

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ENSAYO DE
DISOLUCIÓN DEL TIICOLCHICÓSIDO EN TABLETAS**

Trabajo Especial de Grado presentado ante la
ilustre Universidad Central de Venezuela, por
Bachiller Johana Carolina Machado Romero,
para optar al título de Licenciado en Química.

Tutores:

Prof. Marisabel Bor

UCV. Facultad de Farmacia

Prof. Vincent Piscitelli

UCV. Facultad de Ciencias. Escuela de Química

Caracas, Octubre 2018

Yo Profesora Marisabel Bor, Investigadora del Laboratorio de Análisis de Medicamentos de la Escuela de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela y el Profesor Vincet Piscitelli Investigador del Centro de Fisicoquímica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela.

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ENSAYO DE DISOLUCIÓN DEL TI COLCHICÓSIDO EN TABLETAS”

Que presenta la Br. **Johana Machado**, para aspirar al título de Licenciado en Química, se ha realizado en el Laboratorio de Análisis de Medicamentos en la Escuela de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2016 y 2018, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, Octubre del 2018



Esp. Marisabel Bor

Tutor



Doc. Vincent Piscitelli

Tutor

RESUMEN

El Tiocolchicósido es un principio activo que posee un efecto relajante por sus propiedades analgésicas y antiinflamatorias, es utilizado para diversos tratamientos traumáticos, asociados al dolor y espasmo muscular. El ensayo de disolución para la evaluación del desempeño y calidad de este principio activo no aparece reportado en las monografías oficiales, por lo cual se propuso desarrollar y validar una metodología para el ensayo de disolución del Tiocolchicósido en tabletas.

Las condiciones de la metodología para el ensayo de disolución del principio activo fueron: Aparato disolutor con Paletas (Aparato II) a una velocidad de 50 rpm, medio de disolución Buffer Acetato a pH 4,5 con un volumen de medio de disolución de 900 mL, a una temperatura de $37 \pm 0,5$ °C, tiempo de disolución mayor a 30 min. Las siguientes condiciones cromatográficas por HPLC: Columna Fase Inversa ET (250mm x 8 mm x 4µm) Nucleosil 7 C18 Art. 720 018, fase móvil constituida por Metanol: Acetonitrilo: Agua en porciones (30:10:60) % v/v, ajustada a pH $8,00 \pm 0,05$ con hidróxido de sodio 0,1 N, el flujo de fase móvil fue de 1 mL/min, un volumen de inyección de 40 µL y la longitud de onda de detección fue de 260 nm.

La validación de la metodología se realizó de acuerdo a lo establecidos en el apartado <1225> de la USP 38. La metodología analítica por ensayo de disolución desarrollada y validada resultó ser precisa, específica, reproducible, exacta y lineal en un rango de concentración de 0,001 a 0,006 mg/mL. El método analítico desarrollado y validado se puede utilizar como un método rutinario para pruebas de control de calidad.

Palabras claves: Tiocolchicósido, tabletas, metodología, aparato II, disolución, calidad.

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del trabajo Especial de Grado titulado: "DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ENSAYO DE DISOLUCIÓN DEL TIICOLCHICÓSIDO EN TABLETAS". Presentado por el Br. Johana Carolina Machado Romero., certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.



Prof. Marisabel Bor
(Tutor)



Prof. Vincent Piscitelli
(Tutor)



Prof. Rosa Amaro
(Jurado)



Prof. José de Sousa
(Jurado)

AGRADECIMIENTO

Primeramente agradezco a Dios por haberme dado la oportunidad de estudiar esta hermosa carrera en una gran universidad, por enseñarme cada día que puedo lograr alcanzar todas mi metas con esfuerzo y dedicación, sin descuidar nunca el hacer su voluntad, la cual es agradable y perfecta para cada uno de nosotros.

Gracias Señor, por permitirme culminar con una etapa de mi vida que me impulsa a nuevos niveles. Te agradezco por colocar la paciencia y el ánimo necesario en estos últimos años. Por poner en mi la motivación correcta y enseñarme a diferenciar mis prioridades. Gracias por enseñarme algo nuevo cada día.

Agradezco a mi esposo, Emanuel Cudemos por ser ese apoyo incondicional, por ser un motivador en mi vida para alcanzar mis metas y sueños, por su gran ayuda en todo momento, por su comprensión, amor y paciencia durante toda esta etapa. Y por siempre colocar mis pies en la tierra. Gracias por ayudarme a ver cada día mis virtudes, más allá de mis defectos.

Agradezco a mi hija, Anelisse, pues se ha vuelto el motor en mi vida para ir más allá de lo que puedo, pienso o imagino. Por sus sonrisas en medio de tantas circunstancias, que te ayudan a levantarte, luchar y seguir creyendo por alcanzar no solo este título universitario sino a crear una mejor Venezuela.

A toda mi familia y mis padres por siempre creer en mí, por brindar su ayuda durante esta carrera cada vez que lo necesite. Gracias por su gran apoyo, sé que alcanzar esta meta es un sueño también para ustedes.

Agradezco a mi tutora Marisabel Bor por su gran apoyo. Por recibirme desde un inicio con mucho cariño, expectativas, motivación y ganas de trabajar. Gracias por estar presente en cada momento, por su dedicación, correcciones en los momentos oportunos, su ayuda en todo tiempo y su paciencia. Por ayudarme a enfocarme y alcanzar esta meta. Gracias por su honestidad y bendecir mi vida, en muchas ocasiones me ha llevado a cambiar mi actitud, para dar lo mejor de mí.

A mi tutor Vincent Piscitelli, profesor de gran ejemplo de nuestra gran Escuela de Química, digno de admirar sus pasos en esta carrera. Gracias profesor por su apoyo a este trabajo.

Gracias a todo el personal del Laboratorio de Análisis de Medicamentos de la Facultad de Farmacia, por recibirme, ayudarme y hacer de este tiempo con ustedes un rato agradable. A Lic. Dubraska Vega por su ayuda y apoyo en cada momento durante todo este trabajo.

Gracias a mis amigos, compañeros, profesores de mi Facultad de Ciencias por ser parte de este gran capítulo de mi vida. Agradezco al Profesor de Sousa de la Facultad de Farmacia por siempre recibirme con los brazos abiertos, por su conocimiento el cual ha sido de gran ayuda en este trabajo; gracias por su amabilidad en todo momento.

¡¡¡ Muchas Gracias, los Amo!!!

"...²³ Cuando hagan cualquier trabajo, háganlo de todo corazón, como si estuvieran trabajando para el Señor y no para los seres humanos.²⁴ Recuerden que ustedes van a recibir la recompensa del Señor que Dios le prometió a su pueblo, pues ustedes sirven a Cristo el Señor."

Colosenses 3:22-24

INDICE

INDICE DE FIGURAS	13
INDICE DE TABLAS	16
GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	19
I. INTRODUCCIÓN	20
II. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	22
II.1 Formas farmacéuticas	22
II.1.1 Clasificación de formas farmacéuticas	22
II.1.1.1 Formas farmacéuticas líquidas (4)	22
II.1.1.2 Formas farmacéuticas semisólidas (4)	23
II.1.1.3 Formas farmacéuticas transdérmicas (5)	23
II.1.1.4 Formas farmacéuticas sólidas (5)	23
II.2 Ensayos de disolución	24
II.2.1 Ensayos de disolución en formas farmacéuticas sólidas	25
II.2.3 Condición de exceso de medio (Condición <i>Sink</i>)	26
II.2.3.1 Procesos cinéticos de los perfiles de disolución	28
II.2.3.1.1 Cinética de Orden cero	28
II.2.3.1.2 Cinética de orden uno	30
II.2.4 Perfiles de disolución	32
II.2.4.1 Comparaciones de los perfiles de disolución	32
II.2.4.1.1 Enfoque independiente de modelo utilizando un factor de similitud	32
II.2.4.1.1.1 Factor de diferencia (f_1)	32
II.2.4.1.1.2 Factor de similitud (f_2)	33
II.2.5 Aparatos de disolución descritos en la USP	34
II.2.5.1 Aparato 1: Cesta rotatoria o canastilla	34
II.2.5.2 Aparato 2: Método de la Paleta	35
II.2.5.3 Aparato 3: Cilindro Oscilante	36
II.2.5.4 Aparato 4: Celda de Flujo	37
II.2.6 Aspectos Generales del Ensayo de Disolución	37
II.2.7 Pruebas de disolución de formas farmacéuticas sólidas de liberación inmediata	38

II.2.8 Sistemas de Clasificación Biofarmacéutica	39
II.2.8.1 Solubilidad	40
II.2.8.2 Permeabilidad	40
II.2.8.3 Disolución	41
II.2.3 Diseño de la metodología analítica	41
II.3.1 Medios de disolución	42
II.3.2 Volúmenes de medio de disolución	43
II.3.3 Elección del aparato disolutor	44
II.3.4 Agitación	44
II.3.5 Duración del ensayo de disolución	44
II.3.6 Muestreo	45
II.3.7 Análisis químico de las muestras obtenidas en el ensayo de disolución	45
II.3.7.1 Espectrofotometría de Absorción molecular Ultravioleta y Visible.	46
II.3.7.2 Metodos Cromatográficos	47
II.3.7.2.1 Cromatografía Líquida	49
II.3.7.2.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	49
II.4. Validación de métodos analíticos	53
II.4.1. Parámetros de desempeño analítico evaluados en la validación de métodos	55
II.4.1.1. Exactitud	55
II.4.1.2 Precisión	55
II.4.1.2.1 Repetibilidad	56
II.4.1.2.2 Precisión intermedia	56
II.4.1.2.3 Reproducibilidad	56
II.4.1.2.4 Datos recomendados	57
II.4.1.3 Especificidad	57
II.4.1.4 Límite de detección	58
II.4.1.5 Límite de cuantificación	58
II.4.1.6 Linealidad e Intervalo	59
II.4.1.7 Robustez	59
II.5 Criterios de aceptación USP para procedimientos de Disolución.	59

II.6 Tiocolchicósido	61
III. ANTECEDENTES	64
III. 1 Validación de la estabilidad indicada por el método RP-HPLC para la determinación y estudio de disolución <i>In Vitro</i> simultanea de Tiocolchicósido y Diclofenac potásico de dosis de tabletas.	64
III. 2 Validación de un método por RP-HPLC para la determinación de Tiocolchicósido en tabletas.	68
III.4 Métodos espectrofotométricos para la determinación de Tiocolchicósido a granel y en forma farmacéutica sólida.	73
III.5 Validación de un método por RP-HPLC para la estimación simultanea de Tiocolchicósido y Etodolac en tabletas.	74
V. OBJETIVOS.....	77
V.1 Objetivo General	77
V.2 Objetivos Específicos	77
VI. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	78
VI.1 Patrón	78
VI.2 Muestras	78
VI.3 Reactivos	79
VI.4 Instrumentación	79
VII. DETERMINACIÓN DE CONTENIDO	80
VII.1 Determinación del contenido de Tiocolchicósido	80
VII.1.1 Condiciones cromatográficas	80
VII.1.2 Adecuación del sistema cromatográfico	80
VII.1.3 Preparación patrones de la curva de calibración	81
VII.1.4 Procedimiento de tratamiento de muestra	81
VII.1.5 Procedimiento determinación de Contenido de Tiocolchicósido	82
VII.2 Condiciones ensayos de disolución.	82
VII.2.1 Pruebas de solubilidad	83
VII.2.3 Medios de disolución	83
VII.2.3.1 Preparación de Medios de disolución	83
VII.2.4 Desgasificación	84
VII.2.5 Volumen de llenado de vasos	84

VII.2.6 Aparato disolutor	84
VII.2.7 Agitación	85
VII.2.8 Temperatura	85
VII.2.9 Diseño de estudio del ensayo de disolución para los perfiles comparativos	85
VII.2.9.1 Tiempos de muestreo	85
VII.2.9.2 Toma de muestras	86
VII.2.9.3 Curvas de calibración para el ensayo de disolución	86
VII.2.9.4 Tratamiento de las muestras para el perfil de disolución	87
VII.2.9.5 Valoración de método analítico	88
VIII. ADECUACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO PARA EL ANALISIS DE CONTENIDO	88
VIII.1 Determinación de contenido de Tiocolchicósido	90
IX. DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA ANALITICA	91
IX.1 Pruebas de solubilidad	91
IX. 2 Valoración por espectrofotometría UV-visible	92
IX.2.1 Determinación de longitud de onda	92
IX.2.2 Perfiles de disolución del medicamento 1 por espectrofotometría UV-Visible	93
IX.2.2.1 Perfil de disolución del medicamento 1 en buffer fosfato pH= 6,8 por UV-Visible	93
IX.2.2.2 Perfil de disolución del medicamento 1 en buffer acetato pH= 4,5 por espectrofotometría UV-Visible	95
IX.2.2.3 Perfil de disolución del medicamento 1 en ácido clorhídrico a pH= 1,2 por espectrofotometría UV-Visible	98
IX.2.3 Comparación de los perfiles de disolución del medicamento 1 por espectrofotometría UV-Visible	100
X. VALORACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	100
X.1 Condiciones cromatográficas	100
X.2 Preparación fase móvil	101
X.3 Optimización de las condiciones cromatográficas para el ensayo de disolución ...	101
X.4 Curvas de Calibración	103
X.5 Tiempos de toma de muestra	103
X.6 Perfiles de disolución	103

XI. PERFILES DE DISOLUCIÓN PARA EL MEDICAMENTO 1 POR HPLC.....	104
XI.1 Perfil de disolución para el medicamento 1 en buffer fosfato pH= 6,8 por HPLC ..	104
XI.2 Perfil de disolución para el medicamento 1 resolución en buffer acetato pH= 4,5 por HPLC.	108
XI.3 Perfil de Disolución para el medicamento 1 en HCl 0,060 N a pH= 1,2 por HPLC. ...	112
XI.4 Perfil de disolución para el medicamento 1 en agua a pH= 7,0 por HPLC.	117
XII. PERFILES DE DISOLUCIÓN MEDICAMENTO 3-A POR HPLC	121
XII.1 Perfil de disolución para el medicamento 3-A en buffer fosfato pH= 6,8 por HPLC.	121
XII.2 Perfil de disolución para el medicamento 3-A en buffer acetato pH= 4,5 por HPLC.	124
XII.3 Perfil de disolución para el medicamento 3-A en HCl 0,060 N a pH= 1,2 por HPLC.	127
XIII. PRUEBAS DE COMPARACIÓN PARA MEDICAMENTO 1 Y 3-A POR HPLC.....	132
XIV. ESTUDIO DE CINÉTICA DE DISOLUCIÓN	137
XV. PROCEDIMIENTO DE DISOLUCIÓN PARA EL ENSAYO DE DISOLUCIÓN DE TIOLCHICÓSIDO EN TABLETAS.....	140
XVI. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA EL ENSAYO DE DISOLUCIÓN DE TIOLCHICÓSIDO EN TABLETAS POR HPLC.....	142
XVI.1 Linealidad	142
XVI.2 Precisión	151
XVI.2.1 Precisión del sistema cromatográfico.....	151
XVI.2.2 Precisión Intermedia	152
XVI.2.3 Repetibilidad.....	154
XVI.2.4 Exactitud.....	157
XVI.2.5 Especificidad	159
XVII. ANÁLISIS DE UNA MUESTRA DE TIOLCHICÓSIDO 24 HORAS DESPUES DE REALIZAR EL ENSAYO DE DISOLUCIÓN DE TIOLCHICÓSIDO EN TABLETAS.	162
XVIII. EVALUACIÓN DE MUESTRA VENCIDA DE TIOLCHICÓSIDO POR METODOLOGÍA DESARROLLADA DEL ENSAYO DE DISOLUCIÓN DE TIOLCHICOSIDO.	164
XIX. ESTUDIO DE DISTINTAS MARCAS COMERCIALES POR LA METODOLOGÍA ENSAYO DE DISOLUCIÓN DE TIOLCHICÓSIDO EN TABLETAS.....	167
XX. CONCLUSIONES	175

XXI. RECOMENDACIONES	178
XXII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	179
Apéndice A.	182
Determinación de Contenido	182
Apendice B.	184
Determinación del %Disuelto . Perfiles de Disolución de Tiocolchicósido por Espectofotometria UV-Visivle	184
Apéndice C.....	185
Determinación del %Disuelto. Perfiles de Disolución de Tiocolchicósido por HPLC.....	185
Apéndice D.	186
Linealidad	186
Apéndice E.....	188
Precisión	188
Apéndice F.....	192
Repetibilidad	192
Apéndice G.	196
Exactitud.....	196
Apéndice H.	198
Muestra Vencida	198
Apéndice I.....	200
Pruebas de 24 horas luego del ensayo de disolución	200
Apéndice J.	204
Análisis de Medicamentos de distintas marcas comerciales	204

INDICE DE FIGURAS

Página

FIGURA 1. PROCESO DE DISOLUCIÓN DE UNA FORMA FARMACÉUTICA SÓLIDA.	25
FIGURA 2. CANTIDAD DISUELTA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN UNA CINÉTICA DE ORDEN CERO.....	30
FIGURA 3. CANTIDAD DISUELTA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN UNA CINÉTICA DE ORDEN UNO.....	31
FIGURA 4. ESPECIFICACIONES DE LOS ELEMENTOS DE AGITACIÓN DE LA CANASTILLA. (14)	35
FIGURA 5. ELEMENTO DE AGITACIÓN DE LA PALETA	36
FIGURA 6. ESTRUCTURA MOLECULAR DEL TIOLCHICÓSIDO.	61
FIGURA 7. PERFIL DEL FÁRMACO DE TH Y DP EN BUFFER DE PH 6,8.....	67
FIGURA 8. CROMATOGRAMAS Y GRÁFICOS DE PUREZA DE PATRÓN (A) Y MUESTRA (B).....	69
FIGURA 9. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE TIOLCHICÓSIDO.....	70
FIGURA 10. CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA PARACETAMOL	72
FIGURA 11. CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA TIOLCHICÓSIDO.....	72
FIGURA 12. ESPECTRO UV DEL PATRÓN DE TIOLCHICÓSIDO Y ETOLAC.....	75
FIGURA 13. CROMATOGRAMA POR HPLC DE TIOLCHICÓSIDO Y ETOLAC.	75
FIGURA 14. ADECUACIÓN DEL SISTEMA ANÁLISIS DE CONTENIDO.	89
FIGURA 15. CROMATOGRAMA DE TIOLCHICÓSIDO. DETERMINACIÓN DE CONTENIDO.	91
FIGURA 16. ESPECTRO UV-VISIBLE PRINCIPIO ACTIVO TIOLCHICÓSIDO.	92
FIGURA 17. CURVA DE CALIBRACIÓN POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE EN MEDIO BUFFER FOSFATO PH=6,8.	93
FIGURA 18. PERFIL DE DISOLUCIÓN MEDICAMENTO 1 A PH=6,8 POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE. 95	95
FIGURA 19. CURVA DE CALIBRACIÓN DE MEDICAMENTO INNOVADOR POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV- VISIBLE EN MEDIO BUFFER ACETATO PH=4,5.....	96
FIGURA 20. PERFIL DE DISOLUCIÓN MEDICAMENTO 1 A PH=4,5 POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE. 97	97
FIGURA 21. CURVA DE CALIBRACIÓN POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE DEL MEDICAMENTO 1 EN EL MEDIO ÁCIDO CLORHÍDRICO PH=1,2.	98
FIGURA 22. PERFIL DE DISOLUCIÓN MEDICAMENTO 1 A PH=1,2 POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE. 99	99
FIGURA 23. PRECISIÓN DEL MÉTODO.....	102
FIGURA 24. CROMATOGRAMA DE PATRÓN EN MEDIO BUFFER FOSFATO PH=6,8.	104
FIGURA 25. PUREZA DE PICO DE SOLUCIÓN PATRÓN EN MEDIO BUFFER FOSFATO PH= 6,8.....	105
FIGURA 26. PUREZA DE PICO DE LA INYECCIÓN DEL MEDICAMENTO 1 EN MEDIO BUFFER FOSFATO A PH=6,8.	106
FIGURA 27. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL MEDICAMENTO 1 POR HPLC EN MEDIO BUFFER FOSFATO PH=6,8.	106
FIGURA 28. PERFIL DE DISOLUCIÓN DEL MEDICAMENTO 1 A PH=6,8 POR HPLC.	108
FIGURA 29. INYECCIONES DE PATRÓN DE TIOLCHICÓSIDO EN MEDIO BUFFER ACETATO PH= 4,5.	109
FIGURA 30. PUREZA DE PICO DE SOLUCIÓN PATRÓN EN MEDIO BUFFER ACETATO PH=4,5.....	109
FIGURA 31. PUREZA DE PICO DE LA INYECCIÓN DEL MEDICAMENTO 1 EN MEDIO BUFFER ACETATO A PH=4,5.	110
FIGURA 32. CURVA DE CALIBRACIÓN POR HPLC EN MEDIO BUFFER ACETATO PH=4,5. MEDICAMENTO 1. 111	111
FIGURA 33. PERFIL DE DISOLUCIÓN DEL MEDICAMENTO INNOVADOR A PH=4,5 POR HPLC.	112
FIGURA 34. INYECCIONES DE PATRÓN DE TIOLCHICÓSIDO EN MEDIO HCL 0,060N PH= 1,2.....	113
FIGURA 35. PUREZA DE PICO DE SOLUCIÓN PATRÓN EN MEDIO HCL 0,060 N PH=1,2.....	113
FIGURA 36. PUREZA DE PICO DE LA INYECCIÓN DEL MEDICAMENTO 1 EN MEDIO HCL 0,060 N PH=1,2... 114	114
FIGURA 37. CURVA DE CALIBRACIÓN POR HPLC. MEDIO: ÁCIDO CLORHÍDRICO PH 1,2.....	115

