene un enlace π [31]. Muchas de las determinaciones incluyen un paso de reacción entre la especie y un compuesto que origine un derivado coloreado o absorbente en el UV-Vis (por ejemplo, un complejo o aductor).

4.1.4 Consideraciones para el desarrollo del método.

Muestreo: La espectroscopía UV-Vis se utiliza principalmente, para medir líquidos o disoluciones. Esto es más simple y permite un análisis cuantitativo más exacto que realizar medidas de reflectancia en sólidos. En esta técnica, una celda debe contener el líquido o disolución en el área de muestra. Idealmente, las celdas deberían ser completamente transparentes a todas las longitudes de onda, ya que la absorbancia de la propia celda reduce el rango dinámico lineal efectivo para la muestra. Las celdas de cuarzo fundido son razonablemente transparentes por debajo de 210 nm.

La celda más utilizada es la rectangular abierta (Figura 11). Estas celdas pueden tener pasos ópticos de 1 a 100 mm, pero el más usualmente utilizado es 10 mm. Casi todas las celdas rectangulares tienen una anchura exterior de 12.5 mm. Cuando el volumen de muestra es limitado, a menudo se utilizan celdas con apertura.

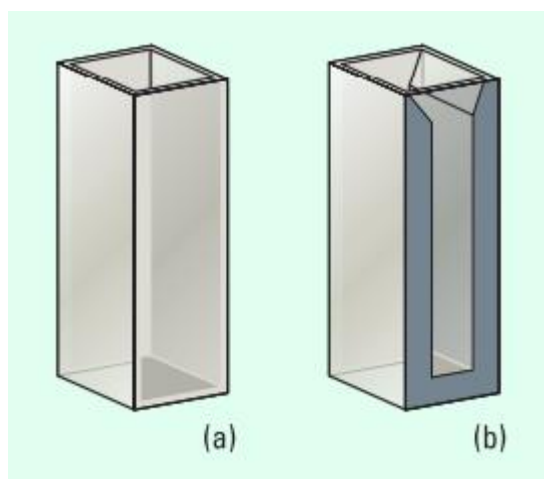


Figura 11. Celdas estándar (a) y con apertura (b).

Elección del Disolvente: El disolvente ideal para la preparación de muestras sería aquel que disolviera todos los tipos de compuestos, sería no inflamable y no tóxico, además de completamente transparente a todas las longitudes de onda [31]. Por lo general, se usa el agua como disolvente para compuestos inorgánicos y etanol para

compuestos orgánicos porque este alcohol absorbe muy débilmente a la mayoría de las longitudes de onda ^[32].

Efecto del disolvente, pH, concentración y temperatura: En las moléculas existen también átomos o grupos de átomos que no absorben radiación, pero hacen que se modifique alguna de las características de la absorción del cromóforo. La naturaleza del solvente, el pH de la solución, la temperatura, la concentración de electrolitos o la presencia de sustancias interferentes pueden provocar también desplazamientos de las bandas en el espectro UV-Vis. Los efectos son los siguientes:

- Efecto hipsocrómico: corrimiento a λ menores (desplazamiento al azul) por sustitución o cambio en el medio, por ej. El solvente.
- Efecto batocrómico: corrimiento a λ mayores (desplazamiento al rojo).
- Efecto hipercrómico: aumento de la intensidad de una banda espectral por sustituyente o interacciones con el entorno molecular.
- Efecto hipocrómico: opuesto a hipercrómico.
- Auxocromo: átomo o grupo de un cromóforo que, generalmente por conjugación con un cromóforo, ocasiona un desplazamiento batocrómico y/o un efecto hipercrómico en una banda determinada del mismo, generalmente en la de menor frecuencia. Esta palabra se encuentra en desuso ^[32].

Desarrollo del método: El desarrollo del método implica la selección de una o varias longitudes de onda que den lugar a los mejores resultados para un determinado análisis o instrumento. En éste, deben definirse parámetros como exactitud, precisión, sensibilidad, linealidad, rango, selectividad y robustez. Como estos parámetros no pueden ser optimizados al mismo tiempo, deben determinarse antes del análisis aquellos que se desean optimizar.^[31].

4.2 Cromatografía

4.2.1 Descripción general de los métodos cromatográficos.

La cromatografía es una técnica física de separación basada en la distribución diferencial de los componentes de una mezcla entre dos fases, estacionaria y móvil, cuando son arrastrados por la fase móvil que se desplaza en contacto con, y a través de, la fase estacionaria. La combinación de dos efectos, el arrastre de los componentes por la fase móvil y su retención por la fase estacionaria, con

transferencia repetitiva de los componentes entre ambas fases, conduce a su separación por migración diferencial de los mismos. La técnica conlleva cierta metodología que se refleja en la definición siguiente, dada por la IUPAC “La cromatografía es un método de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es estacionaria mientras que la otra se mueve en una dirección definida” [33].

El proceso cromatográfico ocurre como resultado de repetidos equilibrios de distribución de los componentes de la muestra en las dos fases no miscibles entre sí. Estos equilibrios se describen por ecuaciones simples que suponen la transferencia de un analito entre la fase estacionaria y la fase móvil. Se denomina constante de distribución o coeficiente de distribución a la constante de este equilibrio:

$$A_m \leftrightarrow A_s \quad K_D = \frac{C_{A,s}}{C_{A,m}}$$

Dónde:

K_D es la constante de distribución

$C_{A,s}$ es la concentración molar del analito A en fase estacionaria

$C_{A,m}$ es la concentración molar del analito A en la fase móvil’.

Ambas fases han de ser elegidas de manera que los componentes a separar se distribuyan de distinta manera entre ellas. Así, los componentes que sean retenidos con mayor fuerza por la fase estacionaria irán más lentos, por el contrario, los que sean retenidos con menor fuerza, avanzarán a mayor velocidad transportados por la fase móvil [34].

4.2.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC/CLAR) es una técnica analítica de separación más ampliamente utilizada, en la que se utiliza una presión elevada para forzar el paso de la fase móvil a través de una columna que contiene partículas de pequeño tamaño. De esta manera se consigue:

- Aumentar la eficiencia de la separación al disminuir el tamaño de la partícula.
- Reducir la duración del proceso de separación entre 5 y 50 veces.
- Permitir realizar la detección en continuo del eluato y por tanto la automatización.

- Trabajar a escala preparativa ^[35].

Para solutos con masas moleculares superiores a 10,000 Da a menudo se utiliza la cromatografía de exclusión por tamaño, aunque ahora también es posible tratar estos compuestos con cromatografía de reparto en fase inversa. Para especies iónicas de masa molecular más pequeña, se utiliza con frecuencia la cromatografía de intercambio iónico. Los métodos de reparto se aplican a las especies poco polares pero iónicas. La cromatografía de adsorción se elige con frecuencia para separar especies no polares, isómeros estructurales y grupos de compuestos como, por ejemplo, los hidrocarburos alifáticos de los alcoholes alifáticos ^[36].

4.2.3 Instrumentación de cromatografía de líquidos de alta resolución.

Con objeto de alcanzar un caudal de eluyente razonable con rellenos de tamaño de partícula entre 2 y 10 μm , se requieren presiones de algunos cientos kg-fuerza por centímetro cuadrado. Como consecuencia de estas elevadas presiones. El equipo necesario para la HPLC tiende a ser más sofisticado y caro ^[36]. Básicamente, un cromatógrafo consiste en un sistema compuesto de un 1) reservorio de fase móvil, 2) una bomba de alta presión, 3) un sistema de introducción de muestra, 4) la columna cromatográfica y, a continuación, 5) el acoplamiento de un sistema de detección y 6) de un sistema de adquisición y tratamiento de datos que permita “visualizar” la separación ^[35].

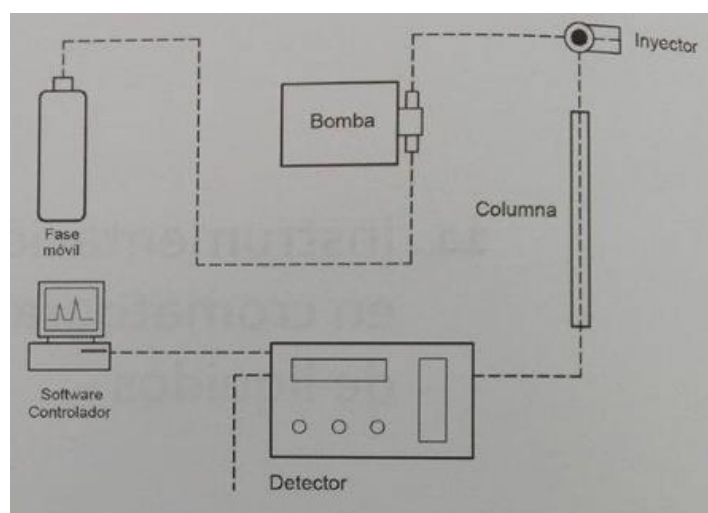


Figura 12. Componentes básicos de la instrumentación para cromatografía de líquidos de alta resolución ^[33].

4.2.5 Detectores UV, VIS y PDA

Los detectores UV, VIS, y PDA se clasifican como detectores de absorbancia. Son los más utilizados en HPLC. Están basados en la absorción de la radiación UV-Visibles por las moléculas de soluto. Los detectores más sencillos de UV-Visible son los de longitud de onda fija que funcionan con radiación de una única longitud de onda generada por una lámpara específica, pero, debido a su poca selectividad, en los equipos actuales se han sustituido por detectores de longitud de onda variable que son más versátiles y permiten un grado de automatización elevado en los análisis de rutina.

Una información más completa la suministran los detectores de matriz de fotodiodos (*diodo-array o PDA*) que registran simultáneamente la señal a diferentes longitudes de onda suministrado el espectro de la disolución que atraviesa la celda. Proporcionan información en tres dimensiones: tiempo, absorbancia y longitud de onda. Por tanto, estos detectores además de poner de manifiesto la elución de los solutos permiten obtener información cualitativa sobre su estructura a través de sus espectros ultravioletas y confirmar la pureza de los picos determinando si se trata de un único componente o si bajo el mismo pico eluye más de una sustancia. Los espectrofotómetros “diodo array” emplean una geometría óptica inversa a los de absorción. Todo el haz de luz policromática de la fuente se enfoca a través de la celda de flujo para después dispersarla en sus correspondientes longitudes de onda en una rejilla de difracción holográfica. La luz dispersada se enfoca a una serie lineal de detectores fotodiodicos. La serie de fotodiodos en una fila de detectores montados sobre una placa o chip de silicio de 1 cm donde cada diodo recibe una longitud de onda diferente. La radiación que llega a cada diodo genera una fotocorriente que se procesa para transformarla en medidas de absorbancia. ^[35, 36].

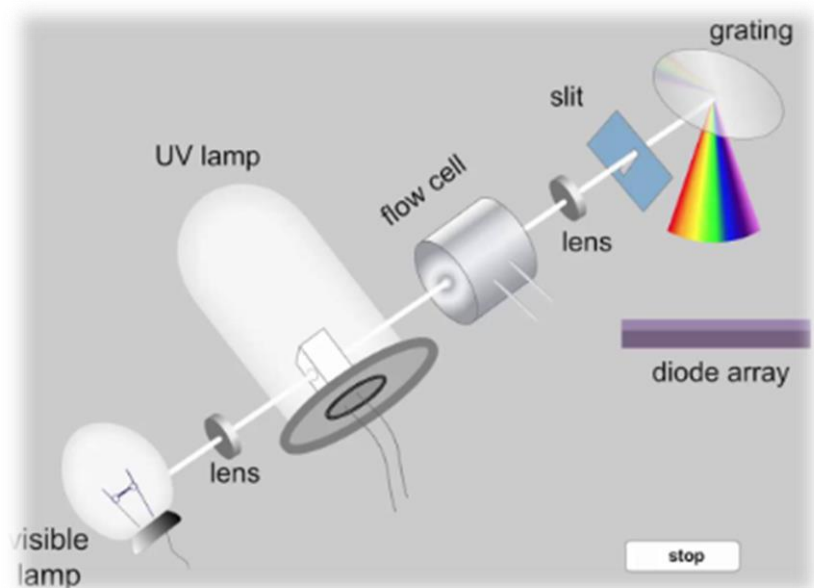


Figura 13. Esquema de un detector espectrofotométrico UV-visible de diodos en fila

4.2.6 Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC) o Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC)

En 2004, Waters lanzó la técnica conocida como “Ultra-Performance Liquid Chromatography” (UPLC), al duplicar casi la presión de funcionamiento total (hasta 15,000 psi) para obtener velocidades de flujo más rápidas, los desarrolladores UPLC lograron separaciones LC de resolución igual o mejor en intervalos más cortos de tiempo. Otras compañías entraron al mercado con instrumentos similares “UHPLC”, por lo tanto, las abreviaturas UPLC y UHPLC son sinónimos. La mayoría de los métodos de HPLC se desarrollan en partículas de entre 2.5 y 5 micras de tamaño. Las partículas sub menores de 2 micras requieren una presión más alta para trabajar por lo que los sistemas UHPLC o UPLC necesitan ser capaces de operar por encima de 6,000 Psi que es típicamente el límite superior de HPLC convencionales ^[37].

4.3 Diferencias entre espectrofotometría y HPLC.

Tabla 5. Principales diferencias entre las técnicas espectrofotométricas y cromatográficas.

Espectrofotómetro	HPLC
El precio del equipo es accesible y oscila entre 1,200 dólares los más sencillos hasta 17,000 dólares los más sofisticados.	El equipo tiene un precio relativamente accesible que varía según el detector y otras características. Su precio promedio equivale a 40,000 dólares.
El equipo es sencillo de usar.	Es un equipo más complejo que requiere un manejo adecuado y cuidadoso debido a los diferentes sistemas que se manejan (bombeo, fase móvil, inyección, etc)
Sirve para la identificación y cuantificación de analitos.	Separa, identifica y cuantifica analitos.
Mediante un método adecuado puede utilizarse para cuantificar hasta dos analitos.	Se puede utilizar para la separación y cuantificación de más de dos analitos.
Para el análisis de un solo analito esta técnica resulta ser sensible y confiable.	Es sensible, específico y confiable.
Es un método rápido que no requiere un pretratamiento de la muestra, más que la filtración.	Es rápido dependido de las características del equipo, requiere un pretratamiento de la muestra.
Los disolventes pueden ser o no grado espectrofotométrico, y suelen utilizarse soluciones amortiguadoras.	Requiere de disolventes grado HPLC que suelen ser costosos, entre ellos solventes orgánicos, que son contaminantes y tóxicos.
Es barato	En general es más costosa que la técnica espectrofotométrica, por los recursos que se utilizan (disolventes, filtros, columnas)
El aparato de disolución puede acoplarse a muestreadores continuos y estos al espectrofotómetro, volviéndolo completamente automatizado.	La completa automatización se vuelve más complicada, al tratar de sincronizar los tiempos de intervalo de muestreo con los tiempos de corrida de la columna.

5. Análisis y comparación de perfiles de disolución

La comparación de perfiles para poner de manifiesto la similitud o no de las curvas sometidas a comparación debe realizarse mediante una aproximación matemática. Pueden utilizarse tres métodos matemáticos para la comparación de perfiles de curvas de velocidad de disolución ^[12].

- Modelo Independiente del proceso de disolución
- Modelo multivariable del proceso de disolución
- Modelo dependiente del proceso de disolución.

5.1 Modelos Independientes

Son aquellos que permiten comparar perfiles de disolución sin necesidad de ajustar los datos a un modelo preestablecido que los represente ^[34]. Entre ellos el factor de diferencia (f_1), y el factor de similitud (f_2), y comparación por parámetros por pares.

5.1.1 Comparación matemática de cálculo de índices de diferencia: f_1 y f_2

Establece dos factores de comparación: el factor de diferencia (f_1), y el factor de similitud (f_2), señalados en tabla 6.

Los tiempos de toma de muestra deben ser los mismos para los perfiles que se comparan. Ha de utilizarse un mínimo de 12 unidades posológicas por lote de formulación ensayado y se deben emplear los valores medios de los perfiles para su comparación. Estos valores medios solo se pueden utilizar si el coeficiente de variación (CV) en el primer período de tiempo (hasta pasados 15 minutos) es inferior al 20% y no es superior al 10% en el resto de los tiempos de muestreo ^[12].

La FDA indica que estos métodos independientes del modelo son más convenientes para la comparación de los perfiles de disolución cuando hay tres a cuatro o más puntos temporales de disolución disponibles ^[20, 38].

índices ξ_i de Rescigno: se han desarrollado para la comparación de las funciones de la concentración de plasma sanguíneo. ξ_1 y ξ_2 se consideran análogos a f_1 y f_2 .

$$\xi_i = \left[\frac{\int_0^{t_n} |R_t - T_t|^i dt}{\int_0^{t_n} |R_t + T_t|^i dt} \right]^{1/i}$$

Tabla 6. Diferencias entre f_1 y f_2 para comparar perfiles de disolución.

<p>El factor de diferencia, f_1, es la diferencia porcentual entre dos curvas a cada tiempo de toma de muestra.</p>	<p>El factor f_2 es la transformación logarítmica del recíproco de la raíz cuadrada de la suma de los errores al cuadrado.</p>
$f_1 = \left[\frac{\sum_{t=1}^{t=n} (R_t - T_t)}{\sum_{t=1}^{t=n} R_t} \right] * 100$ <p>Donde=</p> <p>R_t= C cantidades de fármaco disuelto acumuladas a cada tiempo t a partir de la formulación de referencia. T_t= C cantidades de fármaco disuelto acumuladas a cada tiempo t a partir de la formulación problema.</p>	$f_2 = 50 * \log \left[\frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^{t=n} (R_t - T_t)^2}{n}}} * 100 \right]$ <p>Donde=</p> <p>n= Número de puntos experimentales R_t= Porcentaje de fármaco disuelto acumuladas a cada tiempo t a partir de la formulación de referencia. T_t= Porcentaje de fármaco disuelto acumuladas a cada tiempo t a partir de la formulación problema.</p>

Un valor entre 0 y 15 puede considerarse como indicativo de la superposición de curvas. Un valor entre 50 y 100 puede considerarse un indicativo de similitud de curvas. Es el más utilizado.

5.1.2 Comparación por parámetros obtenidos de los perfiles (Comparación por pares)

Los parámetros puntuales empíricos son magnitudes que se calculan o se deducen de los datos experimentales, como el tiempo en que tarda en disolverse un determinado porcentaje de la dosis (t_{10} , t_{50} , t_{80}) [36].

Área bajo la curva (ABC)

El área comprendida bajo la curva (ABC o AUC) de niveles plasmáticos frente al tiempo, AUC_{0-T} , es un parámetro representativo de la cantidad de fármaco que alcanza la circulación sistémica, en forma inalterada, tras la administración de una dosis.

Este parámetro se puede obtener de los perfiles de disolución arrojados por el aparato IV USP, ya que simula, de mejor manera, las condiciones *In vivo*.

Su cálculo puede realizarse por integración numérica (método trapezoidal) o a partir de la expresión matemática derivada de resolver la integral de la ecuación que describe la evolución temporal de las concentraciones plasmáticas del fármaco tras su administración al organismo.

El método se basa en calcular el área entre dos puntos experimentales consecutivos de la curva de concentración (C) –tiempo (t). Figura 14.

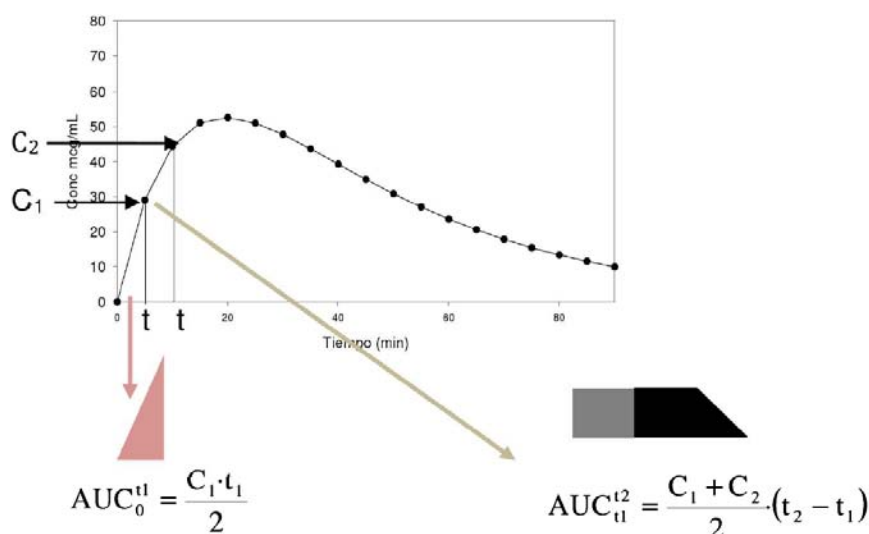


Figura 14. Representación gráfica de los valores de concentración frente a los tiempos de toma de muestra ^[1].

Eficiencia de disolución (ED): Se calcula a partir de las curvas acumulativas de fármaco disuelto y es necesario que se haya disuelto, como mínimo, el 90% de la dosis:

$$EF(\%) = \frac{AUC_0^T}{Q_{100} * T} * T$$

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

$$MDT = \frac{\sum [t_i * \Delta Q_i]}{W_{\infty}}$$

5.1.3 Métodos Estadísticos basados en ANOVA

Son aquellos que tratan al porcentaje disuelto como variable aleatoria y la someten a un análisis de varianza, tomando a la formulación como única variable de clase (monofactorial) y comparando tiempo a tiempo, o considerando a la formulación y el tiempo (bifactorial) en forma simultánea, bajo la hipótesis nula de similitud. Sin embargo, su aplicación no es estrictamente correcta ya que se viola la hipótesis de independencia debido a la correlación entre el % Disuelto y el tiempo ^[34,38].

-ANOVA de una vía

-ANOVA de dos vías

5.2 Modelos Multivariantes (Enfoque MANOVA)

Estos se basan en medidas repetidas, donde el tiempo es el factor independiente y el porcentaje de fármaco disuelto repetido es la variable dependiente. El método es más preciso, ya que toma en cuenta la variabilidad, así como la estructura de correlación de los datos. Sin embargo, este método no puede ser demasiado informativo, ya que no contiene información acerca de la naturaleza de las diferencias entre los perfiles de medios de disolución. Además, este método, es tácticamente difícil de aplicar ^[18, 38].

Método estadístico que tiene en cuenta la variabilidad, asume que la correlación utiliza un efecto mixto y la estructura de correlación en la estructura de los datos son documentos de orientación

5.3 Modelos Dependientes

Son aquellos que incluyen diferentes formas estadísticas de comparación de perfiles, con el común denominador de precisar, todas ellas, una etapa previa de modelado de los datos, de manera de ajustarlos a ecuaciones que describan su evolución temporal. El criterio de selección del modelo y la interpretación de sus parámetros son desventajas de estos métodos. Luego de ser ajustados, los datos pueden compararse de diversas maneras, tales como la prueba T2 de Hotelling o mediante "regiones de similitud" ^[34]. Los métodos matemáticos no-lineales que se utilizan para el ajuste de los datos son los siguientes ^[18]:

- Cinética de orden cero
- Cinética de primer orden

- Hixson–Crowell
- Higuchi
- Weibull
- Korsmeyer–Peppas
- Crowder

6. Monografía de Esomeprazol magnésico trihidratado

6.1 Propiedades fisicoquímicas

Esomeprazol es el isómero S del omeprazol, que es una mezcla racémica (S- y R-isómeros). Ambos tienen el mismo mecanismo de acción, pero difieren en sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas.

Tabla 7. Propiedades físicas de esomeprazol. DrugBank

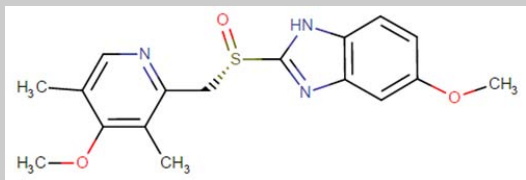
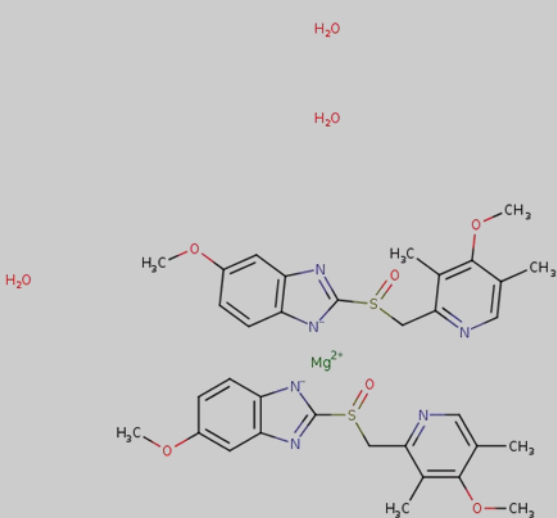
Nombre: Esomeprazol	
Descripción física: Polvo cristalino blanco o ligeramente coloreado.	
Sinónimos: (-)-omeprazol (S)-(-)-omeprazol	
Peso promedio: 345.416	
Fórmula Química: C 17 H 19 N 3 O 3 S	
Nombre IUPAC: 5-metoxi-2 - [(S) - (4-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-il) metanosulfinil] -1H-1,3-benzodiazol.	
Punto de Fusión: 155 ° C	
Solubilidad en Agua: 0.353 mg / mL Soluble en metanol, butanol y etanol. Insoluble en heptano.	
Log P: 1.66	
pka 1: 9.68 pka 2: 4.77	
Derivado de bencimidazol	

Tabla 8. Propiedades físicas de esomeprazol magnésico trihidratado. DrugBank , [39, 40]

Nombre: Esomeprazol magnésico trihidratado	
Descripción física: Polvo cristalino blanco o ligeramente coloreado.	
Peso promedio: 767.17	
Fórmula Química: C 34 H 42 Mg N 6 O 9 S 2	
Nombre IUPAC: magnesio (2+) ion bis (5-metoxi-2 - [(4-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-il) metanosulfinil] -1H-1,3-benzodiazol-1-ide) trihidrato	
Punto de Fusión: 180.0830	
Solubilidad en Agua: 0.0174 mg / mL Altamente soluble en disolventes polares (Metanol > etanol > acetona), Medianamente soluble en búfer alcalino pH 9.0 Baja solubilidad en medio ácido (pH 1.2) [41]	
Log P: 3.49	
Pka 1: 9.68 pka 2: 4.77	
λ_{máx}: 275 nm	
BCS: Tipo II	

Estabilidad: Es en función del pH, se degrada rápidamente en medios ácidos, reacciona con ácido (0.1N HCL) y se convierte en sulfonamida (ionizable), pero tiene una estabilidad aceptable en condiciones alcalinas. Esomeprazol no contiene cromóforos que absorban a longitudes de onda menores a 290 nm y, por lo tanto, no se espera que sea susceptible a la fotólisis directa por la luz solar [42].

6.2 Mecanismo de acción

Esomeprazol es un compuesto que inhibe la secreción de ácido gástrico y está indicado en el tratamiento de la enfermedad de reflujo gastroesofágico (ERGE), la curación de la esofagitis erosiva, y la erradicación de *H. pylori*, para reducir el riesgo de recurrencia de la úlcera duodenal. Esomeprazol pertenece a una nueva clase de compuestos antisecretores, los benzimidazoles sustituidos, que no presentan propiedades antagonistas anticolinérgicos o H₂ de la histamina, pero que suprimen la secreción de ácido gástrico mediante la inhibición específica de la H⁺ / K⁺ ATPasa en la superficie de secreción de las células parietales gástricas. Al hacerlo, inhibe la secreción de ácido en el lumen gástrico. Este efecto es dependiente de la dosis y conduce a la inhibición, tanto basal como estimulada, de la secreción de ácido, independientemente del estímulo ^[42].

6.3 Farmacocinética

Absorción: 90%

Volumen de Distribución: 16 L [voluntarios sanos]

Enlace proteico: 97%

Metabolismo: Principalmente hepática. Esomeprazol se metaboliza completamente por el sistema citocromo P450 a través de CYP2C19 y CYP3A4. Su metabolismo produce metabolitos hidroxilados y desmetilados inactivos, que no tienen efecto sobre la secreción de ácido gástrico. Menos de 1% del fármaco original se excreta en la orina.

Vía de Eliminación: Aproximadamente el 80% de la dosis administrada de esomeprazol se excreta como metabolitos en la orina y el 20% restante se excreta en las heces.

Vida Media: 1-1.5 horas

Interacciones con las comidas: Tomar independientemente de las comidas.

Los niveles plasmáticos pico de administración oral (C_{máx}) ocurren en aproximadamente 1.5 horas (T_{máx}). La C_{máx} aumenta proporcionalmente cuando se aumenta la dosis, y hay un aumento de tres veces en el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo (ABC) de 20 a 40 mg. ^[42].

6.4 Ventajas potenciales

A las dosis recomendadas, esomeprazol parece ser el más potente de IBP en el mercado. Tiene una mayor supresión de ácido que omeprazol, lansoprazol, o pantoprazol. Esomeprazol tiene una mayor biodisponibilidad sistémica que omeprazol debido a un metabolismo de primer paso más bajo y una farmacocinética no lineal. Esomeprazol (S isómero) se metaboliza más lentamente y de forma reproducible que el R isómero y omeprazol (mezcla de ambos S - y R isómeros). Por lo tanto, esomeprazol puede producir concentraciones plasmáticas más altas durante períodos más largos e inhibir la producción de ácido gástrico de manera más eficaz y por un período de tiempo más largo ^[43].

6.5 Prueba de Disolución según USP

Según la USP:

Medio: Ácido clorhídrico 0.1 N; 300 mL. Después de 2 horas, continuar con una solución amortiguadora de fosfato de pH 6.8 según se indica a continuación; agregar al vaso 700 mL de fosfato di básico de sodio 0.086 M y ajustar con ácido clorhídrico 2 N o hidróxido de sodio 2 N, si fuera necesario, a un pH de 6.8 ± 0.05 .

Aparato 2: 1 00 rpm

Tiempo: 30 minutos en una solución amortiguadora de fosfato de pH 6.8.

Tolerancias: No menos de 75% (Q) de la cantidad declarada de esomeprazol. ^[14]

CAPITULO II: MATERIALES Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

1. Diagrama de Flujo

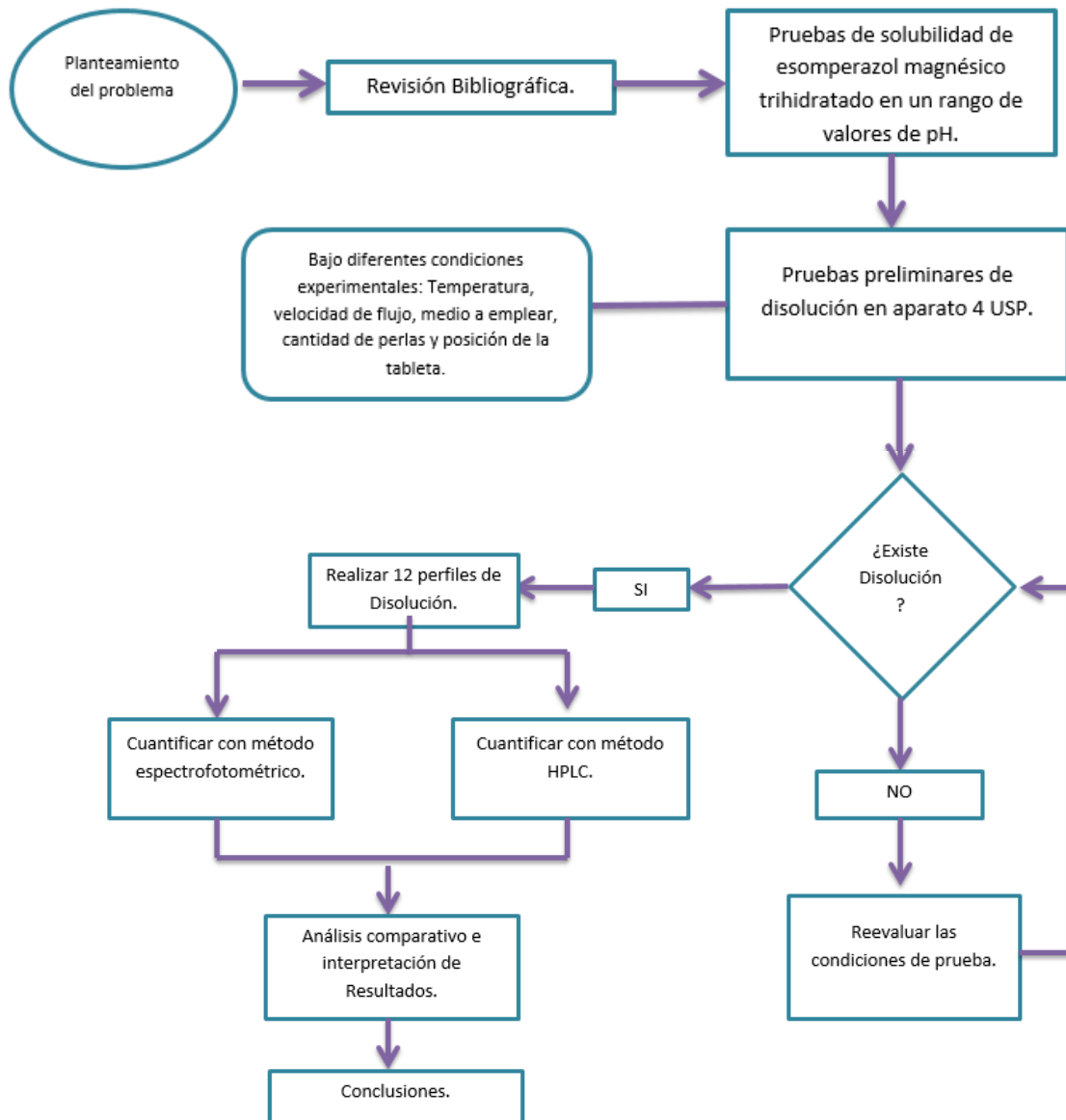


Figura 15. Diagrama de flujo de las actividades a desarrollar.