FIGURA 38. PERFIL DE DISOLUCIÓN PARA MEDICAMENTO 1 A PH= 1,2 POR HPLC.	116
FIGURA 39. INYECCIONES DE PATRÓN DE TIOLCHICÓSIDO EN MEDIO AGUA A PH= 7,0.	117
FIGURA 40. PUREZA DE PICO DE SOLUCIÓN PATRÓN EN MEDIO AGUA A PH= 7,0.	117
FIGURA 41. PUREZA DE PICO DE LA INYECCIÓN DEL MEDICAMENTO 1 EN AGUA A PH=7,0.....	118
FIGURA 42. CURVA DE CALIBRACIÓN POR HPLC. MEDIO: ÁCIDO CLORHÍDRICO PH 1,2.....	119
FIGURA 43. PERFIL DE DISOLUCIÓN PARA MEDICAMENTO INNOVADOR A PH= 7,0 POR HPLC.	120
FIGURA 44. PUREZA DE PICO DE LA INYECCIÓN DEL MEDICAMENTO GENÉRICO EN MEDIO BUFFER FOSFATO A PH=6,8.	121
FIGURA 45. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL MEDICAMENTO 3-A EN MEDIO BUFFER FOSFATO A PH= 6,8.	122
FIGURA 46. PERFIL DE DISOLUCIÓN MEDICAMENTO 3-A A PH= 6,8 POR HPLC.....	123
FIGURA 47. PUREZA DE PICO DE LA INYECCIÓN DEL MEDICAMENTO 3-A EN MEDIO BUFFER ACETATO A PH=4,5.	124
FIGURA 48. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL MEDICAMENTO GENÉRICO EN MEDIO BUFFER ACETATO PH= 4,5.	125
FIGURA 49. PERFIL DE DISOLUCIÓN PARA EL MEDICAMENTO 3-A EN MEDIO BUFFER ACETATO A PH= 4,5.	126
FIGURA 50. PUREZA DE PICO DE LA INYECCIÓN DEL MEDICAMENTO 3-A EN MEDIO HCL 0,060 N A PH=1,2.	127
FIGURA 51. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL MEDICAMENTO 3-A EN HCL A PH= 1,2.	128
FIGURA 52. PERFIL DE DISOLUCIÓN PARA EL MEDICAMENTO 3-A A PH= 1,2.....	129
FIGURA 53. PUREZA DE PICO DE LA INYECCIÓN DEL MEDICAMENTO 3-A EN AGUA A PH=7,0.	130
FIGURA 54. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL MEDICAMENTO 3-A EN AGUA A PH= 7,0.	130
FIGURA 55. PERFIL DE DISOLUCIÓN PARA EL MEDICAMENTO 3-A A PH= 7,0.....	132
FIGURA 56. COMPARACIÓN DE LOS PERFILES DE DISOLUCIÓN DE TIOLCHICÓSIDO DEL MEDICAMENTO 1 Y 3-A PARA EL MEDIO BUFFER FOSFATO A PH=6,8.	133
FIGURA 57. COMPARACIÓN DE LOS PERFILES DE DISOLUCIÓN DE TIOLCHICÓSIDO DEL MEDICAMENTO 1 Y 3-A PARA EL MEDIO BUFFER ACETATO A PH=4,5.	134
FIGURA 58. COMPARACIÓN DE LOS PERFILES DE DISOLUCIÓN DE TIOLCHICÓSIDO DEL MEDICAMENTO 1 Y 3-A PARA EL MEDIO ÁCIDO CLORHÍDRICO 0,060 N A PH=1,2.	135
FIGURA 59. COMPARACIÓN DE LOS PERFILES DE DISOLUCIÓN DE TIOLCHICÓSIDO DEL MEDICAMENTO 1 Y 3-A EN AGUA A PH 7,0.....	136
FIGURA 60. GRAFICAS DE CINÉTICA DE PRIMER ORDEN PARA TIOLCHICÓSIDO EN DISTINTOS MEDIOS.	139
FIGURA 61. CURVA DE CALIBRACIÓN DÍA 1. LINEALIDAD, VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA.....	144
FIGURA 62. CURVA DE CALIBRACIÓN DÍA 2. LINEALIDAD, VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA.....	145
FIGURA 63. CURVA DE CALIBRACIÓN DÍA 3. LINEALIDAD. VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA.....	146
FIGURA 64. CURVA DE CALIBRACIÓN EMPLEADA PARA LA METODOLOGÍA POR ENSAYO DE DISOLUCIÓN DE TIOLCHICÓSIDO EN LA EVALUACIÓN DE LA REPETIBILIDAD.....	155
FIGURA 65. CROMATOGRAMA Y GRÁFICO DE PUREZA DEL PICO DE TIOLCHICÓSIDO. PATRÓN DE THC. EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD	160
FIGURA 66. CROMATOGRAMA Y GRÁFICO DE PUREZA DEL PICO TIOLCHICÓSIDO. MUESTRA MEDICAMENTO INNOVADOR. EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD.	161
FIGURA 67. CROMATOGRAMA Y GRÁFICO DE PUREZA DEL PICO TIOLCHICÓSIDO. MUESTRA MEDICAMENTO GENÉRICO. EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD.....	162
FIGURA 68. COMPARACIÓN PERFILES DE DISOLUCIÓN PARA LA ESTABILIDAD. MUESTRA EN EL PRIMER DÍA Y MUESTRA ANALIZADA A LAS 24 HORAS.....	164
FIGURA 69. COMPARACIÓN PERFILES DE DISOLUCIÓN DE UNA MUESTRA VENCIDA Y UNA MUESTRA VIGENTE.	166
FIGURA 70. CROMATOGRAMA Y GRÁFICOS DE PUREZA DE MUESTRA. MUESTRA MEDICAMENTO 1.	168
FIGURA 71. CROMATOGRAMA Y GRÁFICOS DE PUREZA DE MUESTRA. MUESTRA MEDICAMENTO 2.	168

FIGURA 72. CROMATOGRAMA Y GRÁFICOS DE PUREZA DE MUESTRA. MUESTRA MEDICAMENTO 3-A.	169
FIGURA 73. CROMATOGRAMA Y GRÁFICOS DE PUREZA DE MUESTRA. MUESTRA MEDICAMENTO 4.	169
FIGURA 74. PERFILES DE DISOLUCIÓN DE TIOCOLCHICOSDIO PARA LAS DISTINTITAS MARCAS COMERCIALES.	172

INDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1. DATOS ELEMENTALES REQUERIDOS PARA VALIDACIÓN	54
TABLA 2. TABLA DE ACEPTACIÓN PARA FORMAS FARMACÉUTICAS DE LIBERACIÓN INMEDIATA DE LA USP. 60	60
TABLA 3. LISTADO DE ESPECIALIDADES FARMACÉUTICAS DE TIOLCHICÓSIDO REGISTRADAS EN LA GERENCIA SECTORIAL DE REGISTRO Y CONTROL.....	63
TABLA 4. CURVA DE CALIBRACIÓN. DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE TIOLCHICÓSIDO.	81
TABLA 5. CONCENTRACIONES DE TIOLCHICÓSIDO PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN.	87
TABLA 6. ADECUACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE TIOLCHICÓSIDO EN LAS MUESTRAS.	89
TABLA 7. CONTENIDOS DE TIOLCHICÓSIDO PARA LAS MUESTRAS ANALIZADAS..	90
TABLA 8. SOLUBILIDAD EL TIOLCHICÓSIDO EN AGUA Y MEDIO ÁCIDO.	91
TABLA 9. PORCENTAJE DISUELTO DE TIOLCHICÓSIDO EN MEDIO DE DISOLUCIÓN DE BUFFER FOSFATO A PH=6,8. MEDICAMENTO 1. ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE.....	94
TABLA 10. PORCENTAJE DISUELTO DE TIOLCHICÓSIDO EN MEDIO DE DISOLUCIÓN DE BUFFER ACETATO A PH=4,5 DEL MEDICAMENTO 1 POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE.	97
TABLA 11. PORCENTAJE DISUELTO DE TIOLCHICÓSIDO DEL MEDICAMENTO 1 EN MEDIO DE DISOLUCIÓN ÁCIDO CLORHÍDRICO A PH=1,2 POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE.	98
TABLA 12. PRECISIÓN DEL MÉTODO POR HPLC.	102
TABLA 13. PORCENTAJE DISUELTO DE TIOLCHICÓSIDO EN MEDIO DE DISOLUCIÓN DE BUFFER FOSFATO A PH=6,8 PARA EL MEDICAMENTO 1 POR HPLC.....	107
TABLA 14. PORCENTAJE DISUELTO DE TIOLCHICÓSIDO EN MEDIO DE DISOLUCIÓN DE BUFFER ACETATO A PH=4,5. MEDICAMENTO INNOVADOR POR HPLC.	111
TABLA 15. PORCENTAJE DISUELTO DE TIOLCHICÓSIDO EN MEDIO DE DISOLUCIÓN DE HCL 0,060 N A PH=1,2 PARA EL MEDICAMENTO 1 POR HPLC.....	116
TABLA 16. PORCENTAJE DISUELTO DE TIOLCHICÓSIDO EN AGUA A PH=7,0 PARA EL MEDICAMENTO INNOVADOR POR HPLC.	120
TABLA 17. PORCENTAJE DISUELTO DE TIOLCHICÓSIDO EN MEDIO DE DISOLUCIÓN DE BUFFER FOSFATO A PH=6,8. MEDICAMENTO 3-A POR HPLC.	123
TABLA 18. PORCENTAJE DISUELTO DE TIOLCHICÓSIDO EN MEDIO DE DISOLUCIÓN DE BUFFER ACETATO A PH=4,5. MEDICAMENTO 3-A POR HPLC.	126
TABLA 19. . PORCENTAJE DISUELTO DE TIOLCHICÓSIDO EN MEDIO DE DISOLUCIÓN DE HCL 0,060 N A PH=1,2. MEDICAMENTO 3-A POR HPLC,	128
TABLA 20. PORCENTAJE DISUELTO DE TIOLCHICÓSIDO EN MEDIO DE DISOLUCIÓN AGUA A PH=7,0 PARA EL MEDICAMENTO 3-A POR HPLC.	131
TABLA 21. COMPARACIÓN DE PERFILES DE DISOLUCIÓN DEL MEDICAMENTO 1 Y 3-A EN MEDIO BUFFER FOSFATO PH= 6,8.	133
TABLA 22. COMPARACIÓN DE PERFILES DE DISOLUCIÓN DEL MEDICAMENTO 1 Y 3-A EN MEDIO BUFFER ACETATO PH= 4,5	134
TABLA 23. COMPARACIÓN DE PERFILES DE DISOLUCIÓN DEL MEDICAMENTO 1 Y 3-A EN MEDIO ÁCIDO CLORHÍDRICO 0,060N A PH= 1,2.....	135
TABLA 24. COMPARACIÓN DE PERFILES DE DISOLUCIÓN DEL MEDICAMENTO 1 Y 3-A A PH= 7,0.....	136
TABLA 25. COMPARACIÓN DE LOS FACTORES DE SIMILITUD Y DIFERENCIA PARA LOS DIFERENTES MEDIOS.	137
TABLA 26. CONSTANTES DE DISOLUCIÓN PARA MEDICAMENTO INNOVADOR Y GENÉRICO EN DIFERENTES MEDIOS DE DISOLUCIÓN.	138

TABLA 27. CONDICIONES DE LA METODOLOGÍA PARA EL ENSAYO DE DISOLUCIÓN DEL TIOLCHICÓSIDO EN TABLETAS	141
TABLA 28. CONCENTRACIONES DE PATRONES DE TIOLCHICÓSIDO UTILIZADOS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN.	143
TABLA 29. CURVA DE CALIBRACIÓN. LINEALIDAD DÍA 1. TIOLCHICÓSIDO	144
TABLA 30. CURVA DE CALIBRACIÓN. LINEALIDAD DÍA 2. TIOLCHICÓSIDO	145
TABLA 31. CURVA DE CALIBRACIÓN. LINEALIDAD DÍA 3. TIOLCHICÓSIDO	146
TABLA 32. LINEALIDAD CURVAS DE CALIBRACIÓN DE TIOLCHICÓSIDO.....	147
TABLA 33. LINEALIDAD DEL MODELO DE REGRESIÓN.....	150
TABLA 34. EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN DEL SISTEMA Y DEL MÉTODO DE ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO. 152	
TABLA 35. EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN INTERMEDIA DEL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO. TIOLCHICÓSIDO.....	153
TABLA 36. COMPARACIÓN DE LA PRECISIÓN INTERMEDIA DEL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LOS PERFILES DE DISOLUCIÓN DE TIOLCHICÓSIDO.	153
TABLA 37. EVALUACIÓN DE LA REPETIBILIDAD DEL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO. TIOLCHICÓSIDO POR PERFIL DE DISOLUCIÓN.....	156
TABLA 38. COMPARACIÓN DE LA REPETIBILIDAD DEL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LOS PERFILES DE DISOLUCIÓN DE TIOLCHICÓSIDO.....	156
TABLA 39. RECUPERACIÓN DEL PORCENTAJE DISUELTO DE TIOLCHICÓSIDO. EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO.	158
TABLA 40. PORCENTAJE DISUELTO DE TIOLCHICÓSIDO OBTENIDO PARA LA MUESTRA EN EL PRIMER DÍA Y LA MUESTRA ANALIZADA A LAS 24 HORAS POR METODOLOGÍA DEL ENSAYO DE DISOLUCIÓN PARA TIOLCHICÓSIDO.....	163
TABLA 41. PORCENTAJES DISUELTO DE TIOLCHICÓSIDO PARA LOS PERFILES DE DISOLUCIÓN DE LAS DISTINTAS MARCAS COMERCIALES.....	170
TABLA 42. COEFICIENTES DE VARIACIÓN DE CADA MUESTRA OBTENIDOS DE LOS PERFILES DE DISOLUCIÓN.	171
TABLA 43. FACTOR DE SIMILITUD (F2) Y FACTOR DE DIFERENCIA (F1). COMPARACIÓN ENTRE LAS CURVAS DE TIOLCHICÓSIDO DEL MEDICAMENTO 1 Y LOS MEDICAMENTOS DE LAS DISTINTAS MARCAS COMERCIALES. (2, 3-A Y 4).....	172

INDICE DE GRÁFICOS

	Páginas
GRÁFICOS 1. ANÁLISIS DE RESIDUALES ESTANDARIZADOS CONTRA VALORES AJUSTADOS.....	149
GRÁFICOS 2. LINEALIDAD DEL TIICOLCHICÓSIDO. SUPERPOSICIÓN DE CURVAS DE LINEALIDAD DÍA 1, 2 Y 3.	151

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

THC	Tiocolchicósido
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
BPM	Buenas Practicas de Manufacturas
SCB	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
RSD	Desviación Estándar Relativa
Q	Porcentaje de contenido declarado
CV	Coficiente de Variación
DS	Desviación Estándar
PA	Angulo de pureza de la señal cromatográfica .Curva de Similitud del Grafico de Pureza.
TH	Angulo Umbral de la señal cromatográfica.
FDA	U.S Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration.

I. INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica promueve la fabricación y comercialización de medicamentos para el tratamiento y prevención de enfermedades, asegurando la calidad, eficacia y seguridad de los productos farmacéuticos durante todo su período de validez, con la finalidad de que sean apropiados para su uso previsto y que no sean riesgosos para los pacientes. (1)

Para que los productos farmacéuticos puedan ser comercializados deben cumplir con los criterios de aceptación dados por monografías oficiales, como la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) o Farmacopea Europea (EP), que establecen normas, procedimientos y/o métodos analíticos que cumple con las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) garantizando la eficacia, seguridad y la calidad del medicamento.

El análisis de medicamentos debe cumplir con varias determinaciones para ser distribuido a nivel comercial. La cantidad declarada por el fabricante debe encontrarse dentro de los límites establecidos, en el caso de formas farmacéuticas sólidas se hace necesario confirmar de forma *in vitro* la disolución del fármaco en un tiempo determinado, este método o prueba se conoce como ensayo de disolución.

Esta metodología analítica permite evaluar los procesos de fabricación de un fármaco, desde el comienzo del desarrollo de la formulación, hasta en las fases posteriores a su fabricación, permitiendo el estudio de los mecanismos de liberación del principio activo y la obtención de un perfil de disolución predeterminado y reproducible. Además, permite determinar el comportamiento de la disolución del fármaco y el desempeño del producto de una gran variedad de formas

farmacéuticas. (2) Hoy en día los laboratorios farmacéuticos deben demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables y adecuados, por este motivo deben ser evaluados y sometidos a pruebas para asegurar que producen resultados válidos y coherentes. Es por eso que los métodos analíticos luego de ser desarrollados, deben ser validados para así poder garantizar que el método cumple con las BPM, lo cual asegura a los entes regulatorios que el medicamento es seguro, eficaz y de calidad. (3)

La validación de un método analítico es un procedimiento que permite demostrar mediante estudios de laboratorio que un método analítico posee las características de desempeño adecuados para el funcionamiento del procedimiento, cumpliendo con los requisitos necesarios para su aplicación analítica. Esta validación debe realizarse bajo las condiciones aprobadas por monografías oficiales.

La Farmacopea de los Estados Unidos 38-NF 33 (USP 38) establece en el capítulo < 1225 > de "Validación de Procedimientos Farmacopeicos" las pautas a seguir a la hora de validar una metodología analítica.

Existen productos farmacéuticos que no poseen procedimientos y/o métodos reportados en los textos oficiales, entre ellos se encuentra el Tiocolchicósido. Este fármaco ofrece efectos analgésicos y anti-inflamatorios. En Venezuela este medicamento es ampliamente utilizado como relajante muscular y puede adquirirse sin prescripción médica.

En este trabajo se presenta el desarrollo y validación de una metodología analítica para el ensayo de disolución de tabletas de Tiocolchicósido, con el propósito de conocer como ocurre el proceso de disolución del fármaco *in vitro* y así poder garantizar la calidad de este medicamento.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

Existen diferentes métodos de análisis que dependen de la forma farmacéutica del medicamento a estudiar para la determinación de la calidad. En este capítulo se incluye, los diferentes tipos de formas farmacéuticas así como conceptos, condiciones, procedimientos y diseños, que son herramientas necesarias para comprender, analizar y crear el método analítico para el principio activo de interés.

II.1 Formas farmacéuticas

Una forma farmacéutica es un producto farmacéutico proveniente de la transformación de una droga o sustancia activa, mediante procedimientos tecnológicos específicos que le proporcionan caracteres físicos y morfológicos particulares para facilitar su administración y acción farmacológica. (4)

II.1.1 Clasificación de formas farmacéuticas

II.1.1.1 Formas farmacéuticas líquidas (4)

Las formas farmacéuticas líquidas para ser administradas por vía oral comprenden las soluciones acuosas, jarabes, elixires, emulsiones y suspensiones. Las propiedades de este tipo de preparaciones dependen de los solventes o vehículos utilizados, de los agentes de sabor, olor, viscosidad y de la intención terapéutica.

II.1.1.2 Formas farmacéuticas semisólidas (4)

Son sistemas homogéneos o heterogéneos, dentro de ellos se encuentran los geles, cremas, ungüentos, pastas, polvos.

II.1.1.3 Formas farmacéuticas transdérmicas (5)

Los sistemas transdérmicos son formas de dosificación ideados para conseguir el aporte percutáneo de principios activos a una velocidad programada, o durante un periodo de tiempo establecido.

II.1.1.4 Formas farmacéuticas sólidas (5)

Son unidades de dosificación (tabletas o comprimidos) que contienen uno o varios principios activos. Generalmente se obtienen por comprensión mecánica de granulados o de mezclas de polvos, con la adición, en la mayoría de los casos, de diversos excipientes.

Podemos clasificar a las tabletas de administración oral en tres grupos:

1. Tabletas no recubiertas.
2. Tabletas recubiertas.
 - Con recubrimiento de azúcar.
 - Con recubrimiento de película fina.
3. Tabletas especiales.
 - Efervescentes.
 - De disolución en la cavidad bucal: tabletas bucales y sublinguales
 - Con recubrimiento gastroresistente o entérico.

- De capas múltiples.
- De liberación controlada o modificada, que puede ser sostenida, retardada o prolongada, lenta, rápida o acelerada, o pulsátil.
- Masticables.

En formas farmacéuticas sólidas, los ensayos de disolución permiten evaluar el proceso durante su fabricación, e identificar las variables críticas durante ese proceso. También permite comparar y estudiar la calidad del producto farmacéutico además de proporcionar valiosa información a la hora de predecir la biodisponibilidad y bioequivalencia *in vitro*.