2.Materiales

2.1 Productos

- ©Astra Zeneca, Neixium-mups Tabletas Esomeprazol magnésico trihidratado 40 mg. Producto innovador, Lotes A, B y C. Reg. No. 106M2001SSAIV.
- Estándar Esomeprazol Magnésico Trihidratado. Fabricante Hetero. No. Lote ET0020116.

*La USP señala que debe utilizarse un estándar de omeprazol, por lo que en el anexo 1 se señalan los cálculos de corrección.

2.2 Reactivos

- Acetonitrilo grado cromatográfico
- Ácido fosfórico grado reactivo
- Agua Desionizada
- Agua purificada
- Fosfato Dibásico de Sodio Anhidro grado reactivo
- Fosfato Monobásico de Potasio
- Fosfato Monobásico de Sodio Monohidratado grado reactivo
- Hidróxido de Sodio
- Metanol grado cromatográfico

2.3 Equipos e Instrumentos

- Balanza Analítica Mettler Toledo.
- Cronometro
- Dissolutor Sotax de celdas de flujo continuo, Mod. CH-4008Basel.
- Espectrofotómetro-UV Mod. Cary 100 Conc. No. De serie EL050430
- Parrilla de Calentamiento
- Potenciómetro Mettler Toledo, Mod. Seven multi, No. De Serie 1227257138
- Termómetro
- UPLC-Acquity UPLC Clase H. Detector PDA eñ UPL No. De Serie 612UPL942A

2.4 Material

- Barra Magnética
- Celda de cuarzo, paso de luz 1cm
- Espátula
- Filtros de microfibras de vidrio marca Whatman GF/D de 24 mm
- Filtros de jeringa (acrodisco de 25 mm)
- Gradilla
- Jeringas
- Matraces Volumétricos: 25,50,100,200 mL y 1 LT
- Matraz Buchner
- Membrana durapore HVLP de 0.45 μ m
- Papel Whatman
- Perlas
- Pipeta Pasteur con bulbo
- Piseta
- Probetas de plástico
- Probetas de vidrio
- Tubos cilíndricos
- Vasos de precipitados

2.5 Preparación de Soluciones

2.5.1 Solución de Cloruro de Potasio 0.2 M

Disolver 14.91 g de cloruro de potasio en agua para obtener 1 L de solución.

2.5.2 Solución de Ácido Clorhídrico pH 1.2.

Colocar 50 mL de la solución de cloruro de Potasio en un matraz volumétrico de 200 mL, agregar 85 mL de ácido clorhídrico 0.2 M, después agregar agua a volumen.

2.5.3 Solución de Fosfato Monobásico de Potasio 0.2 M

Pesar 27.22 g de fosfato monobásico de potasio grado reactivo, llevarlo a un matraz volumétrico de 1 L y llevar a volumen con agua.

2.5.4 Solución de Hidróxido de Sodio 0.2 M

Disolver 4.0 g de hidróxido de sodio en agua para obtener 100 mL de solución.

2.5.5 Solución Búfer de Fosfato pH 6.8

Colocar 50 mL de la solución de fosfato monobásico de potasio 0.2 M en un matraz volumétrico de 200 mL, agregar 22.4 mL de la solución de hidróxido de sodio 0.2 M, después agregar agua a volumen.

2.5.6 Solución Búfer de Fosfato pH 7.5

Colocar 50 mL de la solución de fosfato monobásico de potasio 0.2 M en un matraz volumétrico de 200 mL, agregar 42.4 mL de la solución de hidróxido de sodio 0.2 M, después agregar agua a volumen.

2.5.7 Solución Búfer de Fosfato pH 11.3

Colocar 50 mL de la solución de fosfato monobásico de potasio 0.2 M en un matraz volumétrico de 200 mL, agregar 63.9 mL de la solución de hidróxido de sodio 0.2 M, después agregar agua a volumen.

2.5.8 Solución Búfer de Acetatos pH 4.5

Colocar 3 g de acetato de sodio en un matraz volumétrico de 1000 mL, después agregar 14 mL de solución de ácido acético 2 N, después agregar agua a volumen y mezclar.

2.5.9 Solución búfer de Fosfato Dibásico de Sodio 0.5 M

Pesar 70.89 g de fosfato dibásico de sodio anhidro, transferirlo a un matraz volumétrico de 1 L, añadir 500 mL de agua purificada, agitar con barra magnética durante 20 minutos o hasta su completa solubilidad, llevar a volumen con agua purificada y mezclar.

2.5.10 Solución búfer pH 7.3

Colocar aproximadamente 500 mL de agua purificada en un matraz volumétrico de 1 L, medir y transferir 60 mL de fosfato dibásico de sodio 0.5 M. Por separado pesar 1.44 gramos de fosfato monobásico de sodio monohidratado, transferirlo al matraz volumétrico, agitar con barra magnética durante 10 minutos, llevar a volumen con agua purificada y ajustar el pH a 7.3 ± 0.1 con ácido fosfórico concentrado.

2.5.11 Fase móvil

En un vaso de precipitados de 1 L mezclar 350 mL de acetonitrilo, 500 mL de buffer pH 7.3 y 150 mL de agua purificada, agitar con barra magnética durante 5 minutos, filtrar por membrana durapore HVLP de $0.45 \mu\text{m}$ y desgasificar.

2.5.12 Fase móvil de lavado

En un vaso de precipitados de 1 L, mezclar 500 mL de metanol y 500 mL de agua purificada, agitar con barra magnética durante 10 minutos y permitir que se establezca a temperatura ambiente, filtrar por membrana durapore HVLP de $0.45 \mu\text{m}$ y desgasificar.*

*Se desgasifica siguiendo la metodología señalada por la USP: Filtrar al vacío utilizando un filtro con un tamaño de poro de 0.45 μm o menor agitando vigorosamente, y continuar agitando al vacío durante aproximadamente 5 minutos.

3. Procedimiento Experimental

La FDA, OMS, EMEA [20,21,22] establece que los métodos utilizados para cuantificar muestras para perfiles de disolución deben estar validados. El método espectrofotométrico se desarrolló dentro del laboratorio LEDEFAR y el método cromatográfico utilizado fue el señalado por la USP para perfiles de disolución de tabletas de esomeprazol [14].

3.1 Determinación de la longitud de onda óptima.

Para determinar las condiciones espectrofotométricas, se realizaron barridos con 3 diferentes medios; fosfatos pH 6.8, acetatos 4.6 y medio ácido HCl 1.2 M. A partir de la información mostrada en estos tres espectros se eligió el medio que será utilizado para los perfiles y la longitud de onda en la que se alcanza el máximo de absorción. La metodología utilizada fue la siguiente:

1. Pesar aproximadamente bien conocidos, en un porta muestras, 40 mg de esomeprazol estándar y transferirlos a un matraz volumétrico de 250 mL, llevar a la marca de aforo con solución búfer fosfatos pH 6.8.
2. De la solución anterior tomar una alícuota de 3 mL, y transferirla a un matraz volumétrico de 25 mL, llevarlo a la marca de aforo con solución búfer fosfatos pH 6.8.
3. Preparar la misma solución (19.2 $\mu\text{g/mL}$) empleando solución búfer de acetatos pH 4.6 y medio ácido HCl 1.2 M
4. Abrir la aplicación en el software del espectrofotómetro (El orden es encender primero el espectro y posteriormente la computadora) que nos permita realizar barridos, y correr para cada solución un barrido de 200 nm a 350 nm.

3.2 Perfil pH-Solubilidad

Para conocer la solubilidad del esomeprazol dentro del rango de pH fisiológico se siguió la metodología de agitación de matraces saturados en 5 diferentes medios tamponados: Ácido Clorhídrico (pH 1.2), búfer de acetatos (pH 4.5), búfer de fosfatos (pH 6.8), (pH 7.5) y (pH 11.3), con la siguiente metodología:

Preparación de Soluciones Estándares:

1. Verificar el pH de cada medio antes de la preparación de los estándares y de las muestras.
2. Pesar aproximadamente 25 mg de esomeprazol magnésico trihidratado estándar en un porta muestras y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL, llevarlo a la marca de aforo con Ácido Clorhídrico (pH 1.2) y realizar el mismo procedimiento con cada uno de los medios.
3. De la solución anterior, tomar una alícuota de 4 mL, y transferirla a un matraz volumétrico de 25 mL, llevarlo a la marca de aforo con el mismo medio.
4. Preparar una solución estándar para cada medio.
5. Leer en el espectrofotómetro cada solución a una longitud de onda de 300 nm.

A partir de las soluciones estándares se cuantificará la concentración de esomeprazol disuelta en cada una de las respectivas muestras.

Preparación de las muestras:

1. En vasos de precipitados con solución búfer adicionar una cantidad fija de esomeprazol (aproximadamente 30 mg) para asegurar la saturación del sistema. Realizar por triplicado.
2. Someter a agitación constante durante 24 horas a una temperatura de 37.5 °C.
3. Transcurrido el tiempo filtrar las soluciones utilizando filtros de microfibra de vidrio de 0.2 μm de tamaño de poro.
4. Medir el pH de cada solución.
5. Realizar las diluciones correspondientes y leer cada solución en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 300 nm. Cuantificar mediante el método de estándar externo.

3.3 Preparación de Curvas de calibración

3.3.1 Linealidad para el sistema espectrofotométrico.

Para poder cuantificar por medio de una técnica espectrofotométrica es necesario preparar cinco sistemas por triplicado para demostrar que la cuantificación es lineal en un rango de concentraciones establecido, esto es, demostrar la Ley de Lambert Beer. De esta manera comprobamos que la respuesta arrojada por el equipo se debe a la concentración de nuestro analito problema. También utilizada para la validación el Sistema.

1. Pesar aproximadamente 20 mg de esomeprazol estándar en un porta muestras, y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL, llevarlo a la marca de aforo con solución amortiguadora fosfatos pH 6.8
2. Preparar 5 sistemas por triplicado como se muestra en la Figura 16.

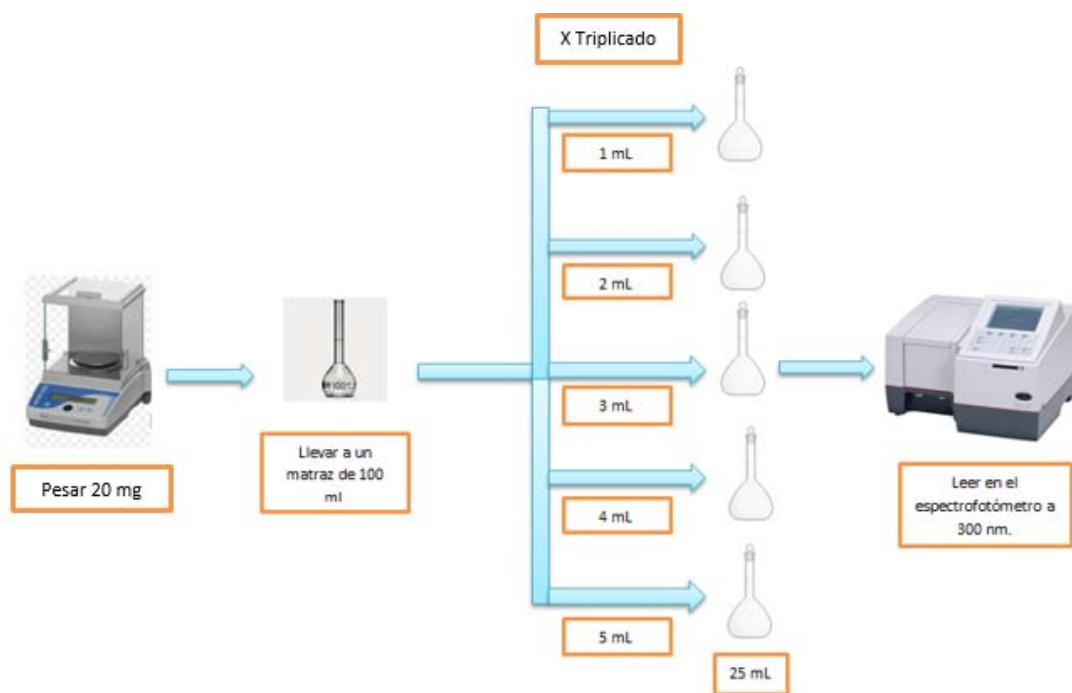


Figura 16. Preparación de la curva de calibración para la linealidad del sistema espectrofotométrico

Para poder confirmar la linealidad de nuestro sistema se hace en consideración una serie de parámetros estadísticos como lo marca la guía de validación de los QFB.^[44]

Tabla 9. Criterios de aceptación para la curva de calibración de la técnica espectrofotométrica.

Parámetro a evaluar	Especificación
Coefficiente de correlación (r)	r>0.99
Coefficiente de determinación (r²)	r>0.98
Valor del intercepto	igual a cero
Intervalo del intercepto	que este contenido dentro del intervalo
CV	< 2

3.3.2 Linealidad para el sistema cromatográfico.

Para cuantificar por medio de una técnica cromatográfica es necesario, de igual manera, construir una curva de calibración.