II.2 Ensayos de disolución

Los ensayos de disolución son pruebas fisicoquímicas *in vitro* que permiten estudiar el desempeño del producto farmacéutico. Esta metodología analítica puede ser aplicada en una gran variedad de formas farmacéuticas. (6) El término disolución se define como una mezcla homogénea (monofásica) de dos o más sustancias, en la que el componente mayoritario suele denominarse disolvente y el o los componentes minoritarios (sustancias disueltas) se llaman solutos. (7)

Inicialmente los ensayos de disolución se desarrollaron para formas farmacéuticas orales, pero ahora el rol del ensayo de disolución se ha extendido al estudio de la liberación del principio activo de otras formas farmacéuticas como sistemas semisólidos tópicos, transdérmicos y supositorios.

Por otra parte el ensayo de disolución es empleado desde el comienzo del desarrollo de la formulación del medicamento y utilizado en fases posteriores a éste, porque

permite el estudio de los mecanismos de liberación del principio activo en las formulaciones de liberación controlada y no controlada permitiendo la obtención de un perfil de disolución predeterminado y reproducible. (8)

II.2.1 Ensayos de disolución en formas farmacéuticas sólidas

Los ensayos de disolución se comenzaron a realizar principalmente debido a que los estudios de disgregación no garantizaban que los medicamentos liberaran el fármaco, ya que los comprimidos deben disgregarse para luego disolverse y ser absorbidos en el tracto gastrointestinal (Figura 1).

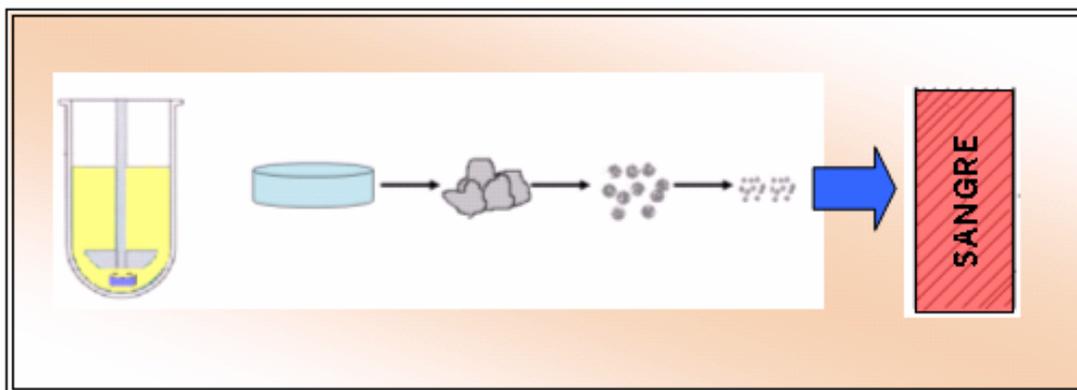


Figura 1. Proceso de disolución de una forma farmacéutica sólida.

En la Figura 1 se observa como ocurre la desintegración de la forma farmacéutica sólida fragmentándose en partes más pequeñas o gránulos, al hacer contacto con el medio disolvente, hasta llegar a disgregarse de tal manera que reduce los gránulos a partículas mucho más pequeñas para así dispersarse entre las moléculas del disolvente, formando una mezcla homogénea, que pueda ser absorbida por el tracto gastrointestinal y ocurrir así la difusión del principio activo en solución hacia el lugar de absorción.

El proceso de liberación de un fármaco, contenido en una forma farmacéutica sólida, mayoritariamente de administración oral, se compone de varios subprocesos: disgregación de la forma agregada, disolución del fármaco en el medio, y por último, en el supuesto de haber sido administrado el medicamento a un organismo vivo, la difusión del principio activo en solución hacia el lugar de absorción (paso a través de la membrana celular). (9)

En el tracto gastrointestinal, un fármaco que se disuelve es absorbido instantáneamente, por lo que la concentración de la disolución del principio activo en el líquido de la zona de absorción, está siempre muy lejos de la concentración de saturación. Cuando se cumple esta condición, es decir, la concentración de soluto es inferior al 10-20% de la concentración de saturación, se habla de condición de Exceso de Medio, también conocida con el anglicismo de condición *sink*.

II.2.3 Condición de exceso de medio (Condición *Sink*)

La Condición *Sink* comprende todas aquellas técnicas que, de una u otra manera permiten la eliminación de la sustancia disuelta desde el medio de disolución a medida que ésta se va disolviendo, con el fin de mantener la concentración constante y aun nivel muy bajo.

La concentración de una disolución expresa la proporción directa o indirecta que existe entre el soluto y el disolvente. Cuando la cantidad de soluto es relativamente grande respecto al disolvente se habla de disolución concentrada, mientras que si el soluto se encuentra en una proporción baja se denomina disolución diluida. (7)

Las condiciones *sink* existen cuando el volumen del medio de disolución es de 5 a 10 veces mayor que el volumen requerido para hacer una solución saturada de un

fármaco. Si el fármaco es poco soluble en agua, es necesaria una gran cantidad de medio de disolución para asegurar la condición *sink*. Para minimizar el efecto del gradiente de concentración y mantener estas condiciones, la concentración del principio activo no debe exceder del 10%-15% de su máxima solubilidad en el medio de disolución seleccionado.

Los procesos de disolución de un fármaco se rigen por la ecuación de Noyes-Whitney. En 1897 Noyes y Whitney (Ecuación 1) realizaron experimentos de disolución con sustancias moderadamente solubles en agua. Afirmaron que “la velocidad a la cual una sustancia sólida se disuelve en una solución es proporcional a la diferencia entre la concentración de esta solución y la concentración de la solución saturada.”

$$\frac{dQ}{dt} = K_{NW} \cdot S \cdot (C_S - C_t) \quad \text{Ecuación 1}$$

$\frac{dQ}{dt}$ = Velocidad de disolución

K_{NW} = Constante de disolución

S = Área superficial del sólido

C_S = Concentración de la solución saturada

C_t = Concentración de la solución a cualquier tiempo

Esta ecuación describe la velocidad del proceso de disolución de una sustancia en medio líquido.

Bajo condiciones *Sink* la constante de velocidad de disolución, se puede calcular fácilmente y representa un proceso cinético de orden cero, este orden cinético se

observa cuando pequeñas cantidades de producto sólido se disuelven en un gran volumen de disolvente. La cantidad de sólido es tan pequeña con relación al volumen total del líquido, que la concentración del fármaco disuelto no influye prácticamente, en el proceso cinético. (2)

II.2.3.1 Procesos cinéticos de los perfiles de disolución

II.2.3.1.1 Cinética de Orden cero

Este orden cinético puede observarse en los casos en la cual se procura disolver una pequeña cantidad de producto sólido en un gran volumen de disolvente. En un sistema como este, la cantidad de sólido es tan pequeña con relación al volumen total del líquido, que la concentración del fármaco disuelto no influye, prácticamente, en el proceso cinético, por lo tanto la reacción puede considerarse de pseudo orden cero. En estos casos la velocidad de disolución es independiente de la concentración del fármaco y puede presentarse cuando la cantidad disuelta no exceda el 10% de la solubilidad del producto en el disolvente ($C < 0.1 < C$). (10)

De la ecuación de Noyes-Whitney (ecuación 1), se puede simplificar la velocidad del proceso de disolución, bajo determinadas condiciones (cuando se trabaja en condiciones *sink*) en:

$$\frac{dQ}{dt} = K_{NW} \cdot S \quad (\text{Ecuación 2})$$

Si la superficie (S) del sólido expuesta al medio de disolución es constante, el proceso de disolución sigue una **cinética de orden cero** y la ecuación se reduce a (ecuación 3).

$$\frac{dQ}{dt} = K_{NW} \quad (\text{Ecuación 3})$$

La integral de la ecuación diferencial, si se considera la cantidad de fármaco disuelto, es la expresión (ecuación 4).

$$Q = K_0 \cdot (t - t_0) \quad (\text{Ecuación 4})$$

Si consideramos las cantidades de fármaco remanente en la forma farmacéutica que lo contiene, la expresión sería la siguiente:

$$(Q_\infty - Q) = -K_0 \cdot (t - t_0) + Q_\infty \quad (\text{Ecuación 5})$$

Siendo Q_∞ la cantidad de fármaco disuelta a tiempo infinito, que coincide con la dosis si la disolución es total; Q la cantidad disuelta a cada tiempo; $(Q_\infty - Q)$ la cantidad de fármaco remanente o no disuelto; K_0 la constante de disolución de orden cero, y t_0 el período de latencia o el tiempo que tarda en iniciarse el proceso de disolución. (9)

Es posible observar este tipo de cinética en productos que se disuelven muy lentamente y en los cuales, si bien el orden total corresponde a un proceso de primer orden, la parte inicial de la curva de disolución corresponde a una cinética de pseudo orden cero. Conforme a esta expresión, la velocidad con que el sólido se disuelve en el disolvente es constante con el tiempo e independiente de la concentración del soluto. Al representar la cantidad que se va disolviendo (Q) en función del tiempo, se obtiene un gráfico con una recta cuya pendiente o inclinación es la constante de velocidad del proceso, como se indica en la Figura 2: (10)

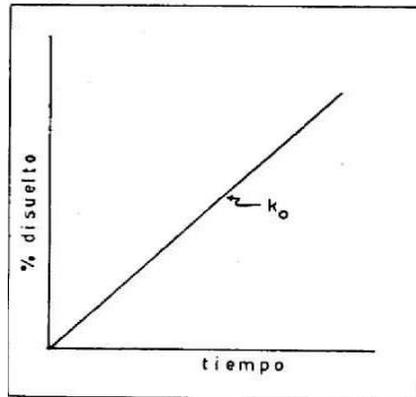


Figura 2. Cantidad disuelta en función del tiempo en una cinética de orden cero.

II.2.3.1.2 Cinética de orden uno

Este tipo de cinética es probablemente la más frecuente en los métodos llamados "*non sink*". En estos métodos, a medida que la cantidad de fármaco en estado sólido va disminuyendo, la solución se va enriqueciendo con el soluto. Al ir aumentando la concentración de la solución se enriquece la cinética de orden uno, en el cual la velocidad de disolución es función de la concentración de fármaco disuelto. (10)

La cinética de primer orden implica que la superficie (S) de fármaco expuesta al medio de disolución varía a lo largo del proceso de disolución en función de la cantidad de fármaco remanente, sin disolver.

$$S = k \cdot (Q_{\infty} - Q) \quad (\text{Ecuación 6})$$

La ecuación de Noyes-Whitney explica el proceso de disolución de los fármacos, cuando la cinética es de orden uno, queda simplificada a la ecuación:

$$\frac{dQ}{dt} = -K_d \cdot (Q_\infty - Q) \quad (\text{Ecuación 7})$$

La integral de la expresión diferencial es una ecuación exponencial:

$$(Q_\infty - Q) = Q_\infty \cdot e^{-K_d \cdot (t-t_0)} \quad (\text{Ecuación 8})$$

Donde Q_∞ es la cantidad de fármaco disuelta tiempo infinito, que coincide con la dosis si la disolución es total; Q es la cantidad de fármaco disuelta a cada tiempo; $(Q_\infty - Q)$ es la cantidad de fármaco remanente en el lugar de disolución, y K_d es la constante de disolución.

La ecuación 8 se puede expresar en una transformada logarítmica:

$$\ln(Q_\infty - Q) = \ln Q_\infty - K_d(t - t_0) \quad (\text{Ecuación 9})$$

En los procesos de primer orden la cantidad de fármaco varía con el tiempo (Figura 3)

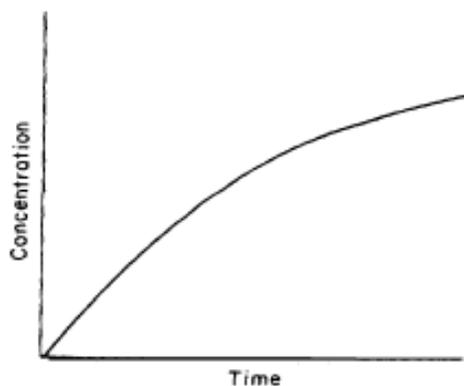


Figura 3. Cantidad disuelta en función del tiempo en una cinética de orden uno.

II.2.4 Perfiles de disolución

Los perfiles de disolución permiten predecir la liberación del fármaco *in vivo* a través de la representación de los porcentajes acumulado de fármaco disuelto en función del tiempo, en formas farmacéuticas orales. (11) Se utilizan durante la optimización de la forma farmacéutica, pruebas de estabilidad, control del proceso de producción y el establecimiento de similitudes entre una nueva formulación genérica y una ya existente. Es una guía útil para orientar el desarrollo de una nueva formulación farmacéutica. (12)

II.2.4.1 Comparaciones de los perfiles de disolución

Las pruebas de disolución comparativas se realizan utilizando productos de prueba y referencia bajo una variedad de condiciones de prueba. Las condiciones de prueba pueden incluir diversos medios de disolución (pH 1 a 6,8), la adición de un surfactante y el uso de los aparatos 1 y 2 con agitación variada. La comparación de perfiles de disolución debe realizarse bajo condiciones idénticas para cada producto. (12)

II.2.4.1.1 Enfoque independiente de modelo utilizando un factor de similitud

Un enfoque independiente de modelo sencillo utiliza un factor de diferencia (f_1) y un factor de similitud (f_2) para comparar los perfiles de disolución.

II.2.4.1.1.1 Factor de diferencia (f_1)

Calcula la diferencia porcentual (%) entre las dos curvas en cada punto temporal y es una medida del error relativo entre las dos curvas. (Ecuación 10) (13)

II.2.4.1.1.2 Factor de similitud (f_2)

Es una transformación de raíz cuadrada recíproca logarítmica de la suma del error cuadrado y es una medición de la similitud en la disolución porcentual (%) entre las dos curvas. (Ecuación 11) (13)

$$f_1 = \left\{ \frac{\sum_{t=1}^n n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n n R_t} \right\} \times 100 \quad \text{Ecuación 10.}$$

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \right\} \times 100 \quad \text{Ecuación 11.}$$

Donde n es el número de puntos de muestreo, R_t es el valor de disolución en cada punto de muestreo para la formulación de referencia en el tiempo t , y T_t es el valor de disolución de cada punto de muestreo para la formulación de prueba en el tiempo t .

Dos curvas se consideren similares cuando los valores de f_1 están cerca de 0, y los valores de f_2 cerca de 100. Por lo general, los valores de f_1 de hasta 15 (0-15) y los valores de f_2 mayores de 50 (50-100) aseguran la igualdad o equivalencia de las dos curvas.

Este método independiente de modelo es más conveniente para la comparación de los perfiles de disolución cuando hay tres a cuatro o más puntos temporales de disolución disponibles. (13)

Las condiciones para la realización de las pruebas de disolución es el uso de aparatos de disolución sencillos, robustos, normalizados y que se realicen a nivel mundial. Por lo cual se deben utilizar los aparatos de disolución *in vitro* descritos en la USP salvo que no sean satisfactorios para la prueba. Solo se deberán considerar las mediciones, de los productos, si se alcanza una disolución del 85% en ambos productos. Para permitir el uso de los datos de los medios, los coeficientes de variación en los puntos temporales más tempranos (p.ej., 15 minutos) no deberá ser más del 20% y en otros puntos temporales no deberá ser más del 10%. (13)

II.2.5 Aparatos de disolución descritos en la USP

Los aparatos de disolución se encuentran descritos en el apartado <711> "Disolución " de la USP: (14)

Aparato 1: Cesta rotatoria o Canastilla.

Aparato 2: Paleta.

Aparato 3: Cilindro Oscilante.

Aparato 4: Celda de Flujo.

II.2.5.1 Aparato 1: Cesta rotatoria o canastilla

El aparato consta de: un vaso, con o sin tapa, de vidrio u otro material inerte y transparente; un motor, un eje propulsor metálico y una canastilla cilíndrica. El vaso está parcialmente sumergido en un baño de agua adecuado de cualquier dimensión conveniente o recibe calor de un dispositivo adecuado. El vaso es cilíndrico y de fondo semiesférico. Posee en un tubo de acero inoxidable tipo 316 o de otro material inerte de 6-10.5 mm de diámetro, una cesta rotatoria de con malla 40. Algunos inconvenientes que se presentan con el aparato 1: (1) Deformación de la cesta, (2)

Obstrucción de la malla por parte de partículas o excipientes, (3) Extrema sensibilidad de los gases disueltos, (4) Flujo inadecuado debido a partículas flotantes. En la Figura 4 podemos observar otras especificaciones de los elementos de agitación de la canastilla.

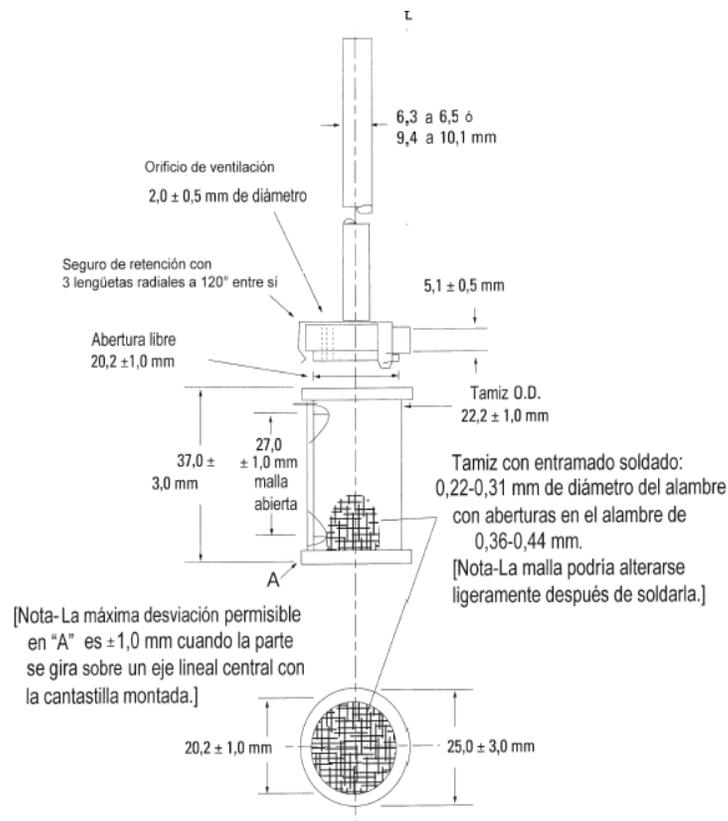


Figura 4. Especificaciones de los elementos de agitación de la canastilla. (14)

II.2.5.2 Aparato 2: Método de la Paleta

Contiene las mismas partes del Aparato 1, con excepción de que se usa una paleta compuesta por un aspa y un eje como elemento de agitación. La paleta mide entre 3 y 5 mm de espesor y 83 mm de diámetro y está recubierta con un polímero

fluorocarbonado. La paleta cumple con las especificaciones que se observan en la Figura 5.

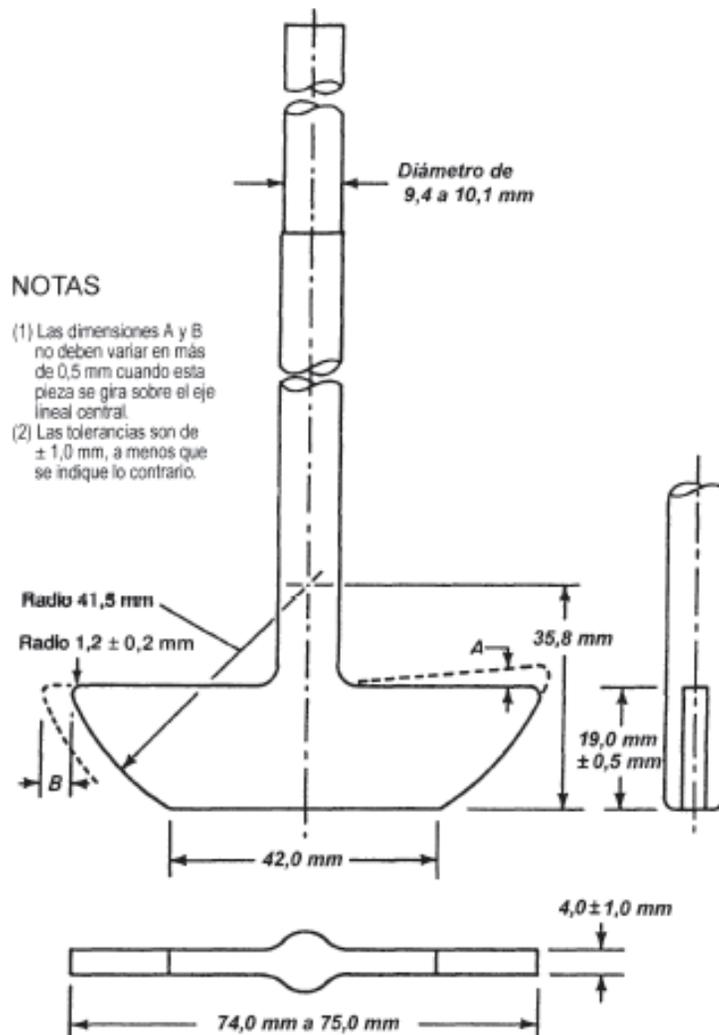


Figura 5. Elemento de agitación de la paleta

II.2.5.3 Aparato 3: Cilindro Oscilante

El equipo se compone de un grupo de vasos cilíndricos de vidrio de fondo plano, un grupo de cilindros oscilantes de vidrio, accesorios de un material inerte y mallas de un material adecuado no absorbente ni reactivo, que se fijan a la parte superior e

inferior de los cilindros oscilantes; un motor y una transmisión que hacen oscilar los cilindros. Los vasos se sumergen en un baño de agua que permita mantener la temperatura a $37 \pm 0,5$ °C durante la prueba.

II.2.5.4 Aparato 4: Celda de Flujo

El equipo se compone de un depósito y una bomba para el medio de disolución, una celda de flujo y un baño de agua que mantiene el medio de disolución a $37 \pm 0,5$ °C. La celda de flujo es de un material transparente e inerte, donde el medio de disolución es desplazado en dirección ascendente, por la bomba la cual debe suministrar un flujo constante.

II.2.6 Aspectos Generales del Ensayo de Disolución

Las principales funciones del ensayo de disolución podrían resumirse en: (2)

- Optimización de la efectividad de la forma farmacéutica: Durante el desarrollo de un producto y en la evaluación de su estabilidad.
- Guía para el desarrollo de nuevas formulación en las diferentes etapas y procesos de fabricación.
- Verificación rutinaria de la calidad de la producción para asegurar la uniformidad entre los lotes producidos.
- Ayuda a seleccionar excipientes.
- Asiste en cumplir los requisitos legales.
- Ayuda a controlar los parámetros de manufactura:
 - a. Presión de Compresión
 - b. Densidad de la capa
 - c. Solvente residual
 - d. Nivel de humedad

- Pruebas de Control de Calidad.

II.2.7 Pruebas de disolución de formas farmacéuticas sólidas de liberación inmediata

La absorción de un fármaco desde una forma de dosificación sólida tras la administración oral depende de la liberación de la sustancia medicinal, la disolución o solubilización del fármaco bajo condiciones fisiológicas y de la permeabilidad por el sistema gastrointestinal. Debido a la naturaleza crítica de estos primeros dos pasos, la disolución *in vitro* puede ser relevante a la predicción del rendimiento *in vivo*. En base esta consideración general, se utilizan las pruebas de disolución *in vitro* para las formas de dosificación oral sólidas, como comprimidos y capsulas, para (1) evaluar la calidad de un producto medicinal lote a lote; (2) guiar el desarrollo de nuevas formulaciones; y (3) asegurar la calidad y el rendimiento del producto después de ciertos cambios, tales como cambios en la formulación, el proceso de fabricación, el sitio de fabricación y el aumento en escala del proceso de fabricación. (15)

Se debe considerar la información concerniente a la solubilidad, permeabilidad, disolución y farmacocinética de un fármaco al definir las especificaciones de las pruebas de disolución para el proceso de aceptación del fármaco. También se debe utilizar este conocimiento para asegurar la equivalencia continuada del producto, así como para asegurar la igualdad del producto bajo ciertos cambios de escala y posteriores a la aprobación.

II.2.8 Sistemas de Clasificación Biofarmacéutica

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB) es un marco científico para clasificar a las sustancias medicamentosas (principio activo) basándose en su solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal. Cuando se combina con la disolución del producto farmacéutico, el SCB toma en cuenta tres factores principales que rigen la tasa y el grado de la absorción de los medicamentos de liberación inmediata de formas farmacéuticas sólidas: la disolución, la solubilidad y la permeabilidad intestinal.

Según el SCB, las sustancias medicamentosas se clasifican de la siguiente manera:

Clase 1: Fármacos de Alta Solubilidad- Alta Permeabilidad.

Clase 2: Fármacos de Baja Solubilidad- Alta Permeabilidad.

Clase 3: Fármacos de Alta Solubilidad- Baja Permeabilidad.

Clase 4: Fármacos de Baja Solubilidad- Baja Permeabilidad. (16)

Esta clasificación puede ser usada como base para establecer las especificaciones de disolución *in vitro*. El enfoque de SCB puede usarse para justificar las bioexenciones a los ensayos de biodisponibilidad para las sustancias medicamentosas altamente solubles y altamente permeables (clase 1) en formas farmacéuticas orales sólidas de liberación inmediata que presentan disolución *in vitro* rápida usando los métodos de ensayo recomendados por la USP. Los métodos recomendados para determinar la solubilidad, la permeabilidad y la disolución *in vitro* se discuten a continuación.

II.2.8.1 Solubilidad

La solubilidad de un fármaco se determina disolviendo la dosis unitaria más alta de fármaco en 250 mL de una solución buffer a un pH entre 1,0 y 8,0. Se considera que un medicamento es altamente soluble cuando la dosis de mayor concentración es soluble en 250 mL o menos de medio acuoso. El volumen estimado de 250 mL se deriva de los protocolos típicos de los estudios de bioequivalencia que prescriben la administración de un producto farmacéutico a voluntarios humanos en ayunas con un vaso (aproximadamente 8 onzas) de agua.

II.2.8.2 Permeabilidad

La permeabilidad se basa indirectamente en el grado de absorción (fracción de dosis absorbida) de una sustancia medicamentosa en humanos y directamente en las mediciones de la tasa de transferencias de masa a través de la membrana intestinal humana. Alternativamente, pueden usarse sistemas no humanos capaces de predecir el grado de absorción del fármaco en los humanos (por ejemplo, métodos de cultivo de células epiteliales *in vitro*). Se considera una sustancia medicamentosa altamente permeable cuando se determina que el grado de la absorción en los humanos es un 90% o más de una dosis administrada con base en una determinación de balance de masas o en comparación con una dosis intravenosa de referencia.

Los siguientes métodos pueden usarse para determinar la permeabilidad de una sustancia medicamentosa desde el tracto gastrointestinal:

- a. Estudios de perfusión intestinal *in vivo* en humanos.

- b. Estudios de perfusión intestinal *in vivo* o *in situ* usando los modelos animales apropiados.
- c. Estudios de permeabilidad *in vitro* usando tejidos intestinales extirpados de humanos o de animales
- d. Estudios de permeabilidad *in vitro* a través de una monocapa de un cultivo de células epiteliales.

II.2.8.3 Disolución

Un producto de liberación inmediata se considera de disolución rápida cuando no menos del 85% de la cantidad de la sustancia medicamentosa señalada en la etiqueta se disuelve en 30 minutos, usando Aparato I de la USP a 100 rpm (o el Aparato II a 50 rpm) en un volumen de 900 mL o menos en cada uno de los medios siguientes: (1) 0,1 N HCl o Líquido Gástrico Simulado USP sin enzimas; (2) una solución buffer de pH 4,5; y (3) una solución buffer de pH 6,8 o Líquido intestinal Simulado USP sin enzimas.

II.2.3 Diseño de la metodología analítica

Las especificaciones para desarrollar y validar los procedimientos de disolución aparecen en el apartado <1092> de la USP. Estos procedimientos son pruebas de desempeño aplicable a muchas formas farmacéuticas, que aporta datos que permiten la aceptación o rechazo, con respecto a los criterios de aceptación, los cuales se basan en una decisión de la autoridad regulatoria. (17)

Los procedimientos de disolución requiere de un aparato, un medio de disolución y condiciones de prueba que provean un método discriminatorio lo suficientemente resistente (capaz de distinguir cambios significativos en la composición o en el

proceso de fabricación que puede esperarse afecten el desempeño *in vivo*) y reproducible para las operaciones diarias y capaz de ser transferidos entre laboratorios.

Los criterios de aceptación deben ser representativos de varios lotes con la misma composición nominal, el mismo proceso de fabricación y deben también ser representativos del desempeño en estudios de estabilidad.

Con respecto a la estabilidad, la prueba de disolución debe reflejar adecuadamente los cambios de mayor importancia que sufre el fármaco en el tiempo, causados por la temperatura, humedad, fotosensibilidad y otros factores de estrés.

Una prueba diseñada adecuadamente debe dar como resultado datos que no sean demasiado variables así como no deben estar asociados a pruebas de estabilidad significativas de la solución analítica. Los resultados de disolución pueden considerarse demasiado variables si la desviación estándar relativa (RSD, por sus siglas en inglés) es más de 20% a los 10 minutos o menos y más de 10% a tiempos mayores. (17)

Cuando el método para el ensayo de disolución no aparece reportado en la USP es necesario realizar el desarrollo del mismo. A continuación se presentan los aspectos a considerar para el diseño de la metodología analítica.

II.3.1 Medios de disolución

Dos propiedades claves del producto farmacéutico son la solubilidad y la estabilidad del fármaco en solución en función del valor de pH. Cuando se selecciona la composición del medio, se debe evaluar la influencia de las soluciones

amortiguadoras, el valor de pH y los surfactantes respecto a la solubilidad y la estabilidad del fármaco.

Por lo general, cuando se desarrolla un procedimiento de disolución, una meta es tener condiciones de exceso de medio (condición *sink*), definido como el volumen del medio igual a por lo menos tres veces el requerido para formar una solución saturada del fármaco. Cuando la condición de exceso de medio está presente, existirán mayores probabilidades de que los resultados de disolución reflejen las propiedades de la forma farmacéutica. (16)

Según el SCB para productos farmacéuticos de liberación inmediata se consideran los estudios de disolución bajos los siguientes medios: (1) 0,1 N HCl o líquido gástrico sUSP sin enzimas; (2) una solución buffer de pH 4,5; y (3) una solución buffer de pH 6,8 o líquido intestinal simulado USP sin enzimas. (16)

El apartado <1092> indica que los medios típicos para disolución pueden incluir los siguientes elementos (no se mencionan en orden de preferencia): ácido clorhídrico diluido, soluciones amortiguadoras en el rango de pH fisiológico entre 1,2 y 7,5, fluido intestinal o gástrico simulados (con o sin enzimas), agua y surfactantes. (17)

II.3.2 Volúmenes de medio de disolución

Para aparatos con canastillas o paletas, el volumen del medio de disolución normalmente se encuentra entre 500 mL a 1000 mL, siendo 900 mL el volumen más común. Puede aumentarse el volumen entre 2 y 4 L, empleándose recipientes más

grandes y dependiendo de la concentración y de la condición de exceso de medio del fármaco; el empleo de este procedimiento debe justificarse. (16)

II.3.3 Elección del aparato disolutor

La elección del aparato se basa en el conocimiento que se tenga sobre el diseño de la formulación y los aspectos prácticos del desempeño de la forma farmacéutica en el sistema de la prueba *in vitro*. El aparato 1 y aparato 2 son los que se utilizan con mayor frecuencia para las formas farmacéuticas sólidas.

II.3.4 Agitación

Para cápsulas o tabletas de liberación inmediata, los aparatos de mayor uso son el aparato 1 a 100 rpm o el aparato 2 a 50 o 75 rpm.

II.3.5 Duración del ensayo de disolución

Para las formas farmacéuticas de liberación inmediata, la duración del procedimiento es usualmente entre 30 y 60 minutos. De los cuales se deben seleccionar suficientes tiempos para una adecuada caracterización de la fase ascendente y de la fase de meseta de la curva de disolución. De acuerdo con el SCB los fármacos altamente solubles y de alta permeabilidad formulados como productos que se disuelven rápidamente no requieren estar sujetos a un perfil de comparación si demuestran una liberación de 85% o más de la sustancia activa dentro de 15 minutos. Para estos tipos de productos solamente se requiere una prueba de un solo punto. Sin embargo, la mayoría de los productos no caen dentro de esta categoría. Los perfiles de disolución de productos de liberación inmediata

por lo general presentan un incremento gradual que alcanza entre 85% y 100% en un período de aproximadamente entre 30 y 45 minutos. De este modo, los tiempos de disolución en el rango de 15, 20, 30, 45 y 60 minutos son comunes para la mayor parte de los productos de liberación inmediata. (16)

II.3.6 Muestreo

En el muestreo anual se emplean jeringas de plásticos o de vidrio, una cánula de acero inoxidable que usualmente es curva para permitir el muestreo del vaso, un filtro y/o un soporte para el filtro.

Habitualmente se requiere la filtración de las muestras de disolución para prevenir que las partículas no disueltas del fármaco entren en la muestra en análisis y luego se disuelvan. También, la filtración remueve los excipientes insolubles que de otra manera pueden causar un fondo o turbidez significativos. (16)

II.3.7 Análisis químico de las muestras obtenidas en el ensayo de disolución

Usualmente la valoración de una muestra de disolución es una determinación espectrofotométrica o por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). El método preferido de análisis es la determinación espectrofotométrica puesto que los resultados se pueden obtener rápidamente, el análisis es sencillo y se emplean menos disolventes. (16)

II.3.7.1 Espectrofotometría de Absorción molecular Ultravioleta y Visible.

La espectroscopia molecular se emplea mucho en la identificación y determinación de muchas especies inorgánicas, orgánicas y bioquímicas. La espectroscopia de absorción molecular ultravioleta y visible se emplea en el análisis cuantitativo y es probable que sea la técnica más utilizada. (18)

La absorción de radiación ultravioleta y visible por parte de las moléculas ocurre en una o más bandas de absorción electrónicas muy juntas, que consisten en un gran número de líneas de rotación y vibración relacionados con los estados electrónicos excitados de las moléculas.

La absorción de radiación por moléculas orgánicas resulta de la interacción de los fotones y electrones que participan de manera directa en la formación de enlaces o que se localizan en torno a átomos como los de oxígeno, azufre, nitrógeno y halógenos. Depende de la fortalezas de los enlaces de sus electrones y absorben en la región de longitud de onda entre 180 y 780 nm.

Los grupos funcionales orgánicos no saturados que absorben en las regiones ultravioleta y visible se denominan cromóforos. Los compuestos orgánicos saturados que contienen heteroátomos, como el oxígeno, nitrógeno, azufre o halógenos, poseen electrones no compartidos que pueden excitarse absorbiendo radiación en el intervalo de 170 a 250 nm. En ocasiones, la absorción en esta región se emplea para determinar compuestos que contienen halógenos y azufre. Las medidas espectrofotométricas con radiación ultravioleta son útiles para la detección de grupos cromóforos.

Para obtener espectros en el ultravioleta con fines cualitativos se suelen emplear disoluciones diluidas del analito. Un disolvente para espectroscopia ultravioleta y visible debe ser transparente en la región del espectro donde el soluto absorbe y debe disolver una cantidad suficiente de la muestra para poder obtener un espectro de analito bien definido. Se deben considerar las posibles interacciones del disolvente con las especies absorbentes.

La espectroscopia de absorción basada en la radiación ultravioleta y visible es una de las herramientas más útiles. Las características importantes de los métodos espectrofotométricos son:

- Aplicabilidad: Gran cantidad de especies inorgánicas, orgánicas y bioquímicas absorben radiación ultravioleta-visible y, por consiguiente, se prestan así para la determinación cuantitativa directa.
- Alta sensibilidad: Los límites de detección varían en el intervalo entre 10^{-4} y 10^{-5} M.
- Selectividad moderada a alta: Con frecuencia, se puede determinar una longitud de onda en la que sólo absorbe el analito sin separaciones previas.
- Buena Exactitud: los errores relativos de concentración se ubican entre 1 y el 5%.
- Facilidad y comodidad.

II.3.7.2 Métodos Cromatográficos

La cromatografía es un método que permite la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas. Es una técnica en la cual los componentes se separan a partir de las diferencias de velocidad a la

que son transportada a través de una fase fija o estacionaria por una fase móvil gaseosa o líquida. (19)

La Fase estacionaria es la sustancia que se fija en una posición durante la cromatografía. Las separaciones se logran por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada. La Fase móvil se mueve a través de la fase estacionaria, arrastrando consigo las mezclas de analitos, y puede ser un gas, líquido o un fluido supercrítico.

Los métodos cromatográficos son de dos tipos: (1) cromatografía de columna, donde la fase estacionaria está contenida en un tubo estrecho y se fuerza el paso de la fase móvil a través del tubo, a presión o por gravedad. (2) En cromatografía plana, la fase estacionaria está sostenida sobre una placa plana o en los poros de un papel. En este tipo de cromatografía, la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por capilaridad o por efecto de la gravedad. (19)

Existe una clasificación para los métodos cromatográficos de columna, según la naturaleza de la fase móvil utilizada y se divide en tres categorías: (1) Cromatografía de gases, (2) Cromatografía Líquida y (3) Cromatografía de fluidos supercríticos. Siendo las dos primeras las de más utilidad en la industria.

La cromatografía de gases es útil para gases o para compuestos relativamente volátiles lo que incluye a numerosos compuestos orgánicos. En el caso de compuestos no volátiles se recurre a procesos denominados de "derivatización", a fin de convertirlos en compuestos volátiles en las condiciones de análisis.

II.3.7.2.1 Cromatografía Líquida

La cromatografía de líquidos es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. Permite cuantificar los analitos presentes en una muestra, a través de la migración diferencial del analito en un sistema dinámico formado por la fase estacionaria y móvil. (19)

Dentro de la Cromatografía líquida destaca la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que es la técnica cromatográfica más empleada en la actualidad.

II.3.7.2.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución se ha convertido en una herramienta analítica indispensable. Es el tipo de cromatografía de elución más versátil y ampliamente utilizado, para separar y determinar especies en diversos materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos.

Es la técnica de separación más utilizada en la actualidad debido a su gran aplicabilidad a diferentes tipos de sustancias, alta capacidad de separación de mezclas de analitos y determinaciones cuantitativas exactas. HPLC utiliza una presión elevada para forzar al disolvente a que pase por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo separaciones de analitos a una gran resolución. (19)

El resultado que se obtiene es un gráfico que recibe el nombre de cromatograma. En él se representa una señal dependiente de las moléculas presentes en la muestra en función del tiempo. Este cromatograma presenta picos que son útiles

para el análisis cualitativo basado en la posición de los picos en el eje del tiempo, identificando los distintos componentes de la muestra; y para el análisis cuantitativo donde el área bajo los picos proporcionan una medida cuantitativa de la cantidad de cada especie.

En HPLC se emplean sistemas automatizados que permiten la inyección continua de volúmenes variables, un sistema de bombeo capaz de generar presiones de hasta 6000 psi y velocidades de flujo de 0.1- 10 mL/min, columnas para cromatografía líquida usualmente elaboradas con tubos de aceros que permiten la separación de los analitos y de un detector que produce una respuesta lineal de los analitos presentes en la muestras.

Los tipos de cromatografía líquida de alta resolución suelen calificarse según el mecanismo de separación o el tipo de fase estacionaria. Éstos comprenden: (1) Cromatografía de reparto o de líquido-líquido, (2) Cromatografía de adsorción o de líquido-sólido, (3) cromatografía de intercambio de iones o iónica, (4) cromatografía de exclusión molecular, (5) cromatografía de afinidad y (6) cromatografía quiral. (19)

Cromatografía de adsorción: Está basada en la adsorción de especies de analitos en una superficie sólida. La fase estacionaria es la superficie de un sólido polar finalmente dividido, con este tipo de empaquetamiento el analito compite con la fase móvil por los sitios sobre la superficie del empaquetamiento y la retención se debe a la fuerza de adsorción.

Se utiliza para la separación de compuestos altamente polares insolubles en solventes polares. Los solventes muy polares tienden a desactivar la fase estacionaria, al punto que se debe evitar el agua. Fundamentalmente se aplica en muestras solubles en solventes no polares o moderadamente polares, en

separaciones de compuestos orgánicos relativamente no polares ni hidrosolubles cuya masa molecular es menor de unos 5000.

Cromatografía de intercambio iónico: Es un método que permite la separación de moléculas basada en sus propiedades de carga eléctrica. Se compone de dos fases: la fase estacionaria o intercambiados iónico, y la fase móvil. La fase estacionaria insoluble lleva en la superficie cargas electrostáticas fijas, que retiene contra iones móviles que pueden intercambiarse por iones de la fase móvil, la cual suele ser una disolución acuosa con cantidades moderadas de metanol o un disolvente orgánico miscible con agua que contiene especies iónicas, generalmente en forma de buffer. Los iones de la fase móvil compiten con los analitos por los sitios activos de la fase estacionaria.

Cromatografía de exclusión molecular: Es una técnica poderosa, particularmente aplicable a especies de alto peso molecular. El empaquetamiento de la columna consiste en pequeñas partículas de sílice o polímeros que contienen una red de poros uniformes, en los cuales pueden difundirse las moléculas de soluto y disolvente. Mientras están en los poros, las moléculas están atrapadas de manera efectiva y eliminada del flujo de la fase móvil, el fraccionamiento se basa en el tamaño molecular. En esta separación cromatográfica no ocurren interacciones físicas o químicas entre los analitos y la fase estacionaria.