1. Pesar aproximadamente 50 mg de esomeprazol estándar en un porta muestras, y transferirlos a un matraz volumétrico de 200 mL, llevarlo a la marca de aforo con solución amortiguadora fosfatos pH 6.8
2. Preparar 11 sistemas por triplicado como se muestra en la siguiente figura:

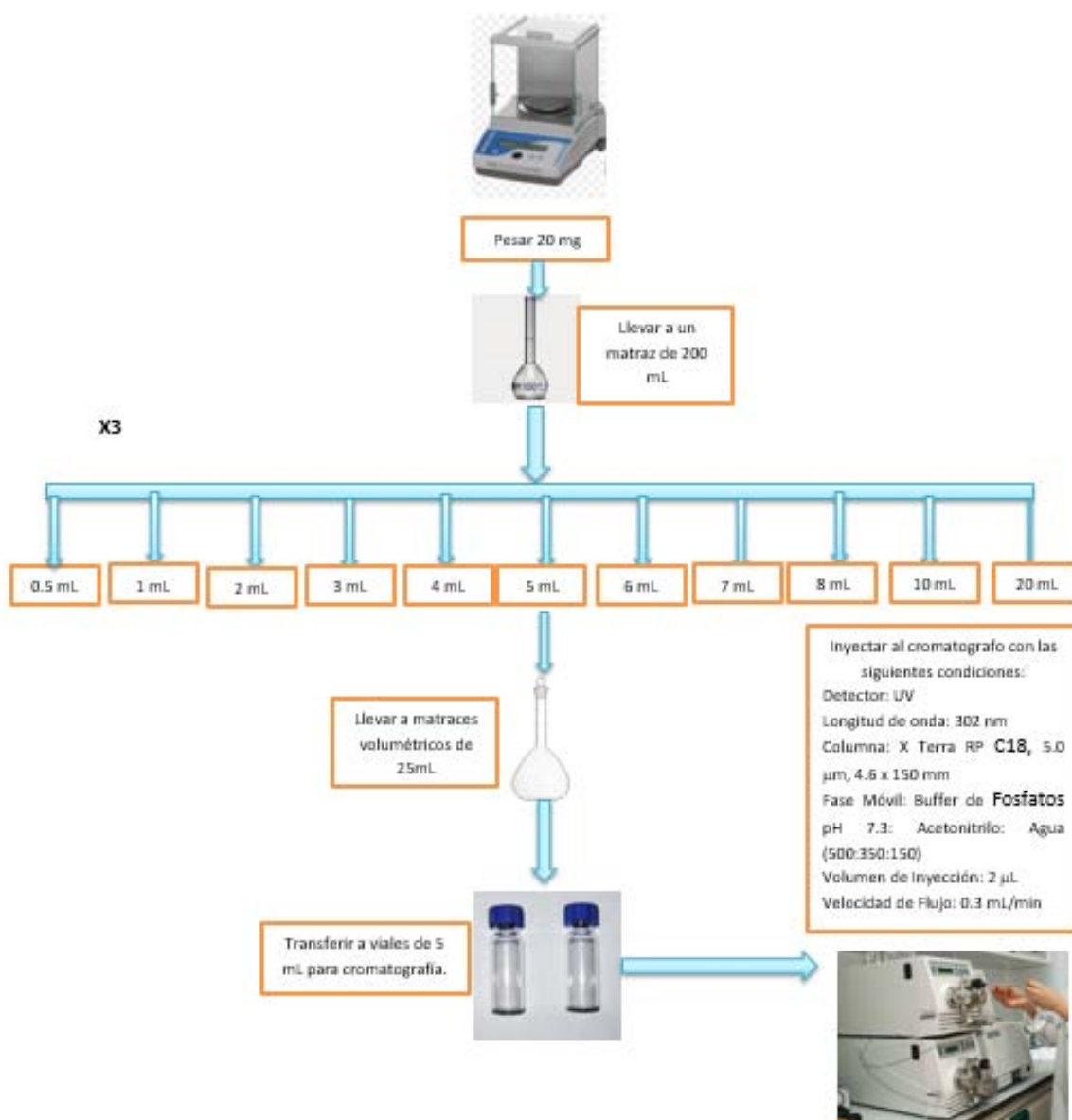


Figura 17.Preparación de la curva de calibración para la linealidad del sistema

Tabla 10. Criterios de aceptación para la curva de calibración de la técnica cromatográfica.

Parámetro a evaluar	Especificación
Coefficiente de correlación (r)	r>0.99
Coefficiente de determinación (r ²)	r>0.98
Valor del intercepto	igual a cero
Intervalo del intercepto	que este contenido dentro del intervalo
CV	< 2

3.4 Perfiles de Disolución.

Las condiciones fijas en las que deben realizarse los perfiles de disolución en el aparato IV USP se establecieron conforme a una serie de ensayos, con el fin de obtener un gráfico bien caracterizado, mostrados en la Tabla 11.

Tabla 11. Condiciones para perfiles de disolución de tabletas de referencias de esomeprazol

Aparato de Disolución	Aparato de Disolución IV USP Celda de Flujo Continuo Marca Sotax
Medio de Disolución	Búfer de Fosfatos pH 6.8
Temperatura del Medio	37 ±0.5 °C
Velocidad de Flujo	10 mL/min
Tipo de Flujo	Turbulento (sin perlas)
Sistema	Abierto
Tamaño de Celda	Grande (22.6 mm)
Volumen de muestra tomada	5 mL
Posición de la tableta	Vertical
Tiempos de muestreo	3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80 min

1. Prender el baño del aparato IV USP y colocar en cada una de las 6 celdas, la perla rubí y después las tabletas de referencia de esomeprazol, verticalmente. Colocar un filtro de microfibra de vidrio marca Whatman GF/D de 24 mm en la parte superior de la manguera.
2. Colocar las seis mangueras en el búfer de fosfatos pH 6.8, abrir la llave del agua para llenar el baño y prender la bomba previamente ajustada a 10 mL/min.
3. Tomar 5 mL en los siguientes tiempos: 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80 min, y medir el volumen acumulado en las probetas.
4. Leer en el espectrofotómetro e inyectar en el cromatógrafo cada una de las muestras, a las siguientes condiciones:

Tabla 12. Condiciones para cada una de las técnicas analíticas

Espectrofotómetro UV	UPLC
<ul style="list-style-type: none">Leer a una longitud de onda de 300 nm, con una celda de paso de onda de 1 cm.	Detector: UV Longitud de onda: 302 nm Columna: X Terra RP C18, 5.0 µm, 4.6 x 150 mm Fase Móvil: Búfer de Fosfatos pH 7.3: Acetonitrilo: Agua (500:350:150) Volumen de Inyección: 2 µL Velocidad de Flujo: 0.3 mL/min Temperatura Columna: 25°C Temperatura de automuestreador: 8°C Tiempo de retención: 4.0 ± 1 minutos Tiempo de corrida: 8 minutos.

- Realizar 6 perfiles de disolución de cada lote de tabletas.

Se graficó porcentaje disuelto no acumulado contra tiempo, porcentajes acumulados para cada tiempo de cada técnica analítica y se compararon los intervalos de confianza de T_{máx}, C_{máx} y ABC.

CAPITULO III.RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. Perfil pH-Solubilidad

Tabla 13. Valores promedio de solubilidad de esomeprazol a diferentes valores de pH (1.2 a 11.3)

Búfer	pH Inicial	pH Final	mg/mL	mg/100 mL
Ácido Clorhídrico	1.2	1.22	0.04 ± 0.0080	4.43 ± 0.3640
Acetatos	4.5	4.55	0.02 ± 0.0009	1.81 ± 0.1326
Fosfatos	6.81	6.88	0.01 ± 0.0029	1.32 ± 0.0414
Fosfatos	7.53	7.56	0.03 ± 0.0022	2.56 ± 0.1023
Fosfatos	11.31	11.33	0.04 ± 0.0322	4.92 ± 1.4680

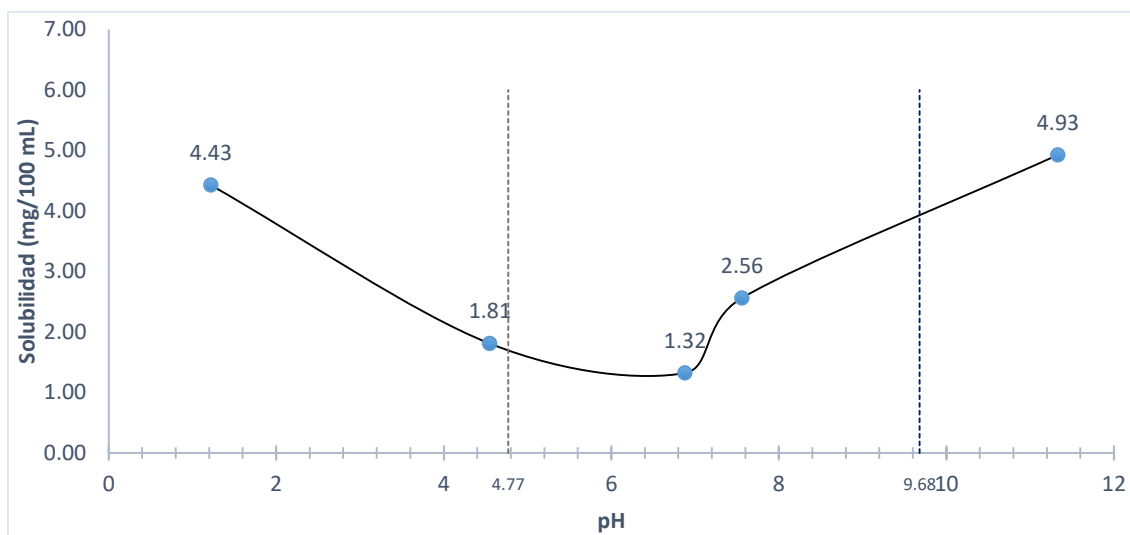


Figura 18. Perfil pH-Solubilidad de esomeprazol en 5 diferentes valores de pH.

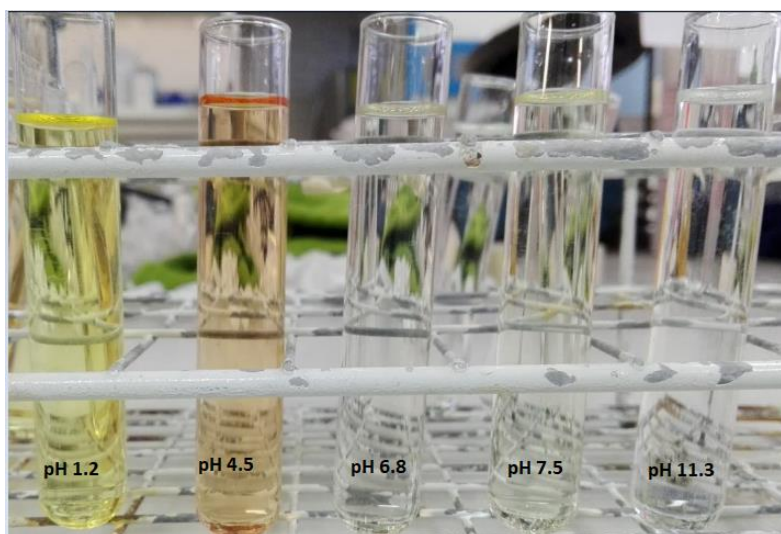


Figura 19. Tubos de ensaye adicionados con esomeprazol en 5 diferentes valores de pH.

En la tabla 13 y figura 18 observamos que la solubilidad experimental de esomeprazol es dependiente del pH, donde la solubilidad disminuye conforme aumenta el valor de pH, este comportamiento es observado en valores que se encuentren por debajo del valor de pH 6.8. A partir del pH 6.8 la solubilidad se ve en aumento conforme aumenta el valor de pH y alcanza el nivel más alto de solubilidad en el valor 11.3 de pH. Este comportamiento experimental es diferente al comportamiento teórico que debería tener una base débil, como lo es estructuralmente el esomeprazol.

El comportamiento teórico se explica mediante la construcción de un diagrama de distribución de especies en función del pH para la molécula de esomeprazol, en donde se observa que la especie no ionizada [H_2B] predomina en un rango de pH de 0 a 4.77 (pKa1), después la especie pierde un hidrógeno y da lugar a que la especie ionizada [HB^+], que es la especie más soluble, predomine en valores de pH de 4.77 a 9.68 (pKa2). La especie no ionizada y por lo tanto menos soluble [B] predomina en valores de pH por arriba de 9.68.

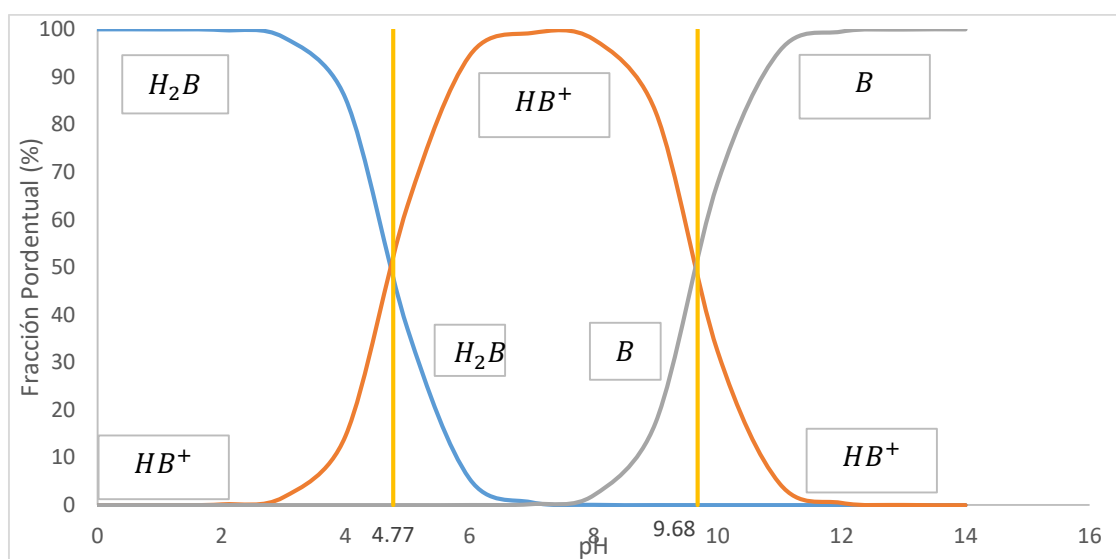


Figura 20. Diagrama de distribución de especies de esomeprazol dependiente de pH.

Esto quiere decir que teóricamente, al ser una base débil, debería ser poco soluble en valores bajos de pH, ser altamente soluble en valores intermedios y ser poco soluble en valores básicos, hecho que no observamos en los resultados experimentales de la figura 18. Sin embargo, es importante destacar que en las soluciones de pH de 1.2 y 4.5 (Figura 19) se observó un cambio de coloración a color amarillo y naranjado, respectivamente. Lo cual está relacionado con la inestabilidad del esomeprazol

magnésico trihidratado cuando se trabaja en estos valores de pH, como lo señala la literatura, y por lo tanto no se puede garantizar que el aumento de solubilidad sea por el esomeprazol o por algún compuesto de descomposición. En cambio, cuando se trabaja en valores mayores a 6.8 las soluciones se observan transparentes, por lo que decidió trabajarse en un pH alcalino, específicamente pH 6.8, como lo marca la USP y la FEUM. Las directrices no aconsejan el uso de valores de pH por arriba de 8 a menos que sean justificados.

Además que, en la forma farmacéutica el principio activo se encuentra en forma de *MUPS* con una capa gastrorresistente, debido a que su sitio de absorción es el intestino y suelen predominar pH alcalinos. Las siglas MUPS (Multi Unit Pellets System) hacen referencia a una forma farmacéutica tipo cápsula compuesta por gránulos con una cubierta entérica extremadamente pequeña (pellets) dentro de un recubrimiento externo que puede ser una cápsula de gelatina dura. El recubrimiento entérico protege el principio activo de la inactivación que sufre el esomeprazol en el medio ácido del estómago ^[45].

2. Determinación de la longitud de onda óptima.

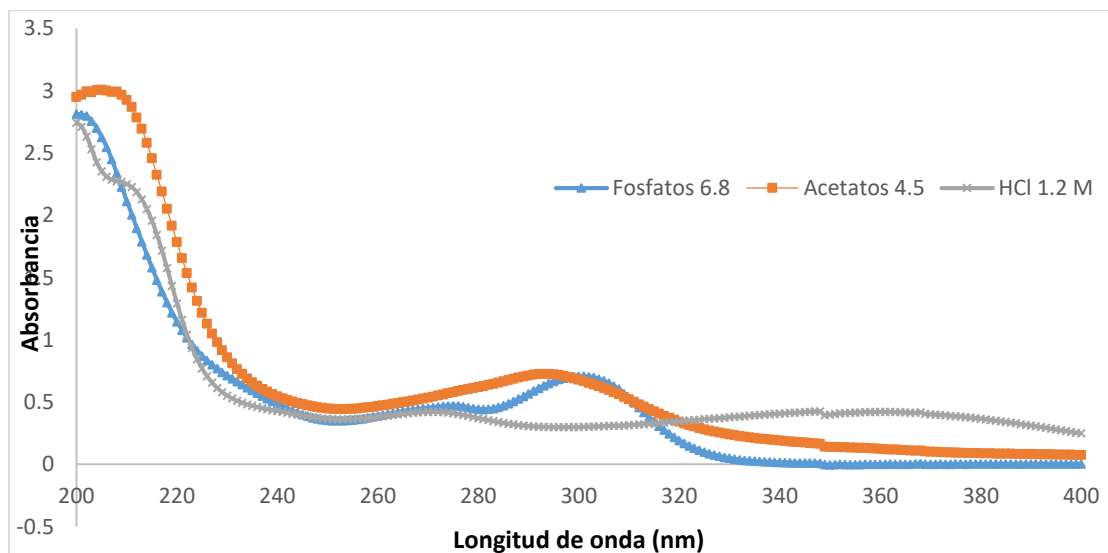


Figura 21. Espectros de absorción de esomeprazol en tres diferentes medios: Fosfatos 6.8, Acetatos 4.5 y ácido clorhídrico 1.2 M en una concentración de 18.6 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 14. Longitudes de onda y máximos de absorbanza de esomeprazol en tres diferentes medios a una concentración de 18.6 $\mu\text{g/mL}$.