Cromatografía de afinidad: Consiste en enlazar de manera covalente un reactivo, llamado ligando de afinidad, a un soporte sólido. Entre los ligandos de afinidad usuales se encuentran los anticuerpos, inhibidores enzimáticos u otras moléculas que se enlazan de manera reversible y selectiva a las moléculas del analito en la muestra. Cuando ésta pasa por la columna, se retienen sólo las moléculas que se enlazan de manera selectiva con el ligando de afinidad. Las moléculas no enlazadas pasan por la columna arrastradas por la fase móvil. Después de retirar las moléculas no deseadas, es posible la elución de los analitos retenidos, al cambiar las

condiciones de la fase móvil. La fase estacionaria de la cromatografía de afinidad es un sólido, en el cual se inmoviliza el ligando de afinidad.

Su uso principal es el aislamiento rápido de biomoléculas en trabajos preparativos.

Cromatografía quiral: En esta separación se requieren fases estacionarias quirales o aditivos quirales de fase móvil. La formación de un complejo entre el agente de resolución quiral (fase estacionaria o aditivo) y uno de los dos isómeros preferentemente da lugar a la separación de los enantiómeros.

Cromatografía de par iónico: es un subconjunto de la cromatografía de fase reversa en la que se separan especies fácilmente ionizables en columnas de fase reversa. La fase inversa se recubre dinámicamente por grupos iónicos, los cuales son añadidos a través de la fase móvil. Este tipo de cromatografía posee una fase móvil constituida por un buffer y un reactivo iónico. El contraión es de una cadena orgánica relativamente larga y de carga opuesta al ión del analito que se desea determinar. En su área de aplicación compite con la cromatografía de intercambio iónico.

Cromatografía de reparto: Es el tipo de cromatografía más usado de HPLC, en el que la fase estacionaria es un segundo líquido inmisible con la fase móvil líquida. La cromatografía de reparto puede dividirse en variantes líquido-líquido y de líquido-fase enlazada, la diferencia entre estas dos radica en la forma de mantener la fase estacionaria sobre las partículas de soporte de empaquetamiento. (19)

Los empaquetamientos de fase enlazada se preparan por reacción de un órgano clorosilano con los grupos –OH formados en la superficie de partículas de sílice por hidrólisis en ácido clorhídrico diluido caliente. Este empaquetamiento tiene la ventaja de una estabilidad mucho mayor que las fases estacionarias que se

mantienen inmóviles físicamente, estas últimas precisan el recubrimiento periódico de la superficies sólida, ya que la fase estacionaria se disuelve gradualmente en la fase móvil. Además, la elución en gradiente no resulta práctica con empaquetamientos de líquido-líquido, de nuevo a causa de las pérdidas por solubilidad en la fase móvil.

Es posible distinguir dos tipos de cromatografía de reparto, según la polaridad relativa de la fase móvil y estacionaria, (1) Cromatografía en fase normal y (2) Cromatografía en fase reversa.

En la cromatografía en fase normal la fase estacionaria es de carácter polar y la fase móvil apolar, donde los componentes menos polares eluyen primero y al aumentar la polaridad de la fase móvil disminuyen el tiempo de elución. Contrariamente en la cromatografía en fase reversa ocurre primero la elución del componente más polar, al incrementar la polaridad de la fase móvil aumentan el tiempo de elución. En este tipo de esta cromatografía la fase estacionaria posee carácter no polar, mientras que la fase móvil tiene carácter polar. (19)

II.4. Validación de métodos analíticos

La validación de un método analítico es un procedimiento que permite demostrar por medio de pruebas científicas que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Implicando la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y del error sistemático y al azar de un procedimiento, no solo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales

La validación de los procedimientos analíticos están regidos bajo el apartado <1225> de la USP, correspondiente al compendio de validación de procedimientos el cual comprende las características analíticas de alto rendimiento de exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, rango de linealidad, robustez y adecuación del sistema; así como los datos elementales para la validación del análisis basado en una categoría dada. (20)

Tabla 1. Datos Elementales Requeridos para Validación

Parámetros de desempeño analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis Cuantitativos	Pruebas de Límites		
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
Límite de detección	No	No	Si	*	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Intervalo	Si	Si	*	*	No

*Puede requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica. (20)

Las diferentes categorías mencionadas en la tabla 1 indican que se requiere para cada método analítico en particular, a continuación se describe a que corresponde cada categoría:

Categoría I: Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.

Categoría II: Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.

Categoría III: Procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño (por ejemplo: disolución, liberación de fármacos, etc.).

Categoría IV: Pruebas de identificación.

II.4.1. Parámetros de desempeño analítico evaluados en la validación de métodos

II.4.1.1. Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado. Se expresa como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito añadida sobre la muestra o como la diferencia entre la medida obtenida y el valor aceptado como verdadero junto a los intervalos de confianza. (21)

II.4.1.2 Precisión

La precisión expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas. (21)

II.4.1.2.1 Repetibilidad

La Repetibilidad se determina repitiendo las mediciones de las soluciones muestra y/o estándar. Se puede medir al calcular la Desviación Estándar Relativa (RSD) de inyecciones múltiples o lecturas espectrofotométricas para cada solución estándar o a partir de la exactitud o de los datos de la linealidad. (16)

Debería evaluarse utilizando: (a) un mínimo de 9 determinaciones que cubre el rango especificado para el procedimiento, o (b) un mínimo de 6 determinaciones al 100% de la concentración del ensayo. (21)

II.4.1.2.2 Precisión intermedia

La medida en que se debe establecer la precisión intermedia depende de las circunstancias en las que se destina el procedimiento a utilizar. Se debe establecer los efectos de eventos aleatorios sobre la precisión del procedimiento analítico. Variaciones típicas para ser estudiados incluyen días, los analistas, equipo, etc. No se considera necesario estudiar estos efectos de forma individual. Se recomienda el uso de un diseño experimental. (21)

II.4.1.2.3 Reproducibilidad

Debe ser considerado en el caso de la estandarización de un procedimiento analítico, por ejemplo, para la inclusión de procedimientos en las farmacopeas. Estos datos no son parte del expediente de autorización de comercialización. Se evalúa por medio de un ensayo de laboratorios. (21)

II.4.1.2.4 Datos recomendados

La desviación estándar, desviación estándar relativa o coeficiente de variación y el intervalo de confianza debe ser reportado para cada tipo de precisión. (21)

II.4.1.3 Especificidad

Una investigación de la especificidad debe llevarse a cabo durante la validación de las pruebas de identificación, la determinación de impurezas y el ensayo. Los procedimientos utilizados para demostrar la especificidad dependerán del objetivo previsto del procedimiento analítico.

No siempre es posible demostrar que un procedimiento analítico es específico para un analito particular (discriminación completa). En este caso se recomienda una combinación de dos o más procedimientos analíticos para alcanzar el nivel necesario de discriminación. (21)

Es necesario para demostrar que los resultados no están indebidamente afectados por los ingredientes del placebo, otros fármacos activos o productos de degradación.

El placebo está constituido por todos los excipientes y recubrimientos (tintas, dispositivos de sumersión y cubiertas de capsulas se incluyen también cuando correspondan) sin el ingrediente activo. (22)

II.4.1.4 Límite de detección

Se define el límite de detección como la magnitud mínima que puede detectarse en un ensayo pero no cuantificarse con un valor exacto. El límite de detección puede ser expresado como:

$$L_D = 3 \sigma/S$$

Donde σ es la desviación estándar de la respuesta y S la pendiente de la curva de calibración.

La estimación de σ puede hacerse tanto por la curva de calibración o en la desviación estándar de diferentes lecturas del blanco de reactivos. (21)

II.4.1.5 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación es la menor concentración o contenido de analito que puede ser cuantificado, con una incertidumbre aceptable, en las condiciones experimentales descritas en el método. El límite de cuantificación puede ser expresado como:

$$L_D = 10 \sigma/S$$

Donde σ es la desviación estándar de la respuesta y S la pendiente de la curva de calibración.

Al igual que en el límite de detección, la estimación de σ puede hacerse tanto por la curva de calibración o en la desviación estándar de diferentes lecturas del blanco de reactivos. (21)

II.4.1.6 Linealidad e Intervalo

Es la capacidad que tiene un método analítico para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido. (23) La linealidad e intervalo se establecen habitualmente preparando soluciones del fármaco, pudiendo abarcar desde una concentración inferior a la más baja concentración esperada hasta una concentración mayor de la concentración más alta durante la liberación (16)

II.4.1.7 Robustez

La evaluación de robustez, es decir el estudio del efecto de cambios pequeños y deliberados en las condiciones de disolución, por lo general se hace en las etapas finales del desarrollo del producto. Los parámetros sujetos a variaciones dependen del procedimiento de disolución y del tipo de análisis. (16)

II.5 Criterios de aceptación USP para procedimientos de Disolución.

Los criterios de aceptación característicos de la cantidad disuelta de ingrediente activo, expresada como un porcentaje del contenido declarado (Q) se encuentra en el intervalo de 75% a 80% disuelto. Por lo general, no se usa un valor Q que supere el 80%, ya que se deben tener en cuenta los intervalos de valoración y la uniformidad del contenido. (20)

Para los ensayos de disolución los criterios de aceptación, dependen, del tipo de forma farmacéutica sólida a estudiar (Liberación inmediata, liberación prolongada, etc.), por lo cual los criterios son diferentes.

En la Tabla 2 se presentan los criterios de aceptación para formas farmacéuticas de liberación inmediata.

Tabla 2. Tabla de aceptación para formas farmacéuticas de liberación inmediata de la USP.

Etapa	Nº de Unidades Analizadas	Criterios de Aceptación
S ₁	6	Ninguna unidad es menor que Q + 5%
S ₂	6	El promedio de 12 unidades (S ₁ + S ₂) es igual o mayor que Q, y ninguna unidad es menor que Q – 15%
S ₃	12	El promedio de 24 unidades (S ₁ + S ₂ + S ₃) es igual o mayor que Q, no más de 2 unidades son menores que Q -15%, y ninguna unidad es menor que Q – 25%.

La cantidad, Q, es la cantidad de ingrediente activo disuelto, especificada en la monografía individual, expresada como un porcentaje del contenido declarado de la unidad de dosificación; los valores de 5%, 15% y 25% en la Tabla 2 son los porcentajes del contenido declarado, de forma que estos valores y Q estén expresados en unidades equivalentes. (17)

En la actualidad no existen reportados metodologías de disolución para el Tiocolchicósido que permitan determinar si los medicamentos comercializados en la República Bolivariana de Venezuela cumplen con los criterios de aceptación dados por la USP.

II.6 Tiocolchicósido

El Tiocolchicósido (THC) químicamente se denomina como N-[3-(β-Dglucopiranoxiloxi)-5, 6, 7, 9-tetrahidro- 1, 2-dimetoxi- 10(metilo) 9-oxobenzo [a] heptalen-7il] acetamida. La fórmula empírica $C_{27}H_{33}NO_{10}S$. Posee un peso molecular relativamente alto (563 g/mol) y una alta solubilidad en agua (16,1 mg/mL). (24)

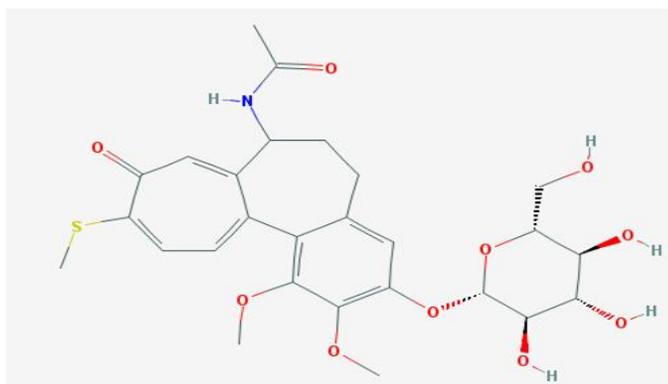


Figura 6. Estructura Molecular del Tiocolchicósido.

El Tiocolchicósido es un derivado semi-sintético sulfurado de colchicósido, un glicósido natural obtenido del *Colchicum autumnale*, y se diferencia de este último por la presencia de un grupo tiometil en sustitución de un grupo metoxi. Éste fármaco posee un potente efecto relajante sobre el musculo estirado y tiene efectos analgésicos y antiinflamatorios, por lo tanto es una opción adecuada para el tratamiento de diversas condiciones traumáticas, ortopédicas y reumáticas, asociados al dolor y espasmos de la musculatura esquelética. (25)

Es un antagonista de los receptores ácido γ-aminobutírico (GABA) del sistema nervioso central ya que actúa sobre la contractura muscular mostrando una afinidad selectiva por los receptores presinápticos del ácido gamma amino butírico (GABA);

es decir, potencia el efecto inhibidor GABA, sobre todo tipo de GABA-A, localizados en las neuronas de la médula espinal. Al parecer actúa principalmente a nivel de los receptores de la médula espinal por lo que carece de efectos sedante. Su acción miorrelajante se manifiesta también sobre músculos viscerales particularmente sobre el útero. No provoca parálisis ya que no modifica la movilidad voluntaria, no actúa sobre el sistema cardiovascular y no produce riesgo de paro respiratorio.

Estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos efectuados en individuos sanos demuestran que luego de la administración oral, el Tiocolchicósido exhibe una rápida y satisfactoria absorción gastrointestinal, la cual comienza a nivel gástrico y no se altera en presencia de alimentos.

En la República Bolivariana de Venezuela el Tiocolchicósido es una especialidad farmacéutica que se consigue con o sin prescripción facultativa con el nombre de diferentes marcas o laboratorios. A continuación se presenta un listado del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INHRR) donde se pueden apreciar las distintas presentaciones farmacéuticas de Tiocolchicosido fabricadas en el país, así como sus nombres comerciales.

Tabla 3. Listado de especialidades farmacéuticas de Tiocolchicósido registradas en la Gerencia Sectorial de Registro y Control.

Nombre del Producto	Fabricante
Coltrax 4 mg Comprimidos	SANOFI-AVENTIS de Venezuela
Colval 4 mg Comprimidos	Laboratorios VALMOR, C.A
Eusilen 4 mg Comprimidos	Laboratorios COFASA S.A
Tiocolvar 4 mg Comprimidos	INFINITY PHARMA XXI, C.A.
Tiocol 8 mg Tabletas recubiertas	Laboratorios LA SANTE C.A
Tiocolchicósido 4 mg Tabletas	SM PHARMA, C.A.
Tiocolchicósido 4 mg Tabletas	Medicamentos genéricos R.X.
Tiocolchicósido 4 mg Tabletas	Orbis pharmaceutical, C.A.
Tiocolchicósido 4 mg Tabletas	SOLGEN C.A.
Tiocolchicósido 4 mg Tabletas	Calox international, C.A.
Tiocolchicósido 4 mg Tabletas	Laboratorios LA SANTE C.A
Tiocolchicósido 4 mg Comprimidos	Genérico de calidad GC, C.A

III. ANTECEDENTES

III. 1 Validación de la estabilidad indicada por el método RP-HPLC para la determinación y estudio de disolución *In Vitro* simultanea de Tiocolchicósido y Diclofenac potásico de dosis de tabletas.

Suraj, J., S.R. Butle., SachinP., P.K. Jagtap. (2011)

Estos autores desarrollaron un método simple, rápido y robusto, usando la técnica RP-HPLC para medir Tiocolchicósido (TH) y Diclofenac de potasio (DP) a una longitud de onda de 258 nm, con el fin de evaluar el ensayo y perfil de disolución *in vitro* del fármaco desde la formulación de comprimido.

Las tabletas y el placebo de las tabletas de TH y DP fueron suministrados por Wockhardt Ltd., Aurangabad, India. Utilizaron agua desionizada de alta pureza de Millipore, Mili-Q sistema de purificación (Bedford, MA, EE.UU) y filtros de nylon de 0,45 µm de Advanced Micro Devices.

Utilizaron un sistema de HPLC (Waters Milford, EE.UU) equipado con una función de auto-muestrador y bomba de gradiente cuaternario con un desgasificador en línea. Para la detección se utilizó un control de temperatura para la columna, un detector de fotodiodos PDA (2996) y un detector de longitud de onda dual (2487), los datos cromatográficos se obtuvieron usando un software 2 Empower. Todos los experimentos de disolución lo llevaron a cabo usando un instrumento de disolución unido a un automuestrador.

Fase móvil: Composición variable de disolvente A (Fosfato de di hidrógeno de sodio de 5mM, pH= 2,5) y disolvente B (Metanol).

Flujo: 1 mL/min.

Volumen de Inyección: 20 μ L.

Detección: PDA rango 200-400 nm.

Columna: Zorbax SB CN 250 nm x 4,6 mm, 5 μ m (Agilent technology, USA).

Procedimiento experimental: Los autores prepararon una serie de patrones de Tiocolchicósido en el rango de 0,4-13,19 μ g/mL y de Diclofenac de potasio entre 2,7-82,50 μ g/mL para los estudios de disolución *in vitro*, realizaron un gráfico de concentración de fármacos versus la respuesta del área de pico. Para obtener el sistema idóneo realizaron cinco inyecciones de las soluciones estándar mezcladas.

Se evaluaron seis tabletas, utilizando para ello un disolutor calibrado con paletas a 50 rpm a una temperatura de $37 \pm 0,5$ °C. Se emplearon 900 mL de medio de disolución para cada tableta, la composición del medio de disolución fue una solución de buffer pH 6,8. Los tiempos de muestreo fueron 5, 10, 15, 30, 45, 60 minutos. En cada tiempo tomaron 10 mL de muestra de cada recipiente con un muestreador automático y filtraron a través de filtros de nylon de 0,45 μ m.

El objetivo principal del estudio fue analizar los fármacos polares con suficiente resolución en un tiempo de análisis razonable. Consideraron las diferencias de los pKa de ambas moléculas, (Tiocolchicósido pKa= 10 mientras que el Diclofenac de potasio pKa= 4) probaron las siguientes fases móviles con gradiente de elución:

a) Metanol y buffer fosfato, este buffer estaba compuesto por KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , 0,3 M y ajustado a diferentes pH con ácido ortofósforico (pH 2,5, 3,5, y 6,5).

b) Metanol y buffer fosfato, este buffer estaba compuesto por NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 . 0,3 M y ajustados a diferentes pH con ácido ortofosforico (pH 2,5, 3,5, y 6,5).

c) Agua: Metanol: Acetonitrilo: Trietilamina en la proporción (75: 15: 10: 01) y ácido 1-pentanosulfónico de pH 2,5 y 3,5.

Con la finalidad de obtener condiciones cromatográficas óptimas, los investigadores utilizaron diferentes fases estacionarias teniendo en cuenta: (1) La característica de la fase estacionaria (RP-C8 y RP-C18, columna de fenilo y ciano) y (2) El tamaño de las partículas de la columna (3 μm y 5 μm).

Para la selección de la fase estacionaria comenzaron utilizando fases estacionarias de la no polar a la polar, es decir, C₈, C₁₈, fenil y ciano de diferentes fabricantes y con las distintas fases móviles. Las columnas C₈ y C₁₈ dieron como resultado buenas resolución y forma de pico, pero el Tiocolchicósido fue liberado en un volumen aproximadamente nulo debido a su naturaleza altamente polar. Al utilizar la fase estacionaria tipo fenil obtuvieron mala resolución y forma entre los picos. Por lo tanto eligieron la columna con fase estacionaria de tipo ciano. La elución fue realizada utilizando los diferentes buffer, los autores obtuvieron un buen rendimiento y mejor separación con la solución buffer de NaH_2PO_4 y metanol, usando ciano como fase estacionaria.

Al desarrollar las pruebas de disoluciones se tomaron 6 tabletas, los autores obtuvieron como resultado que a medida que pasaba el tiempo se obtenía más porcentaje de fármaco disuelto para las tabletas de liberación inmediata.

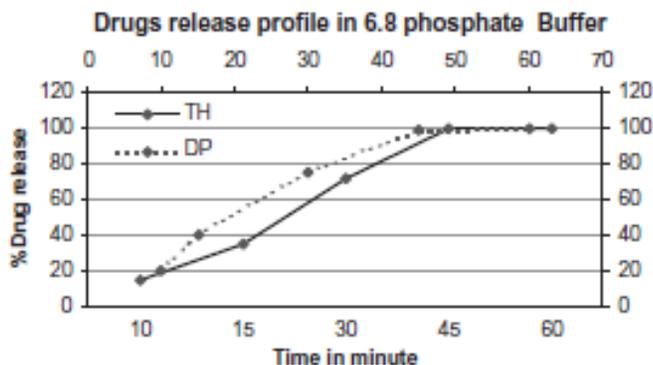


Figura 7. Perfil del fármaco de TH y DP en Buffer de pH 6,8.

El método de RP-HPLC que se optimizó para el método de ensayo y estudios de disolución *in vitro* fue validado según directrices del Consejo Internacional de armonización de los requisitos técnicos para el registro de uso humano (ICH por sus siglas en Inglés, 2000, 2005) con respecto a la especificidad, exactitud, precisión (Repetibilidad y precisión intermedia), linealidad, rango y robustez. También evaluaron las características de idoneidad del sistema.

El método propuesto por los autores fue aplicado con éxito para el estudio de disolución *in vitro* de TH y DP para la forma farmacéutica de tableta. El medio de disolución fue seleccionado mediante el estudio de la solubilidad cuantitativa de fármaco y por la confirmación de las condiciones en cada medio según la USP. La validación del método propuesto fue realizada según las directrices de la ICH y demostró que este método es simple, preciso, fiable y robusto.