Medio	Longitud de onda (nm)	Máximo de absorbanza
Búfer Fosfatos 6.8	300	0.7073
Búfer Acetatos 4.5	293	0.7269
Ácido Clorhídrico 1.2 M	348	0.4256

Se observa en la Figura 21 que para cada uno de los espectros existen dos longitudes de onda máximos, sin embargo, aquellos máximos de absorbanza que se encuentran cerca de 200 nm, no son tomados en cuenta debido a que esta región forma parte del ultravioleta vacío o del ultravioleta del cuarzo, región que es poco utilizada por la dificultad que se presenta para la obtención de los espectros y proporciona poca información relacionada con la estructura de las moléculas.^[31]

Observamos que se presentan algunas diferencias entre los espectros de adsorción del esomeprazol en una concentración de 18.6 $\mu\text{g/mL}$ en los tres medios utilizados. El máximo de absorción en búfer de fosfatos se presenta a 300 nm, cercana a la longitud de onda para el máximo de absorción en el búfer de acetatos que fue de 293, estos dos espectros presentan un comportamiento parecido, mientras que en ácido clorhídrico 1.2 M el espectro es diferente y el máximo de absorbanza se presenta a una longitud muy diferente que en fosfatos 6.8 y acetatos 4.5. Estas diferencias pueden presentarse debido a que el esomeprazol reacciona con los ácidos formándose compuestos diferentes que afectan el espectro, y por ende el máximo de longitud de onda cambia, como se observó en el perfil de pH-Solubilidad. Así mismo, al no haber diferencias entre los barridos en acetatos 4.5 y fosfatos 6.8, se decidió trabajar con este último ya que solubiliza mejor el esomeprazol y lo mantiene estable.

3.Preparación de las curvas de calibración.

3.1 Linealidad para la técnica espectrofotométrica.

Tabla 15.Respuestas analíticas y parámetros estadísticos para la curva de calibración espectrofotométrica.

Concentración (µg/ML)	Respuesta Analítica (absorbancia)		
	C1	C2	C3
8.0272	0.3010	0.302	0.3009
16.0545	0.6003	0.5913	0.6021
24.0817	0.8963	0.8992	0.8979
32.1089	1.1913	1.1974	1.1981
40.1361	1.4927	1.4915	1.4947
Promedio	0.0373	b	0.0025
DESVEST	0.0000	m	0.0371
%CV	0.3720	r2	0.9999

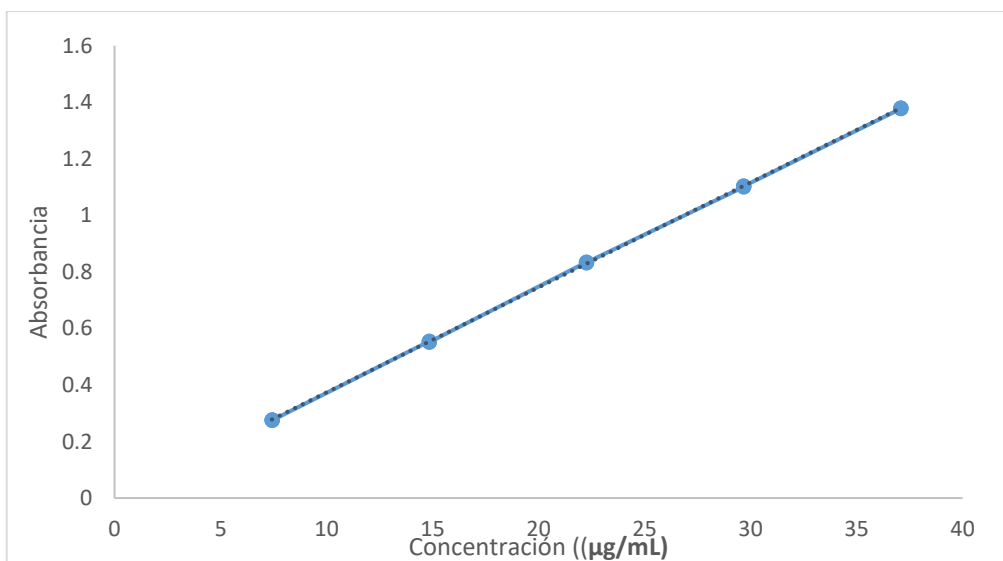


Figura 22.Curva de calibración para el sistema espectrofotométrico.

Tabla 16. Criterios de aceptación y valores obtenidos para la linealidad del sistema espectrofotométrico.

Parámetro a evaluar	Valor obtenido	Especificación
Coefficiente de correlación (r)	0.9999	$r > 0.99$
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9999	$r^2 > 0.98$
Valor del intercepto	0.0025	Igual a cero
Intervalo del intercepto	De -0.0011 a 0.0066	Que el valor este contenido dentro del intervalo
CV	0.3720	< 2

La linealidad debe comprobarse en todo el rango de concentraciones esperadas durante el procedimiento. Se observa que para la curva de calibración espectrofotométrica construida por 5 sistemas que van de 8.0272 a 40.1361 $\mu\text{g/mL}$, la respuesta que se obtiene del equipo es directamente proporcional a la concentración de la muestra. Esto comprobado por un ajuste lineal donde se obtuvo un coeficiente de correlación (r) de 0.9999 y un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9999. Estos coeficientes miden la proximidad del ajuste de la ecuación de regresión de la muestra a los valores observados de "Y" es decir, de la respuesta analítica.

El valor del intercepto fue de 0.0025 que se encuentra dentro del intervalo de -0.0011 a 0.0066. El coeficiente de variación obtenido fue menor al 2% como lo marca la guía de validación de los QFB ^[44].

3.2 Linealidad para la técnica cromatografía.

Tabla 17. Respuestas analíticas para la curva de calibración del sistema cromatográfico.

Concentración. (µg/mL)	Respuesta analítica (área)		
	CC-1	CC-2	CC-3
9.2286	136636	136709	138964
18.4573	279429	272582	270450
27.6859	404022	405408	398003
36.9146	548653	546206	540617
46.1433	687195	679008	667982
55.3719	823345	819545	811173
64.6006	968961	954730	939932
73.8292	1089544	1089990	1087247
92.2866	1383665	1361240	1358261
184.5732	2750771	2731339	-----
DESVEST	169.6471	b	-2172.7
PROMEDIO	14762.734	m	14807
CV	1.15	r2	0.9996

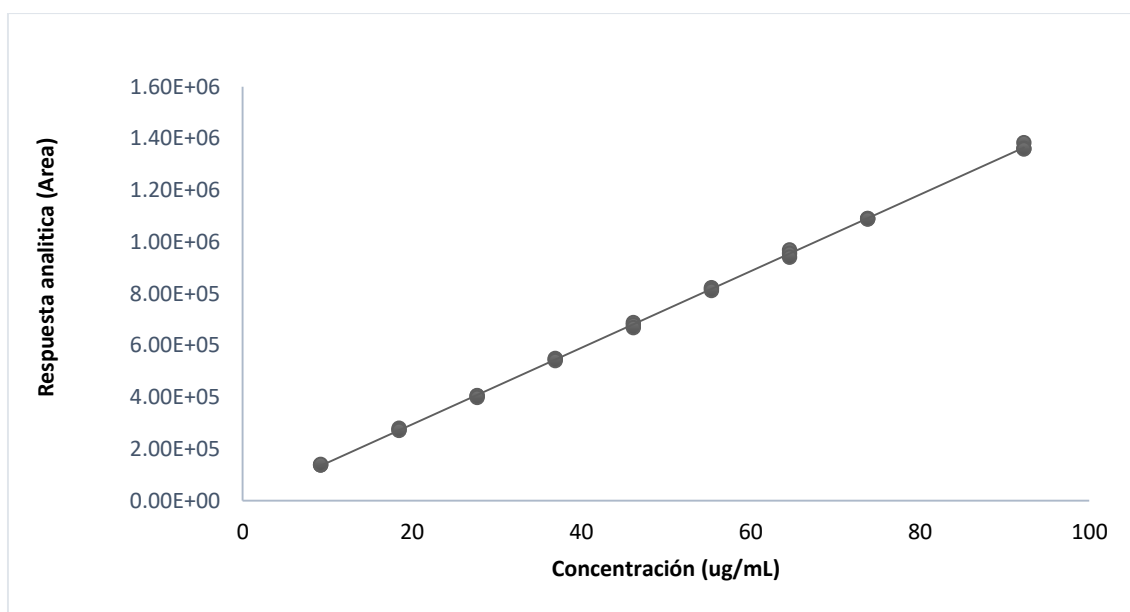


Figura 23. Curva de calibración para el sistema cromatográfico.

Tabla 18. Criterios de aceptación y valores obtenidos para la linealidad del sistema cromatográfico.

Parámetro a evaluar	Valor obtenido	Especificación
Coefficiente de correlación (r)	0.9998	r>0.99
Coefficiente de determinación (r²)	0.9996	r>0.98
Valor del intercepto	-2172.682	igual a cero
Intervalo del intercepto	De -8408.79 a 4063.42	Que este contenido dentro del intervalo
CV	1.15	< 2

De igual forma se comprobó la linealidad en un rango de concentraciones que va de 9.2287 a 184.5732 µg/mL, comprobado por los coeficientes de correlación y determinación obtenidos siendo 0.9998 y 0.9996 respectivamente. El valor del intercepto es -2172.682 que pasa por los intervalos -8408.79 a 4063.42. Y el coeficiente de variación obtenido fue de 1.15 que es menor a 2 y por lo tanto es aceptable para un método cromatográfico.

3.3 Comparación de porcentaje de Recobro entre los métodos.

Debido a la gran diferencia de magnitud que existen entre las respuestas analíticas de ambos métodos analíticos (absorbancia y área para espectrofotometría y cromatografía, respectivamente) no es posible realizar una comparación de intervalos de confianza de las pendientes de la linealidad. Por lo que se llevó a cabo una comparación de intervalos de confianza de las pendientes de los porcentajes de recobro para cada técnica.

Tabla 19. Intervalos de confianza de los porcentajes de recuperación para cada técnica analítica (Nivel de significancia 0.5)

% de Recobro	UV	HPLC
LCS	100.2329	100.7173
LCI	99.7779	99.6738
Promedio	100.0054	100.1955

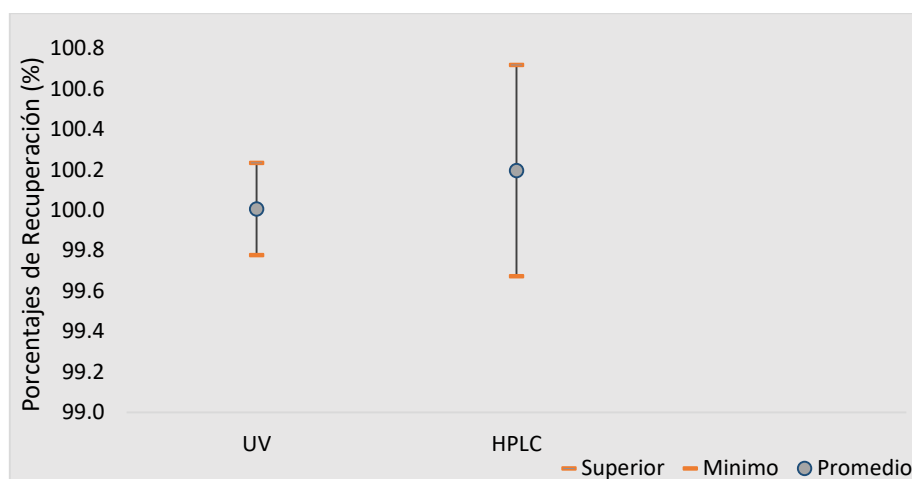


Figura 24. Gráfico de Intervalos de confianza de los porcentajes de recuperación para cada técnica analítica (Nivel de Significancia 0.5)

En la figura 23 se puede observar que los intervalos se traslapan por completo y por lo tanto no existen diferencias significativas en los porcentajes de recuperación para cada técnica analítica.

4.Perfiles de Disolución.

4.1 Perfiles No Acumulativos

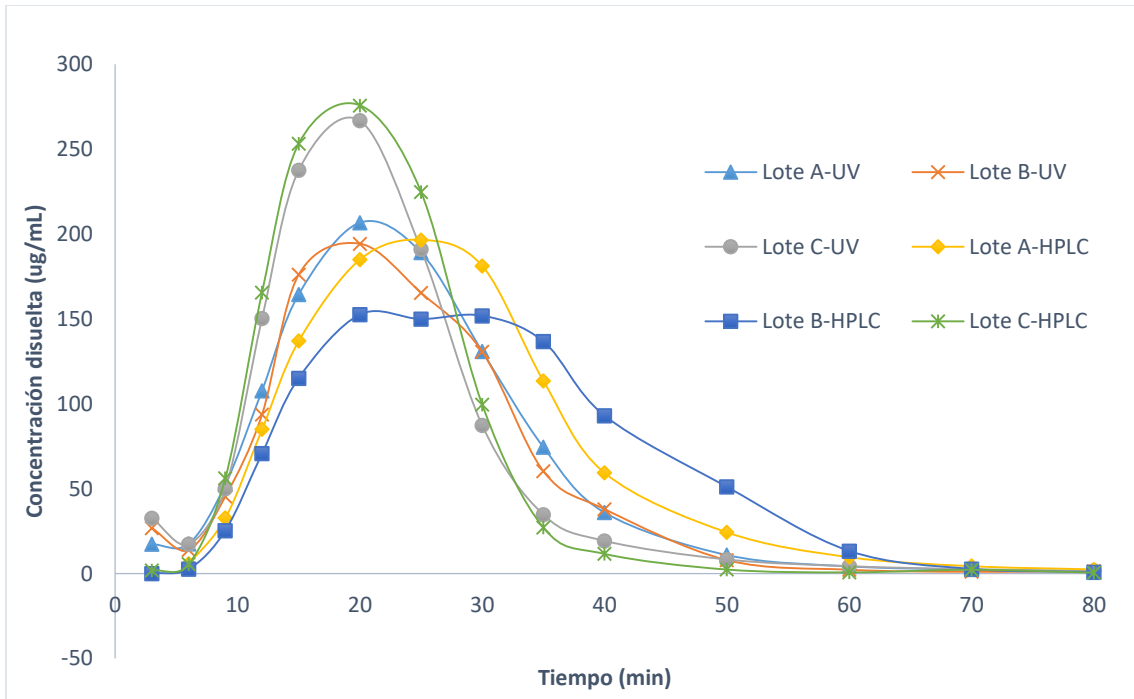


Figura 25. Perfiles de Disolución no acumulativos promedio de cada lote A, B y C de tabletas de esomeprazol por cada técnica analítica.

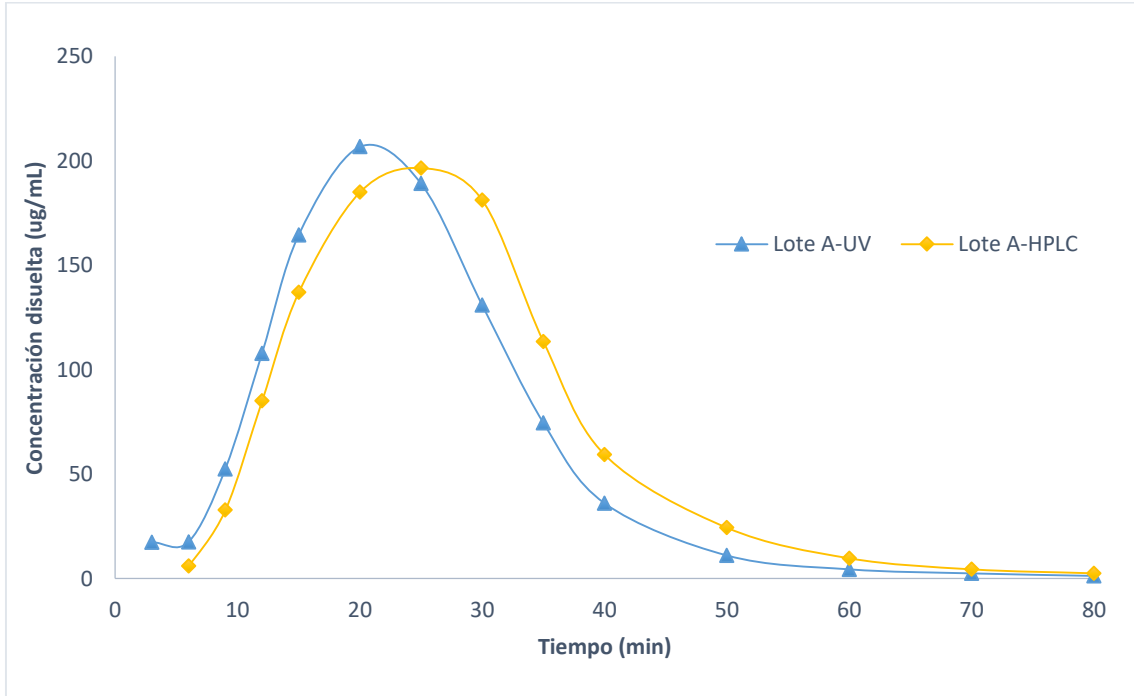


Figura 26. Perfiles de Disolución no acumulativos promedio de tabletas de esomeprazol Lote A para cada técnica analítica.

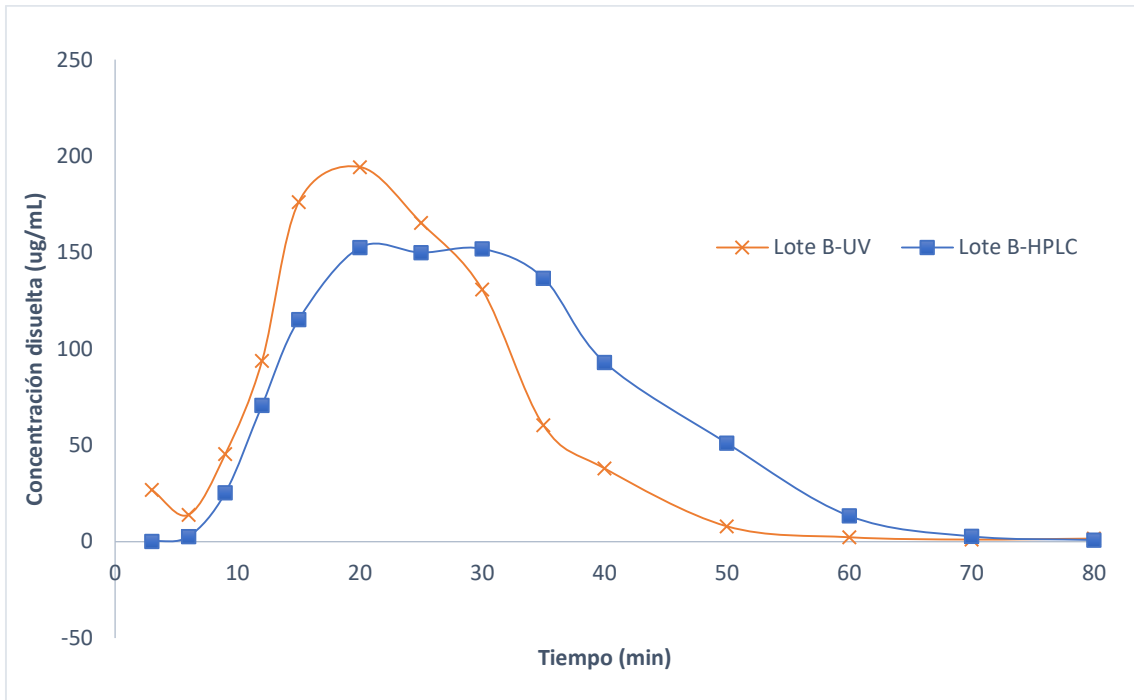


Figura 27. Perfiles de Disolución no acumulativos promedio de tabletas de esomeprazol Lote B para cada técnica analítica.

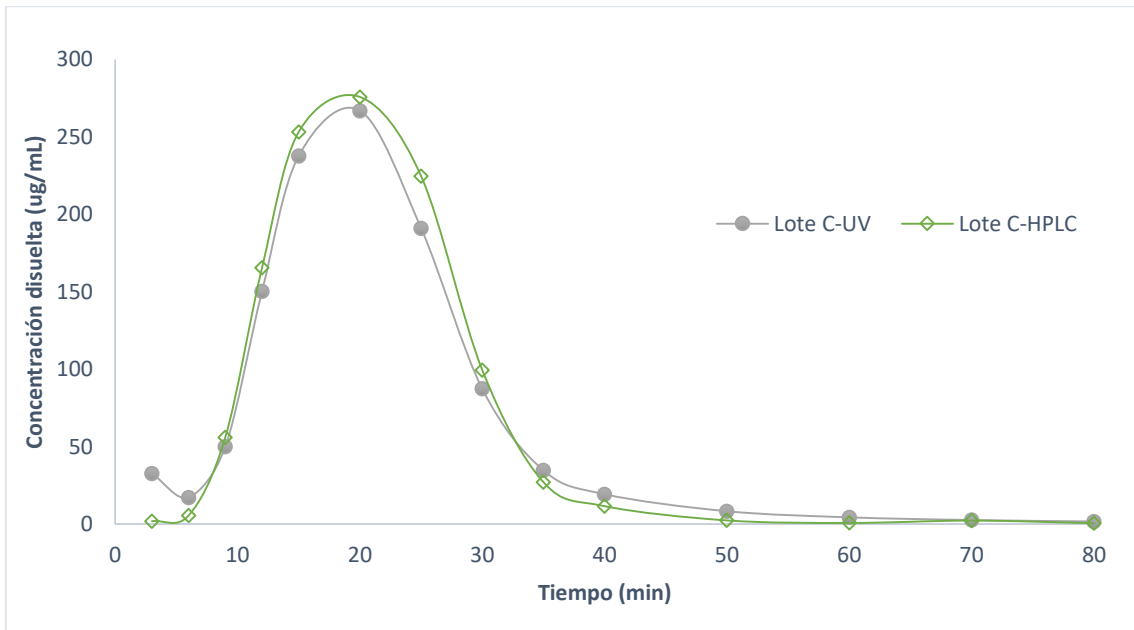


Figura 28. Perfiles de Disolución no acumulativos promedio de tabletas de esomeprazol Lote C para cada técnica analítica.

Se puede observar en la figura 25 los perfiles de disolución promedio de cada lote obtenidos por las técnicas espectrofotométrica y cromatográfica, que son característicos de perfiles obtenidos por el aparato IV USP ya que tienen similitud con los perfiles plasmáticos que se obtienen durante los estudios clínicos de biodisponibilidad en seres humanos. Puede observarse que existen diferencias entre lotes, lo cual significa que las condiciones de disolución en las que son sometidas las tabletas de esomeprazol son capaces de diferenciar un lote del otro. La diferencia de disolución entre lotes se da principalmente por los pequeños cambios que llegan a ocurrir durante el proceso de fabricación.

En los gráficos 26, 27 y 28 se observa de mejor manera la comparación entre los lotes para las dos técnicas analíticas. Para el lote A se observa una diferencia entre la $C_{máx}$ y la $T_{máx}$, sin embargo, los comportamientos en los perfiles son muy similares, para el lote B los perfiles son notoriamente diferentes y no tienen la misma tendencia como sucede con el lote A y para el lote C las diferencias son mínimas y los datos tienen la misma tendencia. Para decidir si existen diferencias significativas de los lotes entre ambas técnicas, se realizó un análisis mediante intervalos de confianza de los parámetros cinéticos que caracterizan estos perfiles.

4.2 Perfiles Acumulativos

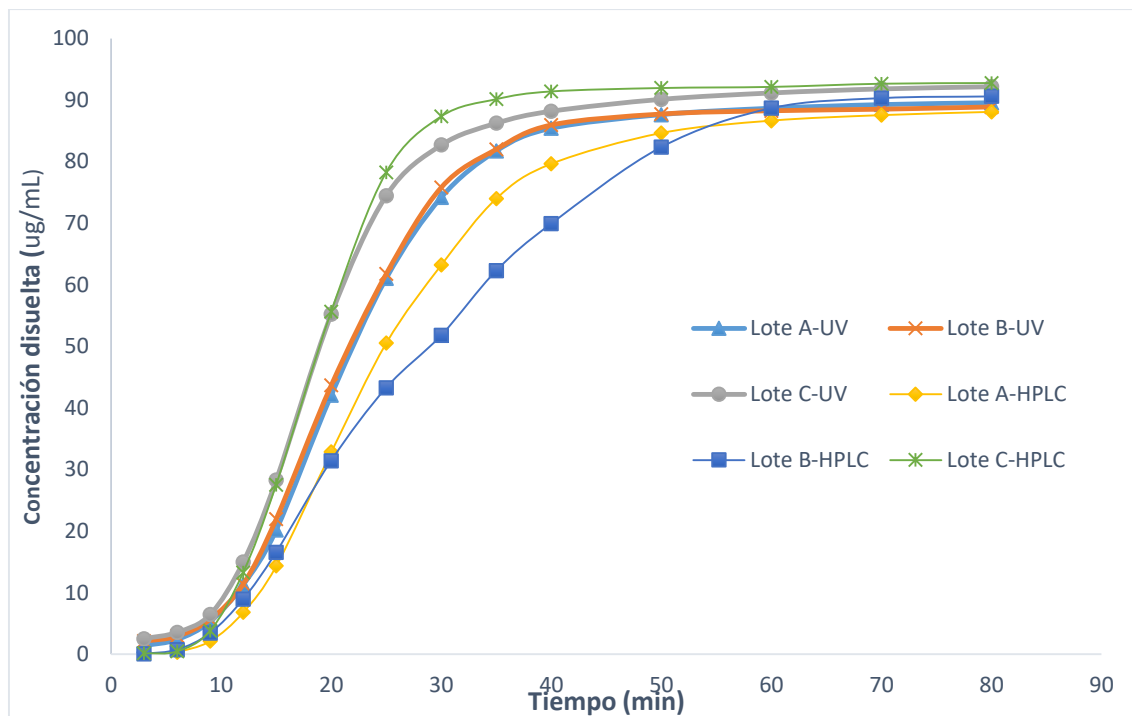


Figura 29. Porcentajes disueltos promedio de esomeprazol contra tiempo de los lotes A, B y C obtenidos por las técnicas espectrofotométrica y cromatográfica.

En la Figura 29 se observan los perfiles acumulativos de cada ensayo obtenidos por ambas técnicas, donde se observa la curva ascendente y la meseta definidas para el lote C cuantificadas por ambas técnicas, y donde para el minuto 30 más del 80% se ha disuelto, como lo marca la USP (Q) 75% al menos en 30 min. En el lote B la curva ascendente es mejor caracterizada cuando las muestras se cuantifican por la técnica espectrofotométrica, y se obtiene una Q por arriba del 75%, cuando las muestras son cuantificadas mediante la técnica cromatográfica el Q es de un poco más del 50%, por lo que se considera que no entra dentro de las especificaciones. Lo mismo ocurre para el lote A, utilizando la técnica espectrofotométrica el Q es más del 75% pero utilizando la técnica cromatográfica queda por debajo.

Esto puede deberse a varios factores, sin embargo, debido a que los perfiles de disolución se realizaron uno tras otro, el tiempo que duran las muestras antes de ser cuantificadas por cromatografía, es mucho más prolongado, a comparación por UV, donde las muestras se leen casi inmediatamente, podría estar relacionado con la estabilidad de la molécula. A pesar de que el método cromatográfico es sensible también es específico, por lo cual es capaz de distinguir los productos de degradación y/o los excipientes de la formulación, a diferencia del método espectrofotométrico que

es menos específico y puede ocurrir un tipo de interferencia que absorba a la misma longitud de onda que la molécula de interés, como podría ser un producto de degradación.

En el ANEXO 1 se explican los cálculos realizados para obtener los perfiles de disolución acumulativos.

4.3 Ajuste a modelo cinético

Mediante el programa DDSolver de Excel Microsoft se obtuvo el modelo cinético al cual se ajustan de mejor manera los datos de cantidades disueltas en cada tiempo de muestreo tanto para la técnica cromatográfica, como para la técnica espectrofotométrica. Obteniéndose que se ajustan a los modelos de cinética de orden uno, al tener un coeficiente de correlación de **0.9908** para la técnica cromatográfica y **0.9925** para la técnica espectrofotométrica.

DD Solver 1.0		Dissolution Data Modeling of First-order Model	
Time Unit	min	Analyst	hp
Model	First-order	Date	yyyy-5-14
Equation	$F=100*[1-Exp(-k_1*t)]$	Time	13:28:50

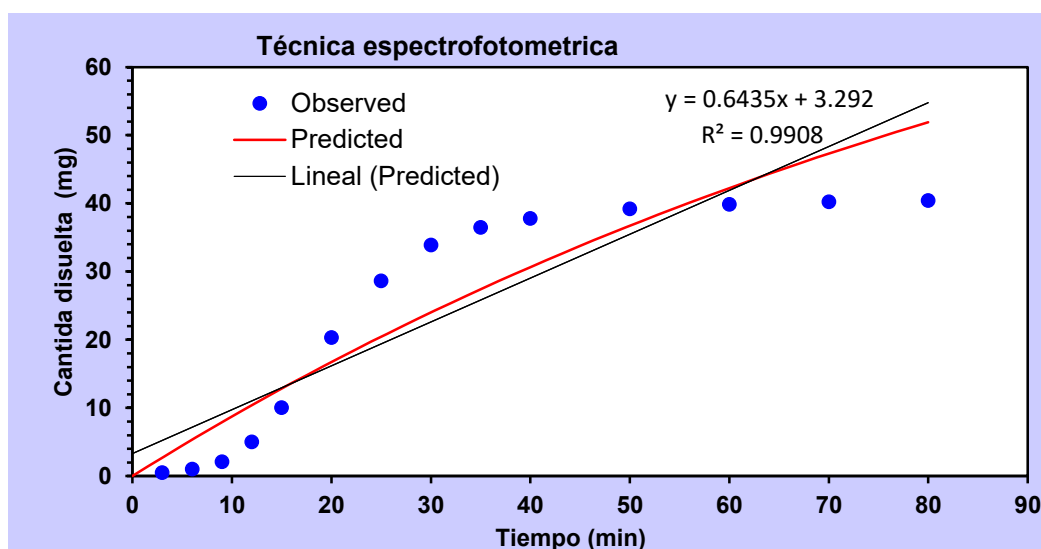


Figura 30. Recta de regresión obtenida con el modelo cinético de orden uno para la técnica espectrofotométrica.

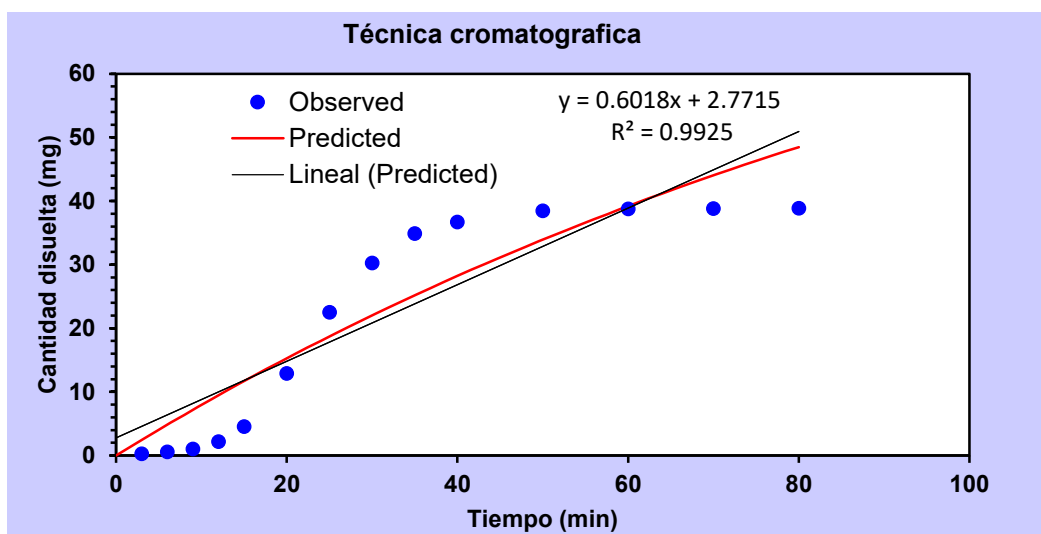


Figura 31. Recta de regresión obtenida con el modelo cinético de orden uno para la técnica cromatográfica.