III. 2 Validación de un método por RP-HPLC para la determinación de Tiocolchicósido en tabletas.

Bor M., Guilarte A., Guzmán L, Macías K, Mendoza W. 2018.

Se desarrolló y validó un método por cromatografía Líquida de alta eficiencia en fase inversa (RP-HPLC), sencillo, rápido, reproducible e indicador de la estabilidad, para la cuantificación del Tiocolchicósido en tabletas. Las condiciones cromatográficas establecidas por los autores para la determinación del contenido de Tiocolchicósido fueron las siguientes: (26)

Columna: C18 RP de 4,6 mm x 25,0 cm. Empaque de 5 μ m.

Fase móvil: Metanol: Acetonitrilo: Agua en proporciones 30: 10: 60, ajustada a pH 8,00 \pm 0,05.

Flujo: 0,8 mL/min.

Volumen de inyección: 20,0 μ L.

Longitud de Onda: 371 nm.

Temperatura: Ambiente

La validación del método analítico fue desarrollada evaluando los parámetros sugeridos por la ICH en la Guía Q2 (R1) y el apartado <1225> de la USP 38. Los parámetros evaluados para la cuantificación de THC fueron: especificidad, Linealidad y Rango, Precisión, Limite de cuantificación, Limite de detección, Exactitud.

La especificidad se determinó mediante la evaluación de la pureza del pico cromatográfico y con estudios de degradación forzada. Sometiéndose las muestras a pruebas de estrés las cuales los autores compararon con una muestra control y el

patrón. Los análisis comparativos demostraron especificidad en el método analítico al no evidenciarse interferencias ni solapamientos con respecto a la señal cromatográfica correspondiente a THC.

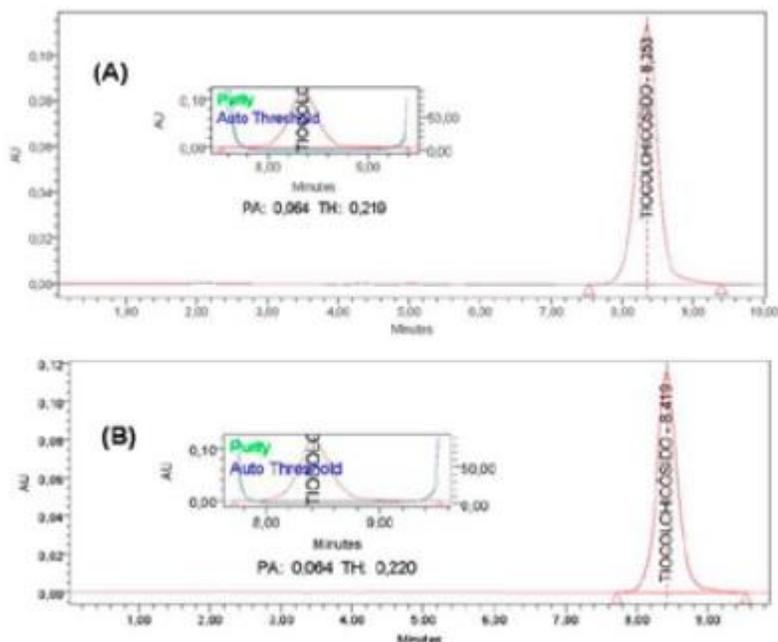


Figura 8. Cromatogramas y gráficos de pureza de patrón (A) y muestra (B).

Para la cuantificación se utilizaron curvas de calibración que demostraron una relación lineal entre el área y concentración en el rango de concentraciones entre 0,020 a 0,060 mg/mL obteniéndose un $R^2= 0,9999$.

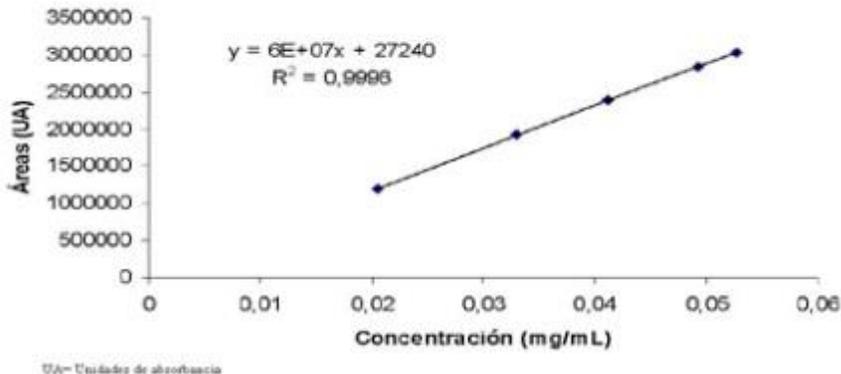


Figura 9. Curva de calibración para el análisis de Tiocolchicósido.

La exactitud del método fue demostrada luego de determinar el porcentaje de recuperación, en los niveles 80%, 100% y 130%. El método demostró ser exacto con porcentajes de recuperación de 99,16 %y el 100,46%. (26)

El método demostró ser preciso, exacto y específico, cumpliendo con los criterios establecidos por la ICH para la validación de los métodos analíticos. Los autores concluyeron que el método puede ser aplicado como un método rutinario para pruebas de control de calidad y como indicador de estabilidad.

III. 3 Desarrollo y validación de un método analítico para la estimación simultánea de Paracetamol y Tiocolchicósido por RP-HLC.

Chiragkumar M, P., Bapna M., Kunal B., Ronak P., Smit S., Parth J. 2013

Se desarrolló y validó un método por HPLC simple y rápido para la determinación simultánea de Paracetamol y Tiocolchicósido. Las condiciones cromatográficas establecidas por los autores para la determinación de ambos fármacos fueron: columna BDS Hypersil, C18 250 x 4,6mm, 5µm tamaño de partícula. La fase móvil fue preparada con Agua: Metanol: Ácido Acético (80: 20: 0,1, v/v). La velocidad de flujo fue de 1.0 mL/min y la detección fue a una longitud de onda de 247 nm, con un volumen de inyección de 20 µL. El análisis se realizó a temperatura ambiente utilizando HPLC acoplado a un detector UV-VIS.

Los autores evaluaron los siguientes parámetros: Linealidad, exactitud, precisión, robustez.

La linealidad se determinó a través de curvas de calibración para el Paracetamol en un rango de concentración desde 250-750 µg/mL y para Tiocolchicósido con un rango de concentración desde 1-3 µg/mL.

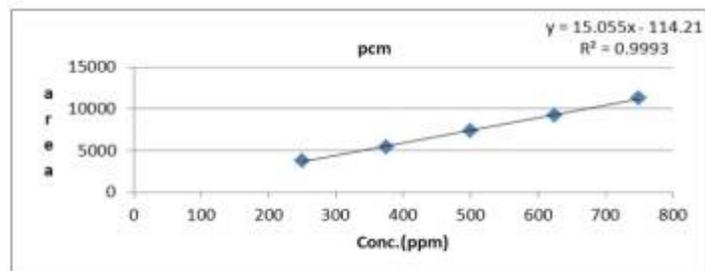


Figura 10. Curvas de calibración para Paracetamol

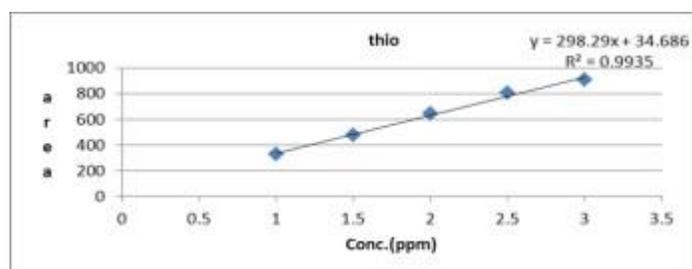


Figura 11. Curvas de calibración para Ticolchicósido.

La exactitud fue calculada en términos de porcentajes de recuperación para niveles de 80, 100 y 120%. El método demostró ser exacto obteniéndose un porcentaje de recuperación de 99,95, 100,38 y 99,87 % para el fármaco Paracetamol y un porcentaje de recuperación de 99,75, 100,08 y 100,55 % para el Ticolchicósido.

El método fue validado según las directrices de la Guía ICH, siendo el método, exacto, preciso, robusto, lineal, simple y rápido. Por lo tanto es una metodología adecuada para el control de calidad de formulaciones y materias primas, ya que cumple con los parámetros y límites para su validación.

III.4 Métodos espectrofotométricos para la determinación de Tiocolchicósido a granel y en forma farmacéutica sólida.

Sasmita A., Priyambada M., Pnakini P., Mathrusri A. 2010

Los autores desarrollaron cuatro métodos espectrofotométricos simples, precisos y rentables, los cuales son: método de espectrofotometría de derivada cero, espectro de primera derivada, según espectro derivado y el método del área bajo la curva (AUC).

La investigación de Tiocolchicósido se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro UV-Visible de doble haz (Shimadzu, Japón). . Para el desarrollo de la metodología se eligió Hidróxido de sodio 0,1 N para disolver la muestra. La solución estándar se preparó disolviendo 10 mg de Tiocolchicósido en Hidróxido de Sodio 1,0 N y llevando a un volumen de 100 mL, a partir de esta solución los investigadores prepararon diluciones adicionales.

Al llevar a cabo los cuatro métodos, el principio activo Tiocolchicósido presento máximos de absorción a 259,0 nm para el método de derivada cero, 252,0 nm en el espectro de orden de primera derivada y 259,0 nm en el espectro de segunda deriva; para el método del área bajo la curva el análisis de Tiocolchicósido el cálculo se basó en el rango de longitud de onda de 254,0 nm a 264,0 nm.

La Investigación determino que para todos los métodos se cumplía con la Ley de Lambert-Beer en el intervalo de concentración de 2,5 -50,0 mg/mL. Los métodos fueron validados siguiendo los parámetros sugeridos por la ICH, los cuales estaban dentro del rango permitido. Los métodos desarrollados en este trabajo son sencillos, sensibles, exactos y precisos. Por esto los investigadores concluyeron que los métodos pueden ser utilizados con éxito para análisis de rutina de Tiocolchicósido.

III.5 Validación de un método por RP-HPLC para la estimación simultánea de Tiocolchicósido y Etodolac en tabletas.

Raghavender, P., Bhaskar, M. 2012

La investigación fue publicada en el Research Article Pharmaceutical Sciences en Septiembre del 2013, tuvo como objetivo el desarrollo y validación de un método para la determinación de Tiocolchicósido y Etodolac en tabletas.

La instrumentación utilizada para esta metodología fue un equipo de Cromatografía de Alta Eficacia con un módulo de separación Waters 2695, equipado con un detector UV-Visible, auto inyección y automuestreador, con un software Waters Empower, Version 2.

La fase móvil consistió en una mezcla de Buffer Fosfato y Acetonitrilo en proporción (50:50) con pH ajustado a 3,0 con Ácido orto-fosfórico. La velocidad de flujo fue de 1,0 mL/min. La detección fue a una longitud de onda de 254nm. La columna utilizada fue una Symmetry C18 (150x4.6, 5 μ).

Los investigadores realizaron una solución estándar de Tiocolchicósido y Etodolac por separado usando metanol como solvente. Las soluciones fueron inyectadas en el equipo HPLC del cual obtuvieron los cromatogramas de áreas versus concentración representativos de los patrones.

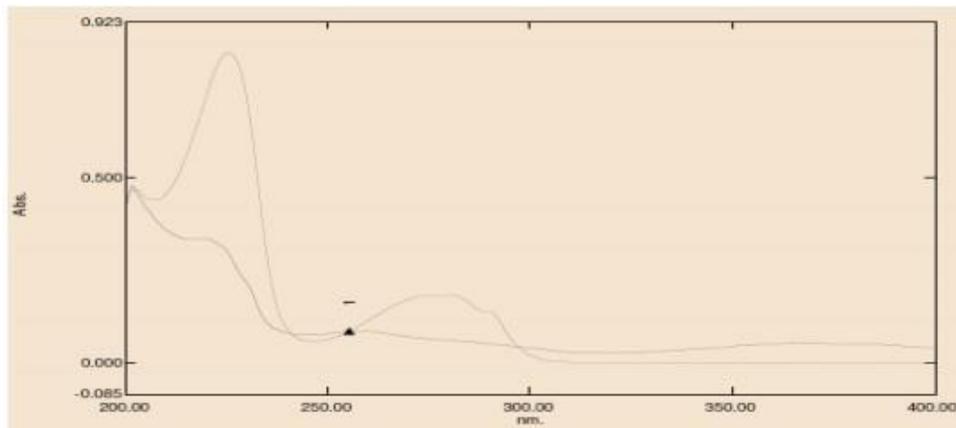


Figura 12. Espectro UV del patrón de Tiocolchicósido y Etolac.

Realizaron seis inyecciones de 20 μ L de muestra obteniendo una estimación de la cantidad de cada fármaco presente en las tabletas de 99,65% de Etolac y de Tiocolchicósido de 99,60% respectivamente.

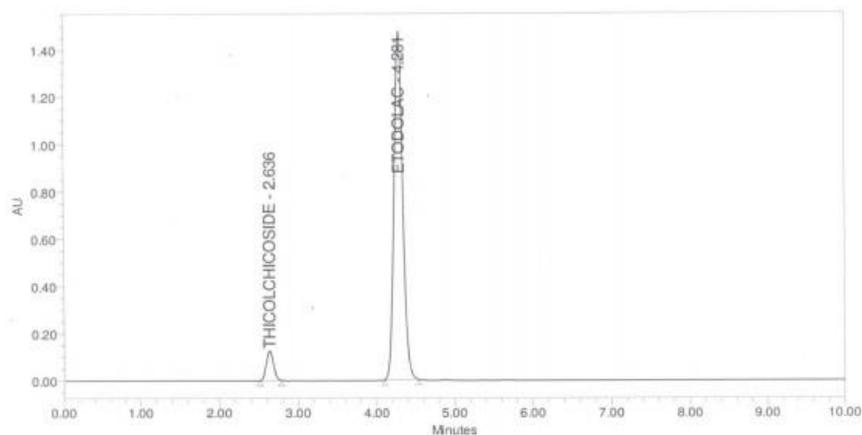


Figura 13. Cromatograma por HPLC de Tiocolchicósido y Etolac.

La validación fue realizada bajo la guía de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH), obteniéndose que el método es simple, preciso, exacto, selectivo y reproducible. Encontraron que el método es suficientemente robusto y puede utilizarse simultáneamente para determinar Tiocolchicósido y Etodolac en tabletas.

V. JUSTIFICACIÓN

Tomando como base las revisiones bibliográficas, se pudo observar la presencia de artículos científicos relacionados a metodologías analíticas para la determinación de mezclas de fármacos, donde uno de los presentes es el Tiocolchicósido. Más no existen reportados en los textos oficiales metodologías para el ensayo de disolución del principio activo de interés que permita evaluar la calidad del medicamento para su consumo.

En la actualidad existen diversos medicamentos de Tiocolchicósido en tabletas de distintos laboratorios, por lo tanto es importante para las industrias farmacéuticas contar con un método analítico que permitan determinar el desempeño y que aseguren la calidad del medicamento para su consumo. Por tales motivos el siguiente trabajo propone desarrollar y validar un método analítico para el ensayo de disolución que nos permita determinar la calidad el Tiocolchicósido en tabletas, cumpliendo con los requerimientos establecidos por las autoridades regulatorias nacionales e internacionales, siguiendo las normativas establecidas.

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo General

Desarrollar y validar de una metodología para el ensayo de disolución del Tiocolchicósido en tabletas.

V.2 Objetivos Específicos

1. Desarrollar una metodología para el ensayo de disolución de Tiocolchicósido en tabletas.
2. Evaluar la cinética de disolución en diferentes medios de disolución.
3. Comparar las cinéticas de disolución del medicamento en los diferentes medios.
4. Seleccionar el medio de disolución a emplear de acuerdo a los estudios de la cinética de disolución.
5. Optimizar las condiciones analíticas para el ensayo de disolución del Tiocolchicósido en tabletas.
6. Validar la metodología analítica de acuerdo a los criterios establecidos en la USP.

VI. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

VI.1 Patrón

Patrón referencia secundario de Ticolchicósido, pureza de 100,7% calculada sobre base húmeda. Fecha de vencimiento de Abril-2018. Fabricante Dromex International.

VI.2 Muestras

Los medicamentos analizados de Ticolchicósido utilizados se fabrican y comercializan en Venezuela. Se utilizaron distintos medicamentos:

- Medicamento 1: Medicamento Innovador Ticolchicósido 4 mg; Fecha de vencimiento: Abril-2017; Lote: 5VE0185. Blíster de plástico transparente y aluminio.
- Medicamento 2: Ticolchicósido 4mg; Fecha de vencimiento: Agosto-2022; Lote: 70227. Blíster de plástico transparente y aluminio.
- Medicamento 3: Ticolchicósido 4 mg. Blíster de plástico transparente y aluminio.
 - ✓ Medicamento 3-A: Lote 074; Fecha de vencimiento: Mayo-2019.
 - ✓ Medicamento 3-B: Lote 075; Fecha de vencimiento: Mayo-2019.
 - ✓ Medicamento 3-C: Lote 069; Fecha de vencimiento: Octubre-2018
 - ✓ Medicamento 3-D: Lote 073; Fecha de vencimiento: Mayo-2019.

- Medicamento 4: Tiocolchicósido 4mg; Fecha de vencimiento: Marzo-2021. Lote: 60. Blíster de plástico transparente y aluminio.

VI.3 Reactivos

Los reactivos empleados para la realización de este trabajo fueron los siguientes:

- Acetato de Sodio trihidratado 100%. Fischer ChemAlert Guide. Lote: No.990232
- Cloruro de Sodio. Riedel-de Häen. Lote: 01990
- Ácido Clorhídrico 37%. Riedel-de Häen. Lote: 40490
- Metanol Grado HPLC. Mallinckrodt. UN 1230. Lote: 3041
- Acetonitrilo Grado HPLC. Lichrosolv. Lote: 1745291 434
- Agua Grado HPLC.
- Ácido acético 100%. Merck. Lote: K40401463 936
- Fosfato de potasio monobásico. Riedel- de Häen. Lote: 53550

VI.4 Instrumentación

- Los análisis espectrofotométricos se realizaron por Espectrofotometría UV-Visible se empleó un espectrofotómetro de la marca SHIMADZU modelo UV-1201.
- Para la realización de los análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución se empleó un cromatógrafo líquido de la casa comercial Waters, conformado por:
 - Bomba Gradiente, modelo 600E. Usada de modo Isocrático.
 - Inyector Automuestreador, modelo 717.

- Detector de Arreglo de Diodos, modelo 996.
- Software Millenium 32.

- Columna cromatográfica de fase inversa ET 250mm x 8mm x 4µm Nucleosil 7 C18 Art. 720 018.
- Disolutor Hanson Research, modelo SR8 plus, aparato II (Paleta).
- Balanza Analítica Adventurer OHAUS. Precisión de lectura de 0,001 g.
- Balanza Analítica Mettler Toledo modelo AG245. Precisión de lectura de 0,01 mg.
- pH metro, Orion Research, modelo 420A. Thermo Electron Corporation.

VII. DETERMINACIÓN DE CONTENIDO

VII.1 Determinación del contenido de Tiocolchicósido

VII.1.1 Condiciones cromatográficas

El contenido de Tiocolchicósido para las cantidades de Tiocolchicósido fueron determinadas con el método reportado por Bor y colaboradores según el Antecedente III.2.

VII.1.2 Adecuación del sistema cromatográfico

Se realizaron 5 inyecciones de un patrón de Tiocolchicósido al 100% a fin de comprobar que el equipo estaba adecuado para ser utilizado. Donde la concentración del 100% de Tiocolchicósido equivale 1 4 mg de principio activo presentes en 900 mL de solución. Se evaluaron los coeficientes de variación de los

resultados de tiempo de retención y área de las señales cromatográficas de las cinco inyecciones.

VII.1.3 Preparación patrones de la curva de calibración

Para la solución madre se pesaron $8,1 \pm 0,1$ mg de patrón de THC y a partir de ella fueron preparadas las soluciones de THC, para la curva de calibración. Cada solución de Tiocolchicósido fue analizada por duplicado por HPLC. Se construyó una curva de calibración cuyas concentraciones de patrón de Tiocolchicósido están en un rango de concentraciones de 0,020 mg/mL y 0,052 mg/mL.

Tabla 4. Curva de calibración. Determinación de contenido de Tiocolchicósido.

%	Concentración (mg/mL)
50	0,020
80	0,032
100	0,040
120	0,048
128	0,052

* **Peso patrón de THC = $8,1 \pm 0,1$ mg**

VII.1.4 Procedimiento de tratamiento de muestra

Es importante determinar el contenido de Tiocolchicósido de las tabletas antes de realizar el ensayo de disolución. Para ello se procedió de la siguiente forma: se pesaron cinco tabletas y se determinó su peso promedio. Seguidamente se pesó el

equivalente a 1 mg de TCH y se colocó dentro de un balón aforado de 25 mL, se añadieron 10 mL de fase móvil se agitó en un baño de ultrasonido por 10 minutos, se llevó a volumen con fase móvil para obtener una solución de 0,04 mg/mL de TCH. Luego se centrifugaron las muestras y fueron filtradas por membrana de 0,22 μ m antes de ser inyectadas en el cromatógrafo.

VII.1.5 Procedimiento determinación de Contenido de Tiocolchicósido

La determinación por HPLC se realizó inyectando 20 μ L de las soluciones preparadas de las muestras. Se registraron los cromatogramas y se obtuvieron valores de Áreas de pico de THC. Con los valores de área de cada muestra se realizó la cuantificación del contenido, determinando la cantidad de miligramos (mg) de Tiocolchicósido por tableta, utilizando la curva de calibración.

VII.2 Condiciones ensayos de disolución.

Las pruebas de disolución son pruebas de desempeño que requieren de un aparato, un medio de disolución y condiciones de pruebas que provean un método discriminatorio lo suficientemente resistente y reproducible para las operaciones diarias y capaz de ser transferido entre laboratorios.

La primera etapa de esta investigación, consistió en el análisis de los perfiles comparativos, los cuales se realizaron con el fin de obtener las condiciones óptimas para el procedimiento de disolución mediante el espectrofotómetro UV-Visible SHIMADZU.

VII.2.1 Pruebas de solubilidad

Dos propiedades claves del producto farmacéutico son la solubilidad y la estabilidad del fármaco en solución en función del valor de pH. Se realizaron las pruebas en agua y HCl 0,1 N.

VII.2.3 Medios de disolución

Según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB) para productos farmacéuticos de liberación inmediata se consideran que los estudios de disolución deben evaluarse bajo un rango de pH fisiológico entre 1,2 y 6,8, por lo que se realizaron diferentes perfiles comparativo bajo los siguientes medios: (1) 0,060 N HCl pH 1,2; (2) una solución buffer de acetato pH 4,5; y (3) una solución buffer fosfato de pH 6,8. (13)

VII.2.3.1 Preparación de Medios de disolución

- El Buffer fosfato de potasio Monobásico pH=6,8: se pesaron $40,844 \pm 0,001$ g de KH_2PO_4 y se disolvieron en 5 L de agua desionizada. El pH fue ajustado a $\text{pH}=6,80 \pm 0,05$ con solución de NaOH, finalmente se llevó a volumen de 6 litros con agua desionizada.
- El Buffer acetato de pH=4,5: se pesaron $17,942 \pm 0,001$ g de Acetato de sodio trihidratado y se disolvieron en 84 mL de ácido acético 2N, finalmente se llevó a un volumen de 6 litros con agua desionizada.
- El medio ácido de pH 1,2; se preparó con 30 mL de Ácido Clorhídrico concentrado los cuales se disolvieron en 6 litros de agua desionizada.

VII.2.4 Desgasificación

Los medios de disolución poseen gases disueltos, los cuales fueron eliminados antes de proceder a los análisis para evitar modificaciones en los resultados de los ensayos. Para ello se realizó el siguiente procedimiento: calentamiento del medio a 41 °C con agitación moderada, filtración inmediata por succión a través de una membrana de 0,45 µm, seguido de una aplicación de vacío con agitación vigorosa por aproximadamente 10 minutos y por último con ultrasonido por un tiempo de 10 minutos.

VII.2.5 Volumen de llenado de vasos

Cuando se desarrolla un procedimiento de disolución, uno de los requisitos es tener *condiciones de exceso de medio* (condición *sink*). El volumen utilizado para el llenado de los vasos fue de 900 mL, ya que el apartado <1092> Procedimientos de Disolución de la USP cita que para aparatos con canastillas o paletas, el volumen de disolución más común es de 900 mL.

VII.2.6 Aparato disolutor

La elección del aparato para el análisis se basó en el conocimiento recopilado de la información obtenida por la revisión bibliográfica. El Apartado <1092> de la USP nos indica que el *Aparato 1* y el *Aparato 2* son los aparatos que se utilizan con mayor frecuencia para las formas farmacéuticas orales.

Se utilizó el *Aparato 2* (Paletas) para los ensayos de disolución, debido a que las tabletas permanecían en el fondo de los vasos del disolutor. No siendo necesario el uso de canastillas.

VII.2.7 Agitación

La agitación recomendada para el *Aparato 2* (Paleta) para tabletas de liberación inmediata según el apartado <1092> es de 50 o 75 rpm. La velocidad de agitación de las paletas se realizó a 50 rpm, obteniéndose a esta velocidad la desintegración completa de las tabletas.

VII.2.8 Temperatura

Una de las condiciones más importantes en los ensayo de disolución es la temperatura la cual debe ser de $37 \pm 0,5$ °C, esta permite simula la temperatura interna de un organismo vivo, permitiéndonos realizar un análisis *in vitro*.

VII.2.9 Diseño de estudio del ensayo de disolución para los perfiles comparativos

VII.2.9.1 Tiempos de muestreo

Para las formas farmacéuticas de liberación inmediata, la duración del procedimiento es usualmente entre 30 o 60 minutos. De acuerdo con el SCB, los fármacos altamente solubles y altamente permeables formulados como productos que se disuelven rápidamente no requieren estar sujetos a un perfil de comparación si demuestran una liberación del 85% o más de la sustancia activa dentro de 15 minutos. Sin embargo, la mayoría de los productos no caen dentro de esta categoría, como es el caso del fármaco Ticolchicósido, el cual presenta características de un medicamento de categoría III del SCB.

El apartado <1092> indica que los perfiles de disolución de productos de liberación inmediata por lo general presentan un incremento gradual que alcanza entre el 85% y 100% en un período de aproximadamente 30 y 45 minutos. De este modo, los tiempos de disolución en el rango de 15, 20, 30, 45 y 60 minutos son comunes para la realización de los perfiles de disolución de la mayor parte de los productos de liberación inmediata.

VII.2.9.2 Toma de muestras

En la realización de los perfiles de disolución comparativa los tiempos de toma de muestras fueron: 5, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 minutos. La toma de las muestras (muestreo) se realizó con jeringas de plásticos unidas a cánulas de acero inoxidable, tomando de cada vaso una muestra de una zona a una distancia media entre la superficie del medio y la parte superior de la paleta rotatoria y a una distancia aproximada de 10 mm de la pared del vaso. Las muestras tomadas fueron filtradas con un filtro de tamaño de poro de 0,22 μm . Se requiere la filtración de las muestras para prevenir que partículas no disueltas del fármaco entren en la muestra en análisis y luego se disuelvan.

VII.2.9.3 Curvas de calibración para el ensayo de disolución

Para el análisis cuantitativo de los perfiles de disolución se utilizaron curvas de calibración para cuantificar el porcentaje disuelto de principio activo. Estas curvas de calibración se prepararon a partir del patrón de referencia de Tiocolchicósido, disolviendo la cantidad de principio activo previamente pesada en los diferentes medios de disolución que se utilizaron en los perfiles de disolución. En estos mismos medios de disolución se realizaron los enrasos correspondientes.

Las curvas realizadas se prepararon en un rango de concentraciones entre 25% y 150% de Tiocolchicósido. Donde la concentración del 100% de Tiocolchicósido equivale a 4 mg de principio activo presentes en 900 mL de solución, la cual es la concentración de trabajo en la determinación de los perfiles de disolución. Las concentraciones de los patrones se determinaron en mg/mL y se presentan a continuación:

Tabla 5. Concentraciones de Tiocolchicósido para la curva de calibración.

%	Volumen alícuota (mL)	Volumen (mL)	Concentración (mg/mL)
25	1	10	0,00103
50	2		0,00206
75	3		0,00309
100	4		0,00412
125	5		0,00515
150	6		0,00618

El apartado <1092> indica que el coeficiente de correlación R^2 debe ser mayor a 0,98 demuestra linealidad.

VII.2.9.4 Tratamiento de las muestras para el perfil de disolución

Se tomaron 6 tabletas del producto y se colocó una tableta en cada vaso del disolutor, previamente llenado con el medio de disolución y en las condiciones establecidas para la disolución. Para cada tiempo especificado anteriormente, se tomaron alícuotas de la muestra disuelta y se filtraron a través de filtros de nylon de 0,45 μm .

A través de las curvas de calibración se obtuvo las concentraciones en mg/mL de Tiocolchicósido liberado de los medicamentos. La realización de estos procedimientos se llevó a cabo sin reposición de medio, es decir, que a medida que se tomaban alícuotas de muestra, el volumen de medio de disolución disminuía, consideración que se tuvo en cuenta para la determinación de las concentraciones de Tiocolchicósido liberado.

VII.2.9.5 Valoración de método analítico

La valoración de una muestra de disolución es una determinación espectrofotométrica o por HPLC. El método preferido de análisis es la determinación espectrofotométrica puesto que los resultados se pueden obtener rápidamente, el análisis es sencillo y se emplean menos disolventes. Los primeros análisis de este trabajo para determinar el porcentaje de principio activo liberado en el transcurso del tiempo en los medicamentos, se realizó por espectrofotometría UV-Visible.

VIII. ADECUACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO PARA EL ANALISIS DE CONTENIDO

Se realizaron 5 inyecciones de patrón a través del HPLC, obteniéndose la precisión de las condiciones cromatográficas del método la cual podemos observar en la Figura 14, con un tiempo de retención promedio $t_R = 7,337$ min, una desviación estándar (DS) de 0,042 y un porcentaje de coeficiente de variación (CV) de 0,57%. El apartado <1092> de la USP cita que, un análisis por HPLC debe ser menor o igual a 2% de CV para cinco o seis determinaciones estándar. Lo cual nos indica que los resultados a obtener son confiables.

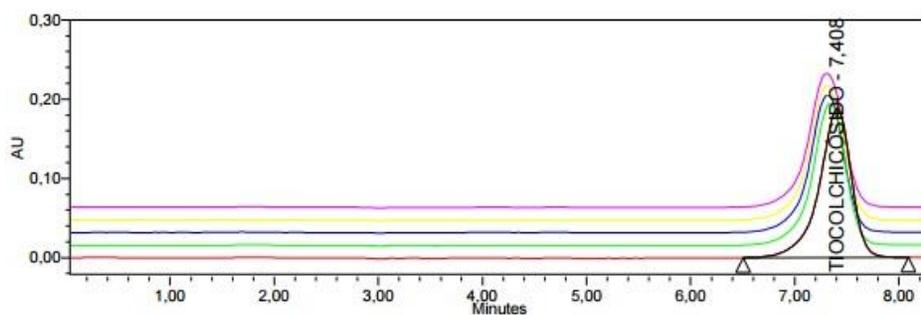


Figura 14. Adecuación del sistema Análisis de contenido.

Establecidas las condiciones cromatográficas óptimas, se realizó la curva de calibración para la determinación de contenido de THC en las Muestras.

Tabla 6. Adecuación del sistema cromatográfico para la determinación del contenido de Tiocolchicósido en las muestras.

Inyecciones	Tiempo de retención (min)	Áreas (AU)
1	7,41	4016432
2	7,34	4022461
3	7,32	4045819
4	7,31	4078110
5	7,31	4062631
Promedio	7,34	4045091
Desviación Estándar (DS)	0,04	26134
CV (%)	0,57	0,6

VIII.1 Determinación de contenido de Tiocolchicósido

Para las diferentes muestras se obtuvieron los siguientes contenidos de Tiocolchicósido:

Tabla 7. Contenidos de Tiocolchicósido para las muestras analizadas..

Medicamentos	Contenido de THC (mg)	% Contenido respecto a lo declarado	DS	CV
1	4,1	102,5	0,07	1,73
2	3,8	95	0,08	2,33
3-A	3,9	97,5	0,07	2,01
3-B	3,9	97,5	0,08	2,05
4	3,9	97,5	0,08	2,09

El apartado <1092> de la USP indica que los coeficientes de variación en un análisis realizado en un sistema cromatográfico deben ser menor o igual al 2%. Los valores de CV (%) obtenidos para cada medicamento no poseen diferencias significativas con respecto al valor estipulado por el apartado <1092>. También podemos observar que los valores con respecto a la cantidad que declaran se encuentran entre el 95-102%.

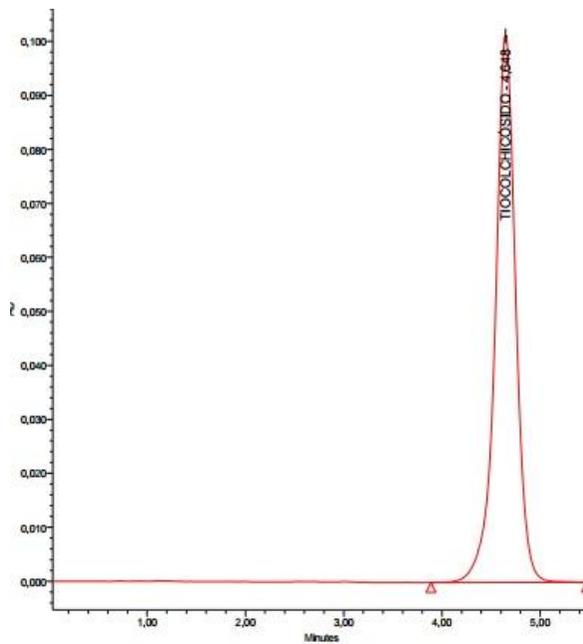


Figura 15. Cromatograma de Ticolchicósido. Determinación de contenido.

IX. DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA ANALITICA

IX.1 Pruebas de solubilidad

Las pruebas de solubilidad para Ticolchicósido, dieron resultados donde el principio activo fue soluble en agua y en medio ácido.

Tabla 8. Solubilidad el Ticolchicósido en agua y medio ácido.

Medio	Solubilidad	Reacción
Agua	Soluble	No
HCl 0,1 N	Soluble	No

IX. 2 Valoración por espectrofotometría UV-visible.

IX.2.1 Determinación de longitud de onda

En un comienzo se realizó la determinación de la longitud de onda de trabajo. Para ello, a una solución patrón del estándar puro de Ticolchicósido al 100% del contenido que declaran los medicamentos, se le realizó un barrido de longitudes de ondas entre 200 y 400 nm. Obteniéndose dos máximos de absorción presentes en el espectro.

Se escogió como longitud de onda de trabajos $\lambda = 260$ nm respectivamente para los diferentes medios por ser la longitud de onda de máxima absorbancia. En esta longitud de onda se obtiene la máxima sensibilidad, ya que el cambio en la absorbancia por unidad de concentración es mayor en este punto, generando un buen cumplimiento de la Ley de Beer.

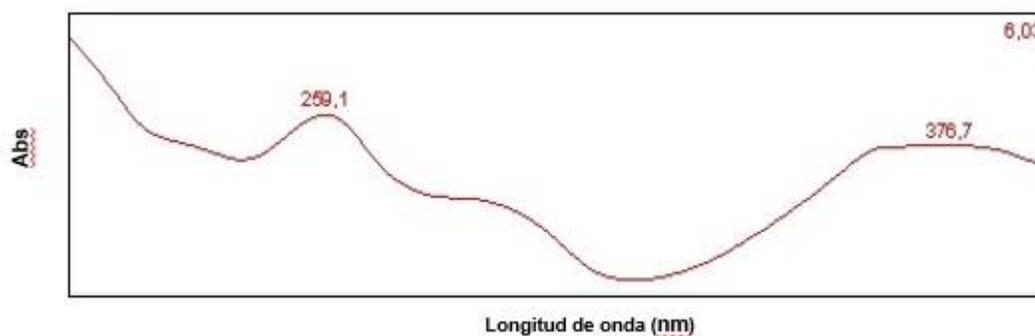


Figura 16. Espectro UV-Visible principio activo Ticolchicósido.

Obtenida la longitud de onda de trabajo correspondiente, se llevaron a cabo los estudios de disolución para el medicamento innovador en los diferentes medios de disolución.

IX.2.2 Perfiles de disolución del medicamento 1 por espectrofotometría UV-Visible

IX.2.2.1 Perfil de disolución del medicamento 1 en buffer fosfato pH= 6,8 por UV-Visible.

IX.2.2.1.1 Curva de calibración en medio buffer fosfato pH=6,8

Una vez que se obtuvo la longitud de onda de trabajo (260 nm), se procedió a la preparación de una curva de calibración a partir del patrón de referencia, como se indica en el apartado VII.2.9.3.

La curva presenta un coeficiente de determinación R^2 de 0,99. Cumpliendo con los criterios del apartado <1092>, el cual indica que existe linealidad cuando R^2 es mayor a 0,98.

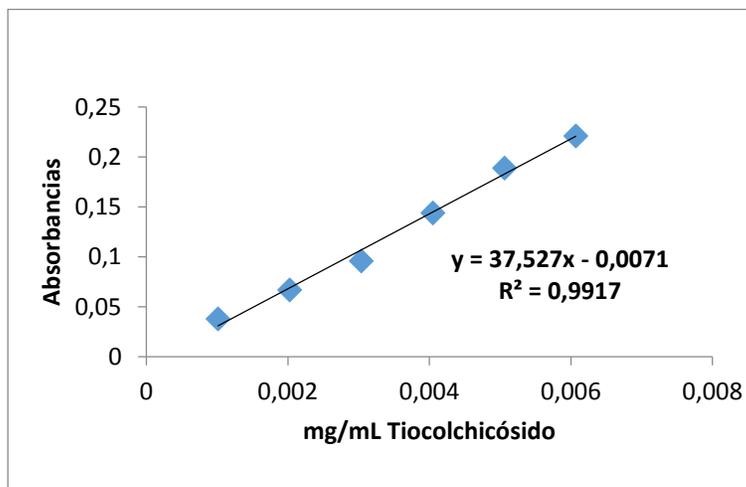


Figura 17. Curva de calibración por espectrofotometría UV-Visible en medio buffer fosfato pH=6,8.

IX.2.2.1.2 Análisis de la muestra en buffer fosfato pH= 6,8 por espectrofotometría UV-Visible.

A partir del diseño de estudio planteado para el análisis de comparación de perfiles (Apartado VII.2.9), se comenzó a realizar el estudio para el medicamento 1, obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 9).

Los valores de concentración que se obtuvieron se expresan en % disuelto del medicamento por tabletas para los distintos tiempos en los que se realizaron toma de muestra.

Tabla 9. Porcentaje disuelto de Tiocolchicósido en medio de disolución de buffer fosfato a pH=6,8. Medicamento 1. Espectrofotometría UV-Visible.

TIEMPO (min)	% DISUELTO	DS	CV
0	0	0	0
5	123,25	7,99	6,48
10	117,98	5,81	4,93
15	113,24	7,58	6,69
20	109,61	5,48	4,99
30	108,24	5,24	4,84
45	112,58	9,12	8,1
60	105,75	4,67	4,42

DS= Desviación estándar CV=Coficiente de variación

Los valores obtenidos de porcentaje disuelto del medicamento son mayores al 100% desde la primera toma de muestra, a los 5 minutos empezados la disolución, indicando que el medicamento es liberado completamente. Estos resultados no son congruentes, con la cantidad que declara el medicamento, ya que supone que se ha liberado más fármaco que el que declara.

A partir de los porcentajes disueltos se obtuvo el perfil de disolución Figura 18.

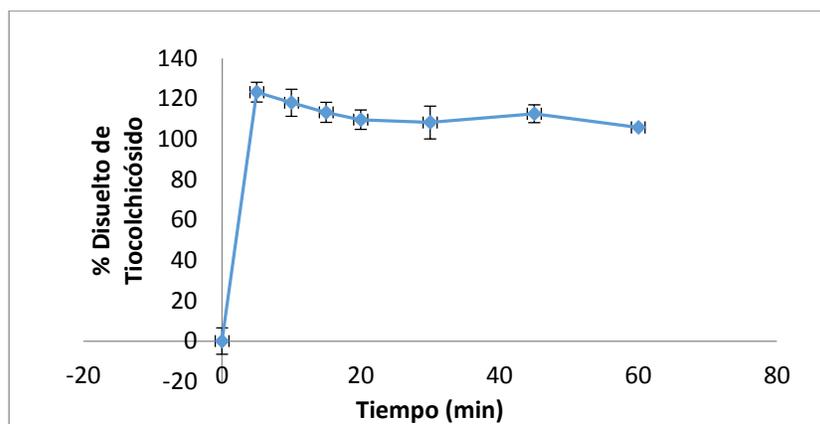


Figura 18. Perfil de disolución medicamento 1 a pH=6,8 por espectrofotometría UV-Visible.

IX.2.2.2 Perfil de disolución del medicamento 1 en buffer acetato pH= 4,5 por espectrofotometría UV-Visible.

IX.2.2.2.1 Curva de calibración en buffer acetato pH= 4,5

La curva de calibración realizada para el medio de Buffer acetato presenta un coeficiente de correlación R^2 de 0,99.