El proceso de orden uno es un modelo matemático que considera que la superficie del sólido es variable y es aplicable a la mayoría de los casos. En este caso la superficie es directamente proporcional a la cantidad remanente ($Q_{\infty} - Q$) del fármaco en la forma farmacéutica, es decir $S=K * (Q_{\infty} - Q)$. De acuerdo con esta asunción, la ecuación puede escribirse:

$$\frac{d(Q_{\infty} - Q)}{dt} = -K_d(Q_{\infty} - Q)$$

La integral de la ecuación diferencial, si se considera el período de latencia (t_0) es la siguiente expresión:

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

Esta ecuación es una recta cuya inclinación, en valor absoluto, equivale a la constante que rige la velocidad del proceso. ^[11] Por lo que las ecuaciones quedarían:

Espectrofotometría	Cromatografía
$\ln(Q_{\infty} - Q) = -0.6435x + 3.92$	$\ln(Q_{\infty} - Q) = -0.6018x + 2.7715$

Donde se observa que las constantes de velocidad son muy parecidas de 0.6435 y 0.6018 para las técnicas espectrofotométrica y cromatográfica, respectivamente.

5.Parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos obtenidos de las curvas de concentración plasmática-tiempo en los estudios de biodisponibilidad en humanos se utilizan para conocer la velocidad y magnitud de la absorción. Los perfiles que se obtienen utilizando el equipo IV USP de disolución son similares a estas curvas plasmáticas, debido a que, en este se simulan mejor las condiciones fisiológicas manteniéndose las condiciones *sink*. De tal manera que a partir de los perfiles que se obtuvieron en este estudio, se pueden comparar algunos parámetros cinéticos para comprobar que no existen diferencias cinéticas entre los perfiles que se obtuvieron por ambas técnicas utilizadas.

5.1 Concentración Máxima

En los estudios de disolución, la concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$) representa la concentración disuelta más alta alcanzada por el fármaco durante el estudio de disolución. En una curva plasmática la concentración máxima está relacionada con la velocidad de absorción, así como con la cantidad de fármaco adsorbido. La concentración máxima proporciona información acerca de la posibilidad de alcanzar niveles tóxicos de fármaco ^[2].

En un estudio de disolución *In vitro* el valor de $C_{m\acute{a}x}$ se refiere a la concentración máxima disuelta durante el proceso y se determina directamente de la gráfica de concentración disuelta vs tiempo y como su nombre lo indica, las unidades que la representan son unidades de concentración ($\mu\text{g/mL}$).

Tabla 20. Intervalos de confianza de las medias de concentración máxima observadas en los lotes A, B y C por espectrofotometría y cromatografía. (Nivel de significancia 0.5)

C _{máx}	Lote A		Lote B		Lote C	
	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC
LCS	228.0771	246.6033	230.7093	243.4452	304.1985	309.9887
Promedio	215.7897	217.9136	216.5672	197.9792	266.8663	275.7915
LSI	203.5023	189.2239	202.4252	152.5132	229.5340	241.5943

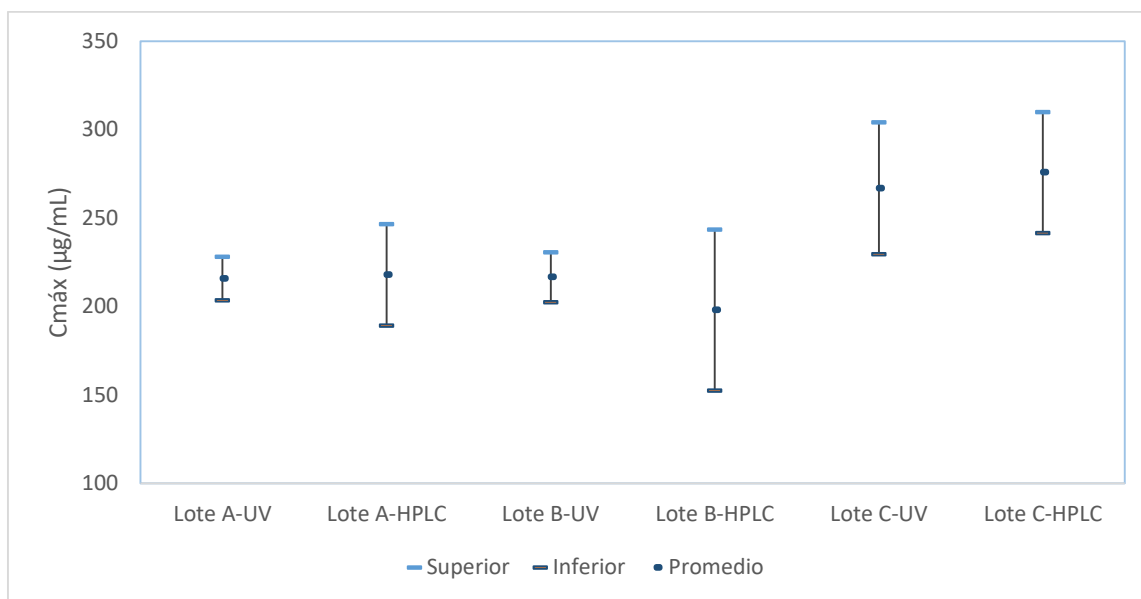


Figura 32. Gráfico de comparación de los intervalos de confianza de las medias de concentración máxima observados en los lotes A, B y C por espectrofotometría y cromatografía. (Nivel de significancia 0.5)

En la figura 32 se puede observar, para el caso del Lote A, que no hay diferencias significativas en cuanto a la C_{máx} cuando las muestras se cuantifican mediante una técnica espectrofotométrica como cromatográfica, debido que existe un traslape entre los intervalos de confianza.

De igual manera los intervalos de confianza de C_{máx} por cada técnica para el lote B se traslapan y no existen diferencias significativas.

Los intervalos de confianza del Lote C-UV y HPLC se traslapan casi por completo, por lo que no hay diferencias significativas.

Los intervalos de confianza para la técnica cromatográfica son más estrechos que los obtenidos por la técnica espectrofotométrica, esto quiere decir, que existe más variabilidad en los resultados obtenidos por HPLC que por UV, aun cuando la técnica es más específica y sensible, sin embargo, tales características permiten al método analítico cromatográfico detectar los errores experimentales, aumentando así, la variabilidad de los resultados.

Se realizó un análisis de varianza Anova de un solo factor, ya que está diseñado para construir un modelo estadístico que describe el impacto de un solo factor categórico (X=Técnica Analítica) en una variable dependiente (Y=C_{máx}). Es una prueba para determinar si hay diferencias significativas entre medias, varianzas y/o medianas de Y a diferentes niveles de X. Se realizó con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 21. Valores-P de la prueba-F (Anova de un solo factor) de Concentración máxima a dos diferentes métodos analíticos.

UV	HPLC		
	Lote A	Lote B	Lote C
Lote A	0.8763	---	---
Lote B	---	0.3812	---
Lote C	---	---	0.6878

Anova descompone la varianza de $C_{m\acute{a}x}$ en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Si el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de $C_{m\acute{a}x}$ entre un nivel de Método y otro, en el caso en que el valor-P fuera mayor o igual a 0.05 no existen diferencias estadísticamente significativas, con un nivel del 95.0% de confianza.

En la tabla 22 observamos nuevamente que no existen diferencias significativas cuando un mismo lote es cuantificado por dos diferentes técnicas cromatográfica o espectrofotométrica, ya que los valores-P son mayores o iguales a 0.05.

5.2 Tiempo Máximo

En los estudios de disolución, la $T_{m\acute{a}x}$ es el tiempo en el que se obtiene la concentración máxima disuelta de fármaco y no es considerado como parámetro crítico. Las unidades de $T_{m\acute{a}x}$ son unidades de tiempo (min) ^[2,15].

Tabla 22. Intervalos de confianza de las medias de tiempo máximo observados en los lotes A, B y C por espectrofotometría y cromatografía. (Nivel de significancia 0.5)

T _{máx}	Lote A		Lote B		Lote C	
	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC
LCS	22.9755	29.2843	25.9923	32.2518	20	20
Promedio	20.8333	25.0000	20.8333	23.3333	20	20
LSI	18.6912	20.7157	15.6743	14.4148	20	20

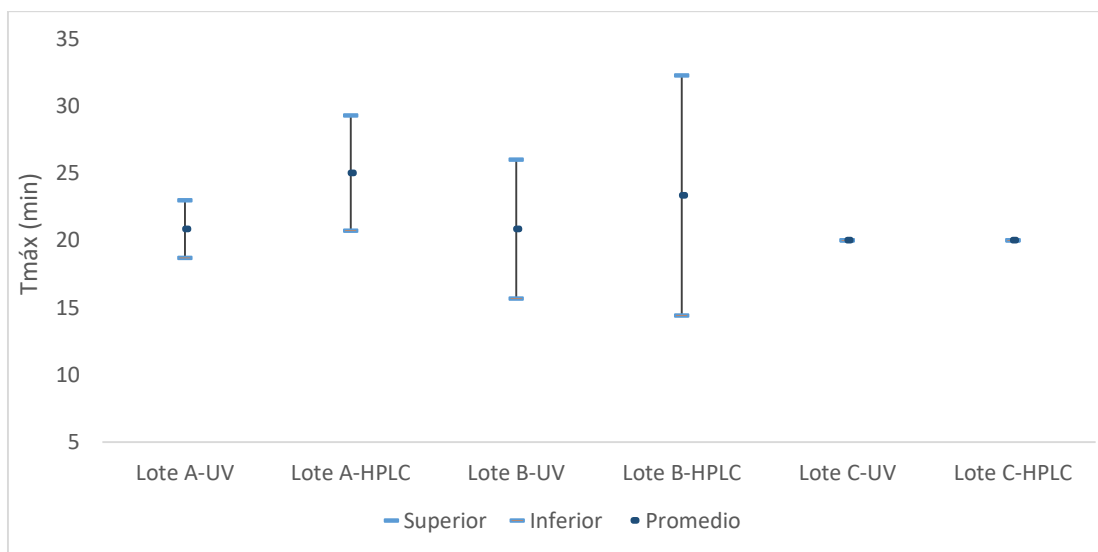


Figura 33. Gráfico de comparación de los intervalos de confianza de las medias de tiempo máximo observados en los lotes A, B y C por espectrofotometría y cromatografía. (Nivel de significancia 0.5)

En la Figura 33 se puede observar que los intervalos de confianza de las medias de tiempo máximo se traslapan cuando se comparan las técnicas cromatográfica y espectrofotométrica para cada lote, lo que significa que no existen diferencias significativas entre las técnicas.

Tabla 23. Valores-P de la prueba-F (Anova de un solo factor) de Tiempo máximo a dos diferentes métodos analíticos y lotes.

UV	HPLC		
	Lote A	Lote B	Lote C
Lote A	0.0646	---	---
Lote B	---	0.5737	---
Lote C	---	---	-

El análisis Anova de un solo factor, como lo muestra la tabla 24, muestra los mismos resultados, cuyos valores-P mayores o iguales a 0.05 muestran que no existen diferencias significativas entre las técnicas analíticas. Debido a que los datos de tiempo máximo para el lote C tanto para HPLC como UV son los mismos, el análisis Anova no puede realizarse.

5.3 AREA BAJO LA CURVA:

En una curva plasmática el área bajo la curva de concentración se relaciona con la cantidad total del fármaco absorbida hasta la circulación sistémica tras la administración de una dosis única y a menudo se expresa como ABC. En los estudios de disolución, sirve para relacionar la cantidad total del fármaco que fue disuelta, entre mayor sea el ABC mayor será la cantidad de fármaco disuelto. El área bajo la curva se puede determinar por un método de integración numérica como el área de los trapezoides. Las unidades del área bajo la curva son concentración x tiempo ($\mu\text{g/mL}$). [2,15]

5.3.1 Área bajo la curva de 0 a t de esomeprazol disuelto, obtenido por cada técnica analítica.

ABC₀^t

Tabla 24. Intervalos de confianza de las medias de las áreas bajo la curva desde el tiempo cero al último tiempo de muestreo observados en los lotes A, B por espectrofotometría y cromatografía. (Nivel de significancia 0.5)

ABC ₀ ^t	Lote A		Lote B		Lote C	
	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC
LCS	5061.6644	5891.2483	4923.4121	6229.8743	5426.9244	5739.0465
Promedio	4704.7167	5145.3648	3860.4291	4191.2061	4391.4024	4228.7251
LSI	4347.7689	4399.4813	4391.9206	5210.5402	4909.1634	4983.8858



Figura 34. Gráfico de comparación de los intervalos de confianza de las medias de las áreas bajo la curva desde el tiempo cero al último tiempo de muestreo observados en los lotes A, B Y C por espectrofotometría y cromatografía. (Nivel de significancia 0.5)

En la figura 34 se observa que los intervalos de confianza para las áreas bajo la curva del tiempo 0 al t se traslapan en todos los casos, cuando comparamos entre las técnicas UV y HPLC para cada lote. Lo que significa que no hay diferencias significativas para este parámetro cinético. Los perfiles entre ambas técnicas presentan la misma cantidad de fármaco disuelto desde el tiempo cero hasta el último tiempo de muestreo.

Tabla 25. Valores-P de la prueba-F (Anova de un solo factor) de Área bajo la curva de 0 a t a dos diferentes métodos analíticos y lotes.

UV	HPLC		
	Lote A	Lote B	Lote C
Lote A	0.2396	---	---
Lote B	---	0.1257	---
Lote C	---	---	0.852

Cuando los datos se someten a un análisis Anova se puede observar que se obtienen los mismos resultados, como lo muestra la tabla 26 donde todos los valores-p son mayores a 0.05 y por lo tanto no existen diferencias significativas.

5.3.2 Área bajo la curva de 0 a $C_{máx}$ de esomeprazol disuelto, obtenido por cada técnica analítica.

$ABC_0^{Tmáx}$

Tabla 26. Intervalos de confianza de las medias de las áreas bajo la curva desde el tiempo cero al tiempo máximo observados en los lotes A, B por espectrofotometría y cromatografía. (Nivel de significancia 0.5)

ABC 0 a Tmáx	Lote A		Lote B		Lote C	
	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC
LCS	2133.3660	1679.2570	2066.7683	2264.4732	2616.4078	2721.4008
Promedio	1596.7436	1226.2517	1556.2726	1385.1067	2137.9270	2152.2783
LSI	1060.1213	773.2463	1045.7770	505.7403	1659.4462	1583.1558

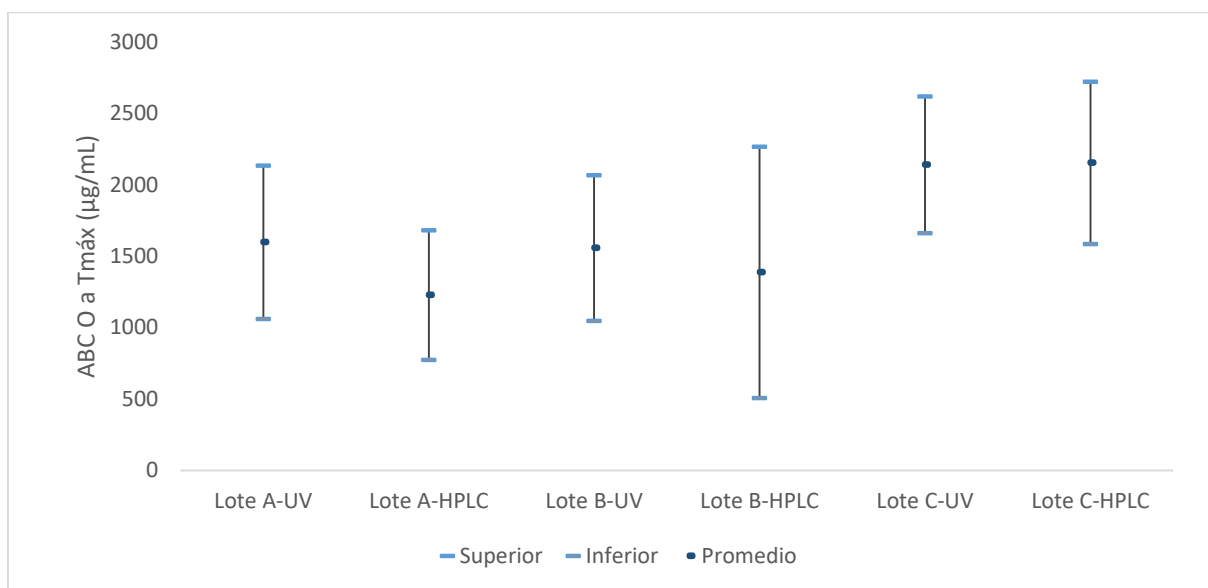


Figura 35. Gráfico de comparación de los intervalos de confianza de las medias de las áreas bajo la curva desde el tiempo cero al tiempo máximo observados en los lotes A, B Y C por espectrofotometría y cromatografía. (Nivel de significancia 0.5)

Tabla 27. Valores-P de la prueba-F (Anova de un solo factor) de Área bajo la curva de 0 a C_{máx} a dos diferentes métodos analíticos y lotes.

UV	HPLC		
	Lote A	Lote B	Lote C
Lote A	0.244	---	---
Lote B	---	0.7011	---
Lote C	---	---	0.9648

Los intervalos de confianza de las áreas bajo la curva de 0 al tiempo en que se alcanza la concentración máxima entre las técnicas analíticas para cada lote no presentan diferencias significativas como se observa en la Figura 35 y, por lo tanto, hay gran similitud entre las cantidades disueltas del fármaco que presentan los perfiles de ambas técnicas analíticas. De igual manera el análisis Anova muestra que los mismos resultados mostrados en la tabla 28, donde todos los valores-p son mayores a 0.05 y por lo tanto no existen diferencias significativas.

De esta manera se comprueba que sin importar si las muestras son cuantificadas por medio de un método espectrofotométrico o cromatográfica los parámetros cinéticos no se verán afectados.

IV. CONCLUSIONES

Se establecieron las condiciones óptimas para realizar perfiles de disolución en aparato IV USP celdas de flujo continuo de tres lotes de tabletas de Nexium ® medicamento de referencia de esomeprazol como lo establecen las directrices de la FDA, OMS, EMA y la NOM-177-SSA1-2013.

Las condiciones establecidas fueron: búfer de fosfatos de pH 6.8, baño de 37 ± 5 °C, velocidad de flujo de 10 mL/min y turbulento, celda grande de 22.6 mm, sistema abierto y con un tiempo estimado de 80 min.

Se prepararon dos curvas de calibración, para cuantificar mediante las dos técnicas analíticas (espectrofotometría y cromatografía) que abarcara todas las posibles concentraciones presentadas durante los ensayos, en el cual se obtuvo:

- La curva de calibración resultó lineal para el método espectrofotométrico en un rango de concentraciones de **8.0272 a 40.1361 $\mu\text{g/mL}$** , con un coeficiente de correlación (r) de 0.9999, un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9999 y un %CV de 0.3720.
- La curva de calibración resultó lineal para el método cromatográfico en un rango de concentraciones de **9.22866 a 184.5732 $\mu\text{g/mL}$** , con un coeficiente de correlación (r) de 0.9998, un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9996 y un %CV de 1.15.
- No existen diferencias significativas entre los porcentajes recuperados por cada técnica analítica.

Se hizo un análisis a los perfiles acumulativos, para determinar el modelo cinético de liberación que seguía, obteniéndose que la forma farmacéutica sigue una cinética de orden 1.

Se compararon los parámetros cinéticos ($C_{\text{máx}}$, $T_{\text{máx}}$, ABC_0^t y $ABC_0^{T_{\text{máx}}}$) de los perfiles de disolución por cada método analítico mediante intervalos de confianza de la media donde se obtuvo que los intervalos de confianza para los 4 parámetros de la técnica espectrofotométrica se traslapaban con los intervalos de la técnica cromatográfica, para cada lote, obteniendo así, que los perfiles tienen las mismas características cinéticas, indicando que sin importar que técnica analítica utilizemos para cuantificar las muestras, los perfiles que se obtendrán serán comparables, entre una técnica y otra.

La importancia de estos estudios radica en que pueden ser utilizados para un futuro estudio de bioequivalencia entre el medicamento de referencia y un medicamento genérico durante su desarrollo, donde se pueden disminuir costos y tiempo de análisis si se usa un método espectrofotométrico. Incluso al realizar el estudio en el aparato IV USP, puede reemplazar al estudio “*In vivo*”, si existe una correlación “*In vivo-In vitro*” establecida, logrando obtener una “bioexención”.

V.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. González Álvarez Isabela, Cabrera Perez Miguel A., B. S. M. (2015). Metodologías Biofarmaceuticas en el Desarrollo de Medicamentos. Universidad Miguel Hernández de Elche.
2. Cook, J. (2003). *Biodisponibilidad y bioequivalencia*. México: México: Asociación Farmacéutica mexicana. Retrieved from 968-6543-05-8
3. Vaghela, B. J., Kayastha, R., Bhatt, N., Pathak, N., & Rathod, D. (2011). Development and validation of dissolution procedures. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(3), 50–56.
4. Eaton, J. W., Tran, D., Hauck, W. W., & Stippler, E. S. (2012). Development of a performance verification test for USP apparatus 4. *Pharmaceutical Research*, 29(2), 345–351. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0559-6>
5. Martin, G. P., Gray, V. A., Martin, G. P., & Gray, V. A. (2011). General Considerations for Dissolution Methods: Development, Validation, and Transfer. *Journal of Validation Technology*.
6. Jamart Sánchez Lucia, Maestro Nombelab Almudena, Barreda Velázquez Carlos, H. H. S. y A. C. M. (2016). Efectos adversos del consumo crónico de omeprazol. Madrid, España.
7. Lee, S. L., Raw, A. S., & Yu, L. (2008). Dissolution Testing. *Biopharmaceutics Applications in Drug Development*, 47–74. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-72379-2>
8. Gómez Almaraz Liztli, López Arellano Raquel, García Corrales Martha E., Cervantez Sandoval Armando, R. G. P. (2005). *Bioequivalencia* (1º). Edo. de México: UNAM.
9. Larsson, J. (2009). Methods for Measurement of Solubility and Dissolution Rate of Sparingly Soluble Drugs. *Chemeng.Lth.Se*, 25. Recuperado a partir de <http://www.chemeng.lth.se/exjobb/E272.pdf>
10. Gennaro, A. R. (2003). *Remington:Farmacia* (20ª). Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana.
11. Aguilar Ros Antonio, Camaño Somoza Manuel, R. M. F. (2014). *Biofarmacia y farmacocinética: Ejercicios y problemas Resueltos* (2º). Barcelona, España.: Elsevier B.V.
12. Domenech Berrozpe José, Martínez Lanao José, P. D. J. M. (s/f). *Biofarmacia y Farmacocinética Volumen II*. Madrid, España.
13. Peter G. Welling, Losagna Louis, B. U. V. (1996). *The drug Development Process*. New York, United States of America: Marcel Dekter.
14. *Farmacopea de los Estados Unidos Americanos: USP 38ª Edición.*; 2013.

15. Aulton, M. E. (2004). *Farmacia: La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas* (6ª). Madrid, España: Elsevier.
16. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos (2013).
17. Bettini, R. (1994). *Pharmaceutical dissolution testing. Journal of Controlled Release* (Vol. 32). [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(94\)90064-7](https://doi.org/10.1016/0168-3659(94)90064-7)
18. Tiwary, A. K., Sapra, B., & Jain, S. (2010). DISSOLUTION. *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia: Drug Discovery, Development, and Manufacturing*, 62.
19. Jung Cook, H., de Anda Jáuregui, G., Rubio Carrasco, K., & Mayet Cruz, L. (2012). Comparación de perfiles de disolución. Impacto de los criterios de diferentes agencias regulatorias en el cálculo de f2. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 43(3), 67–71.
20. FDA. (2006). Guidance for Industry: Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. *Health and quality of life outcomes*, 4, 79. <https://doi.org/10.1186/1477-7525-4-79>
21. Ema. (2010). Guideline on the investigation of bioequivalence. *European Medicines Agency* (... , 1(January), 1–27. <https://doi.org/CPMP/EWP/QWP/1401/98>
22. World Health Organization. (2006). Proposal to waive In vivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral dosage forms. Annex 8 of. *WHO Technical Report Series*, (937), 391–437.
23. Bredael, G. M., Liang, S., & Hahn, D. (2015). A strategy for quality control dissolution method development for immediate-release solid oral dosage forms. *Dissolution Technologies*, 22(3), 10–16. <https://doi.org/10.14227/DT220315P10>
24. Mohammad Hartai, P. D. (2016). Practical Concepts of Developing Dissolution Method.
25. Boda, K., Engineer, A., & Technologies, A. (s/f). Transferring Dissolution Methods Session 1 – Building a Robust Dissolution Method.
26. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos: FEUM 11ª Edición.*; 2014.
27. Singh, I., & Aboul-Enein, H. Y. (2006). Advantages of USP apparatus IV (flow-through cell apparatus) in dissolution studies. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 3(3), 220–222. <https://doi.org/10.1007/BF03247211>
28. Wu, Y., & Ghaly, E. S. (2006). Effect of hydrodynamic environment on tablet dissolution using flow-through dissolution apparatus. *Puerto Rico health sciences journal*.
29. Zhang, G. H., Vadino, W. A., Yang, T. T., Cho, W. P., & Chaudry, I. A. (1994). Evaluation of the Flow-Through Cell Dissolution Apparatus: Effects of Flow Rate,

- Glass Beads and Tablet Position on Drug Release from Different Type of Tablets. *Development and Industrial Pharmacy*, 20(13 p2063-2078), 16.
30. Cardenas Rodríguez Hilda Lilia, C. A. A. R. (1996). *Aspectos biofarmaceuticos de la evaluación de medicamentos* (1° Edición). México: Universidad Autonoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.
 31. Owen, T. (2000). *Fundamentos de la espectroscopía UV-visible moderna: conceptos básicos*. Agilent Technologies. <https://doi.org/5980-1397ES>
 32. Esparza Vilma, Castro Luisa Maria, Litter Marta I. , Wong Maria, M. V. (s/f). Métodos espectrofotométricos UV-Vis. En F. Litter, Armienta (Ed.), *Métodologías analíticas para la determinación y especificación de As en agua y suelos*.
 33. Díez, L. M. P. (2015). *Fundamentos de la cromatografía*. España: Dextra Editorial.
 34. Esperanza Ruíz María. (s/f). El principio de Transitividad. Métodos para comparar perfiles de disolución.
 35. Gismera García María Jesús, Quintana Mani Ma. Carmen, da S. de C. M. P. (2009). *Introducción a la cromatografía líquida de alta resolución*. Madrid, España: Madrid: Universidad Autonoma de Madrid.
 36. Skoog, Douglas A., F, J. H. (2001). *Principios de Análisis Instrumental* (5°). Madrid, España: Mc Graw Hill.
 37. Waters Corporation. (2014). What is the Difference Between UHPLC and UPLC?
 38. Hara, T. O., Dunne, A., Butler, J., Devane, J., Butler, J., & Devane, J. (1998). A review of methods used to compare dissolution profile data. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, 1(5).
 39. Kumar, P. R., Shyale, S., Kumar, S. M. S., & Chemistry, P. (2010). Physico-chemical characterization, UV spectrophotometric method development and validation studies of Esomeprazole Magnesium Trihydrate. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2(3), 484–490.
 40. Pradhan, R., Hiep, T., Yub, S., Bong, K., Joo, Y., Choi, H., ... Oh, J. (2016). Preparation and characterization of fast dissolving flurbiprofen and esomeprazole solid dispersion using spray drying technique. *International Journal of Pharmaceutics*, 502(1–2), 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.02.020>.
 41. Sharma, S., & Kauhsik, D. (2016). Improving the Solubility of Esomeprazole Using Self, 5(8), 1223–1235. <https://doi.org/10.20959/wjpps20168-7386>
 42. Al, L. W. et. (1990). N. *Handbook of Chemical Property Estimation Methods*, (Washington, DC: Amer Chem Soc), p.12.
 43. Robinson, M. (2004). Review article: the pharmacodynamics and pharmacokinetics of proton pump inhibitors--overview and clinical implications. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 20 Suppl 6, 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2004.02160.x>
 44. Biólogos, C. N. de Q. F. (s/f). Guía De Validación De Métodos analíticos.

45. Colombia, U. N. De. (2003). ¿Qué tipo de forma farmacéutica es la presentación MUPS?, ¿qué significan sus siglas? ¿La presentación MUPS para el esomeprazol permite disolverse en agua? *Centro de información de medicamentos*, (45), 1–3.

ANEXO 1 CÁLCULOS PARA OBTENER CONCENTRACIONES ($\mu\text{g/mL}$) DE ESOMEPRAZOL MAGNÉSICO TRIHIDRATADO

Los pesos de muestras de estándar de esomeprazol magnésico trihidratado deben multiplicarse por el factor 0.8979 debido que la USP indica que debe utilizarse un estándar de omeprazol, para la cuantificación de esomeprazol por lo que:

Peso Omeprazol: 688.816 g/mol

Peso Esomeprazol Magnésico trihidratado: 767.11 gr/mol

Restando las 3 moléculas del agua y la mol de magnesio al peso del EMT: 767.11 gr/mol - 78.3508 gr/mol = 688.7592

Por lo que 767.11 mg/mol contiene 688.7592 de esomeprazol puro, que es equivalente a omeprazol puro:

$$\text{factor} = \frac{688.7592 \text{ gr/mol}}{767.11 \text{ mg/mol}} = 0.8979$$

Con el peso corregido se obtiene la concentración estándar. Para cuantificar muestras obtenidas por el método espectrofotométrico se sigue la siguiente formula:

$$C_m = \frac{\text{Abs}_m \times C_{\text{std}}}{\text{Abs}_{\text{std}}}$$

Donde:

C_m = Concentración de la muestra

Abs_m = Absorbancia de la muestra

C_{std} = Concentración del estándar

Abs_{std} = Absorbancia del estándar

Para el método cromatográfico se procede a hacer lo mismo, pero ahora A_{std} y A_m se refieren al área obtenida:

$$C_m = \frac{A_m \times C_{\text{std}}}{A_{\text{std}}}$$

Para las curvas de calibración se calcula F que es la respuesta analítica dividida por la concentración. Ejemplo (Área/Concentración) para cada sistema, a partir de estos datos se puede calcular el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

ANEXO 2 CÁLCULOS PARA PERFILES DE DISOLUCIÓN NO ACUMULATIVOS Y ACUMULATIVOS.

Las concentraciones de las muestras obtenidas por ambos métodos analíticos se obtienen mediante la ecuación del ANEXO 1. Con esas concentraciones se construyen los perfiles no acumulativos y acumulativos.

Perfiles No Acumulativos:

Se promedian las concentraciones de los 6 ensayos por cada tiempo de muestreo.

Se grafica la concentración promedio por cada tiempo en el eje de las abscisas y el tiempo de muestreo en el eje de las ordenadas.

Perfiles Acumulativos:

Las concentraciones obtenidas se corrigen con los factores de dilución. Por ejemplo: la dilución fue de 1mL/5mL, se multiplica la concentración por 5, obteniendo una concentración corregida.

Se obtienen las cantidades disueltas por cada tiempo:

$$\text{Cantidad disuelta} = \frac{C_{\text{corregida}} \times (\text{Volumen de la bureta} + \text{Volumen de Muestreo})}{1000}$$

Se calcula la cantidad acumulada (mg) disuelta donde para el primer tiempo es la cantidad disuelta en ese tiempo y para los posteriores tiempos es la suma de la cantidad disuelta más la cantidad acumulada del anterior tiempo:

$$t1 \text{ Cantidad Acumulada (t1)} = \text{Cantidad disuelta (t1)}$$

$$t2 \text{ Cantidad Acumulada (t2)} = \text{Cantidad acumulada (t1)} + \text{Cantidad disuelta (t2)}$$

$$t3 \text{ Cantidad Acumulada (t3)} = \text{Cantidad Acumulada (t2)} + \text{Cantidad disuelta (t3)}$$

Para calcular el porcentaje disuelto:

$$\text{Porcentaje Disuelto (\%)} = \frac{\text{Cantida Acumulada} \times 100}{\text{mg de API en la FF}}$$

ANEXO 3 CÁLCULOS PARA ÁREAS BAJO LA CURVA

Las áreas bajo la curva se obtienen mediante el procedimiento de trapezoides:

$$ABC_0^{t_1} = \frac{C_1 + C_2}{2} \quad ABC_{t_1}^{t_2} = \frac{C_1 + C_2}{2} \times (t_2 - t_1)$$

Por ejemplo:

Tiempo (min)	Concentración (µg/mL)	t2-t1	$ABC_{t_1}^{t_2} = \frac{C_1 + C_2}{2} \times (t_2 - t_1)$
0	0	0	
3	34.04742622	3	51.07113932
6	18.84109155	3	79.33277665
9	62.61171389	3	122.1792082
12	144.1501472	3	310.1427917
15	241.2049473	3	578.0326418
20	274.8950985	5	1290.250115
25	157.7620313	5	1081.642824
30	74.24529808	5	580.0183234
35	28.13910084	5	255.9609973
40	14.20832668	5	105.8685688
50	5.973284471	10	100.9080558
60	3.581608533	10	47.77446502
70	2.595411295	10	30.88509914
80	1.972394477	10	22.83902886