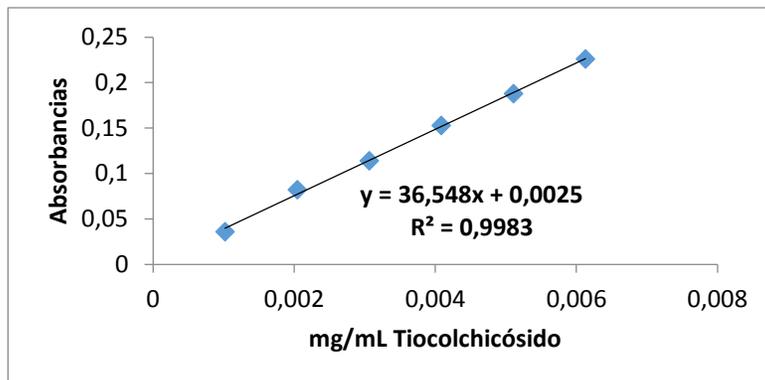


Figura 19. Curva de calibración de medicamento innovador por espectrofotometría UV-Visible en medio Buffer Acetato pH=4,5.

IX.2.2.2.2 Análisis de la muestra en buffer acetato pH= 4,5 por espectrofotometría UV-Visible.

Al igual que en el análisis de la muestra a pH=6,8, se obtuvieron valores de porcentaje disuelto para pH 4,5 mayores al 100% desde el comienzo de la disolución. Observando los valores de coeficiente de variación (CV) en la Tabla 10 para el análisis del medicamento en el medio de disolución a pH 4,5, podemos notar que se obtuvieron resultados similares al medio buffer fosfato.

Tabla 10. Porcentaje Disuelto de Tiocolchicósido en medio de disolución de buffer acetato a pH=4,5 del medicamento 1 por espectrofotometría UV-Visible.

TIEMPO (min)	% DISUELTO	DS	CV
0	0	0	0
5	123,33	9,06	7,35
10	121,91	3,3	2,7
15	120,79	3,21	2,66
20	121,19	2,74	2,26
30	119,89	3,13	2,61
45	116,6	3,51	3,01
60	117,09	2,86	2,44

DS= Desviación estándar CV=Coeficiente de variación

La grafica de perfil de disolución muestra valores por encima del 100% de disolución del principio activo.

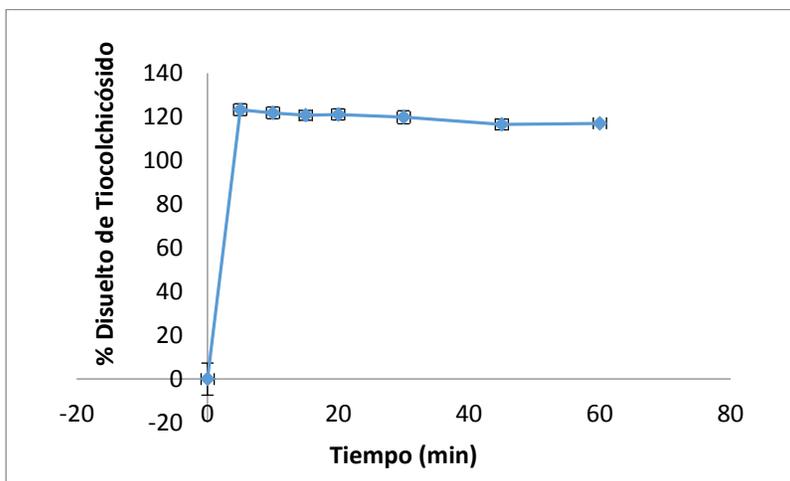


Figura 20. Perfil de disolución medicamento 1 a pH=4,5 por espectrofotometría UV-Visible.

IX.2.2.3 Perfil de disolución del medicamento 1 en ácido clorhídrico a pH= 1,2 por espectrofotometría UV-Visible.

IX.2.2.3.1 Curva de calibración en ácido clorhídrico pH= 1,2.

Se obtuvo una curva de calibración con un coeficiente de correlación o determinación de 0,99.

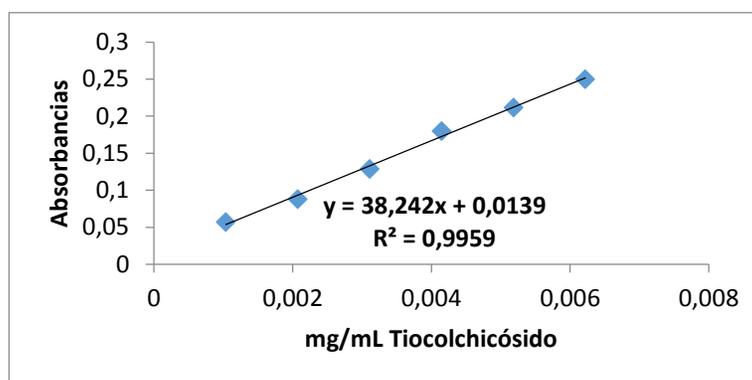


Figura 21. Curva de calibración por espectrofotometría UV-Visible del medicamento 1 en el Medio ácido clorhídrico pH=1,2.

IX.2.2.3.2 Análisis de la muestra en ácido clorhídrico pH= 1,2 por espectrofotometría UV-Visible.

Los valores de porcentaje disuelto para pH 1,2 son mayores al 100% desde el comienzo de la disolución. Al igual que en los otros medios, se presenta el mismo comportamiento en el % disuelto del medicamento innovador para el medio a pH 1,2.

Tabla 11. Porcentaje disuelto de Tiocolchicósido del medicamento 1 en medio de disolución ácido clorhídrico a pH=1,2 por espectrofotometría UV-Visible.

TIEMPO (min)	% DISUELTO	DS	CV
0	0	0	0
5	119,51	10,68	8,94
10	112,69	9,54	8,47
15	107,08	5,43	5,06
20	106,69	6,89	6,46
30	103,36	4,88	4,73
45	102,23	4,42	4,32

DS= Desviación estándar CV=Coeficiente de variación

En este medio las tomas de muestra se realizaron hasta los 45 minutos, esto debido a que en las disoluciones anteriores realizadas para los buffer fosfato y acetato se observó que a partir de los 30 minutos se alcanzaba una alta liberación del principio activo.

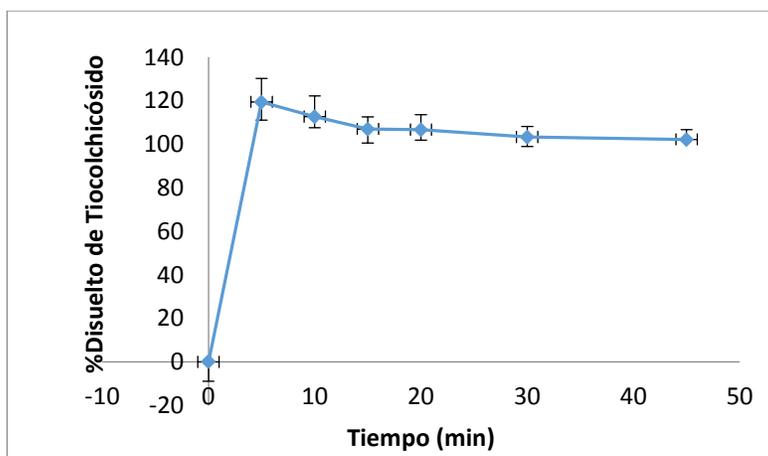


Figura 22. Perfil de disolución medicamento 1 a pH=1,2 por espectrofotometría UV-Visible.

IX.2.3 Comparación de los perfiles de disolución del medicamento 1 por espectrofotometría UV-Visible.

Los valores altos obtenidos de absorbancia y el valor de porcentaje disuelto que se obtuvo en el tiempo mínimo de disolución a partir de las absorbancias de las muestras, nos indican que al realizar el análisis por espectrofotometría UV-Visible, existe algún compuesto, puede deberse a un excipiente presente en el medicamento, que absorbe radiación en el rango UV-Visible a la misma longitud de onda del Tiocolchicósido, lo que aumenta el valor de absorbancia dado por el espectrofotómetro ya que las absorbancias son aditivas. Debido a que el método por espectrofotometría UV-Visible no es capaz de separar ni discriminar la señal de compuestos que se solapan con la señal de interés, dando resultados erróneos e interfiriendo en el análisis; es necesario utilizar una metodología analítica que sea capaz de separar las señales para la cuantificación o determinación del principio activo de interés. Por esto se planteó un cambio en la metodología en desarrollo, cambiando la técnica analítica para la valoración, realizándose por cromatografía líquida de alta resolución.

X. VALORACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

X.1 Condiciones cromatográficas

Se utilizaron las condiciones cromatográficas del Antecedente III.2. Se determinó la longitud de onda de trabajo empleando un detector de arreglo de diodos del equipo HPLC como espectrofotómetro. A un patrón del estándar de Tiocolchicósido se le realizó un barrido de longitudes de ondas entre 200 y 400 nm, para verificar su espectro, y obtener la longitud de onda adecuada al equipo. (Figura 15)

Se escogió la longitud de onda de trabajo a 260 nm, misma longitud de onda utilizada para espectrofotometría UV-Visible, por ser la longitud de mayor absorbancia.

X.2 Preparación fase móvil

La fase móvil utilizada para la valoración de los ensayos de disolución de Tiocolchicósido fue la descrita en el antecedente III.2.

X.3 Optimización de las condiciones cromatográficas para el ensayo de disolución.

Las condiciones cromatográficas utilizadas por HPLC fueron las siguientes, con los instrumentos descritos en el apartado VI.4:

Columna: Fase Inversa ET 250mm x 8 mm x 4 μ m Nucleosil 7 C18 Art. 720 018

Flujo: 1 mL/min

Volumen de inyección: 40 μ L

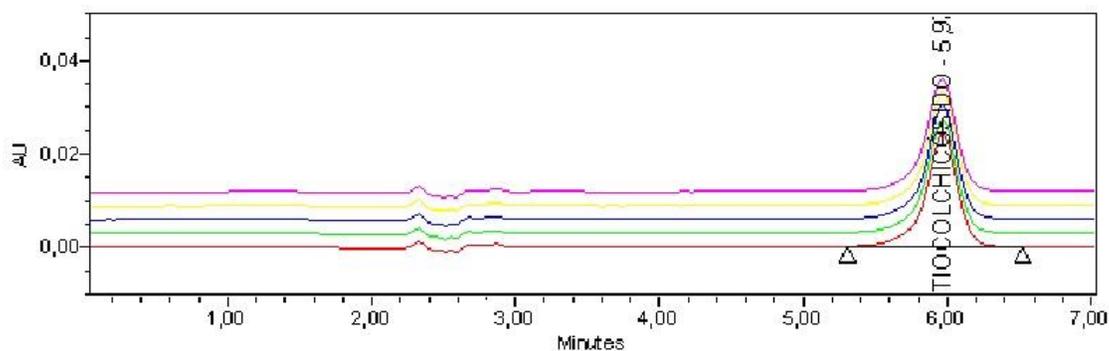
Longitud de Onda: 260 nm

La optimización de estas condiciones cromatográficas se realizó inyectando patrones de Tiocolchicósido al 100% de la cantidad declarada en el medicamento. Un cromatograma con las mejores condiciones cromatográficas se muestra en la Figura 24, indicando la precisión del método cromatográfico. Se puede observar que el Tiocolchicósido presento un tiempo de retención $t_R = 5,967$ min, con un desviación estándar de 0,003 y un CV del 0,04.

Tabla 12. Precisión del método por HPLC.

Inyecciones	Muestra	Tiempo de retención (min)	Área
1	Patrón 100%	5,97	379199
2		5,966	380473
3		5,966	383049
4		5,968	381437
5		5,963	3811478
Promedio Tiempo de retención		5,967	
DS		0,003	
CV		0,04	

DS= Desviación estándar CV=Coeficiente de variación

**Figura 23.** Precisión del método.

Con las condiciones cromatográficas óptimas se procedió a realizar las curvas de calibración, para los tres medios de disolución.

X.4 Curvas de Calibración

Las curvas de calibración preparadas para realizar la valoración por HPLC, fue bajo las mismas condiciones que para la metodología analizada por espectrofotometría UV-Visible las cuales se describen en el apartado VII.2.9.3.

Las inyecciones fueron realizadas por duplicado para cada patrón para la construcción de la curva. Con el patrón de 100% se realizó cinco inyecciones, para cálculos de precisión.

X.5 Tiempos de toma de muestra

Para el análisis por HPLC se trabajó el ensayo de disolución a un tiempo de 0 a 45 minutos. Ya que observando los valores de porcentaje disuelto del principio activo obtenidos por los perfiles de disolución en el análisis por UV-Visible, se alcanzaba valores de 100% o mayor de principio activo liberado después de los 30 minutos. Siendo no necesarias las tomas de muestra a un tiempo de 60 minutos. Los tiempos de toma de muestra están referidos en el apartado VII.2.9.1.

X.6 Perfiles de disolución

Las condiciones para la realización de los perfiles de disolución se encuentran mencionadas en el apartado VII.2.9.4

XI. PERFILES DE DISOLUCIÓN PARA EL MEDICAMENTO 1 POR HPLC.

XI.1 Perfil de disolución para el medicamento 1 en buffer fosfato pH= 6,8 por HPLC

XI.1.1 Medio buffer fosfato pH=6,8

Se obtuvo el siguiente cromatograma del medio Buffer fosfato pH=6,8 lo cual nos indica que no existe interferencia del medio, ni de la fase móvil o falta de absorbancia del principio activo, en el cual se observa la separación del analito de interés.

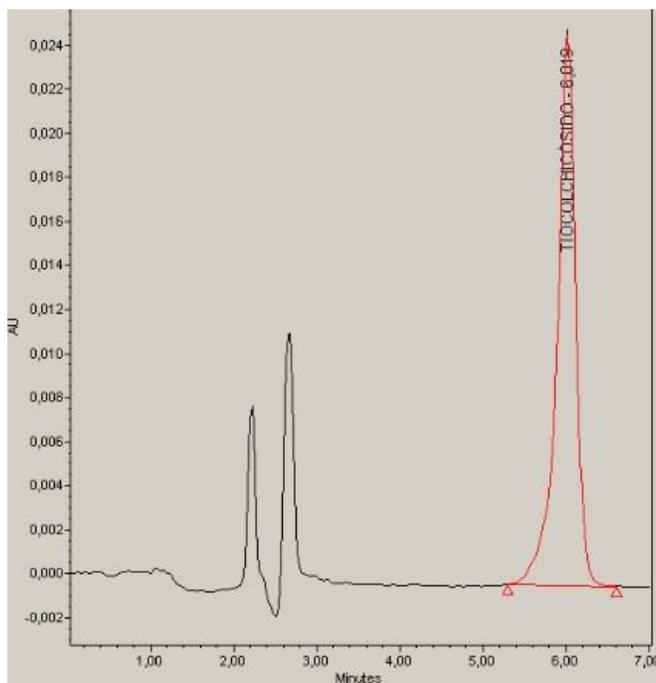


Figura 24. Cromatograma de patrón en medio buffer fosfato pH=6,8.

XI.1.2 Pureza cromatográfica de patrón

Se realizó el estudio de pureza de la solución patrón de Ticolchicósido, con el propósito de evaluar si no existen sustancias que estén coeluyendo con la señal cromatográfica de interés, estudiándose la curva de similitud (PA) y la curva del umbral de ruido (TH). Se obtuvo que el valor de PA es menor que el valor de TH, indicando que el patrón es puro de THC.

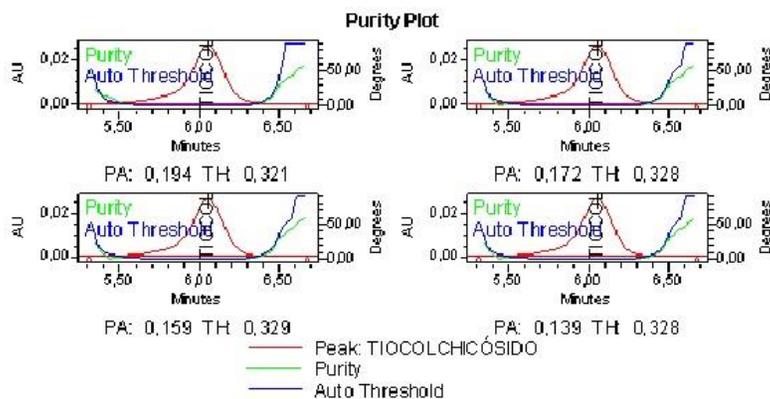


Figura 25. Pureza de pico de solución patrón en medio buffer fosfato pH= 6,8.

XI.1.3. Pureza de la muestra medicamento 1.

Se realizó la comparación de los valores de curva de similitud (PA) y la curva del umbral de ruido (TH), para la inyección de una muestra del producto Innovador obteniéndose que el valor de PA es menor al valor de TH, indicando que la muestra analizada contiene como principio activo Ticolchicósido.

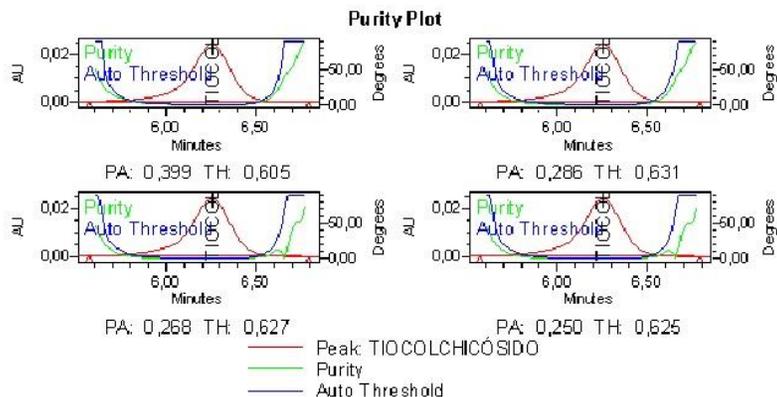


Figura 26. Pureza de Pico de la inyección del Medicamento 1 en medio Buffer Fosfato a pH=6,8.

XI.1.4 Curva de calibración en buffer fosfato pH= 6,8

La curva para Tiocolchicosido en este medio presenta un coeficiente de correlación R^2 de 0,999. Cumpliendo con el criterio de linealidad del apartado <1092> de la USP.

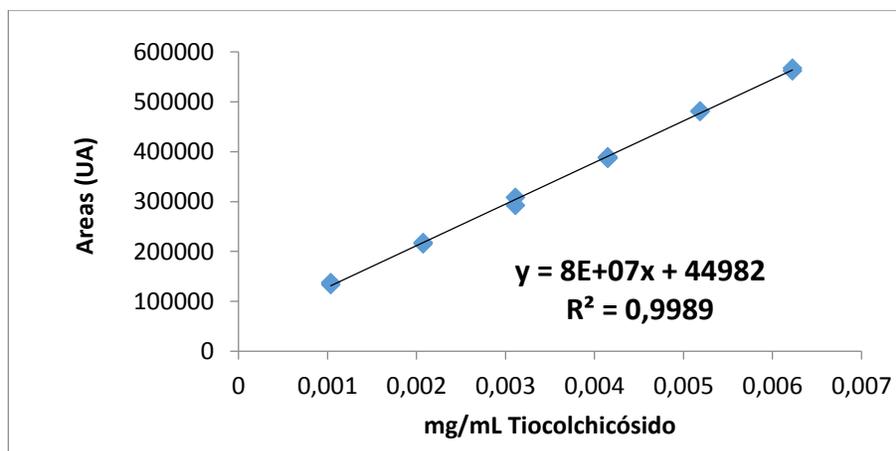


Figura 27. Curva de calibración para el medicamento 1 por HPLC en medio buffer fosfato pH=6,8.

XI.1.5 Análisis de la muestra por HPLC en medio buffer fosfato pH= 6,8

La metodología planteada por HPLC se realizó bajo las mismas condiciones que por espectrofotometría UV-Visible. Los porcentajes disueltos dados por esta metodología para el medicamento 1, fueron los siguientes:

Tabla 13. Porcentaje Disuelto de Tiocolchicósido en medio de disolución de buffer fosfato a pH=6,8 para el medicamento 1 por HPLC.

TIEMPO (min)	% DISUELTO	DS	CV
0	0	0	0
5	68,04	2,6	3,82
10	89,43	8,73	9,76
15	93,57	1,63	1,74
20	94,83	2,26	2,38
30	92,43	2,84	3,08
45	94,11	2,23	2,37

DS= Desviación estándar CV=Coeficiente de variación

Los valores de % Disuelto de Tiocolchicósido van incrementando a medida que aumenta el tiempo de disolución de tabletas, lo que es de esperarse debido a la liberación del principio activo. Para el medio de disolución buffer fosfato pH= 6,8 no se alcanza una liberación completa (100%) del medicamento a los 45 minutos. Sin embargo a partir de los 10 minutos se alcanza el 85% del principio activo liberado indicado en las normas. El coeficiente de variación (CV) según la FDA para la consideración de comparación de perfiles, nos indica que para tiempos menores de 15 minutos los CV deben ser menores al 20% y para tiempos mayores deben ser menores al 10%. Al observar los valores de %CV de la tabla, podemos notar que los valores son menores al 10% para todos los casos. Lo cual nos permite utilizar

el perfil obtenido para realizar comparaciones de perfiles, bajo las mismas condiciones. El comportamiento de liberación del principio activo en este medio se puede observar en la siguiente figura:

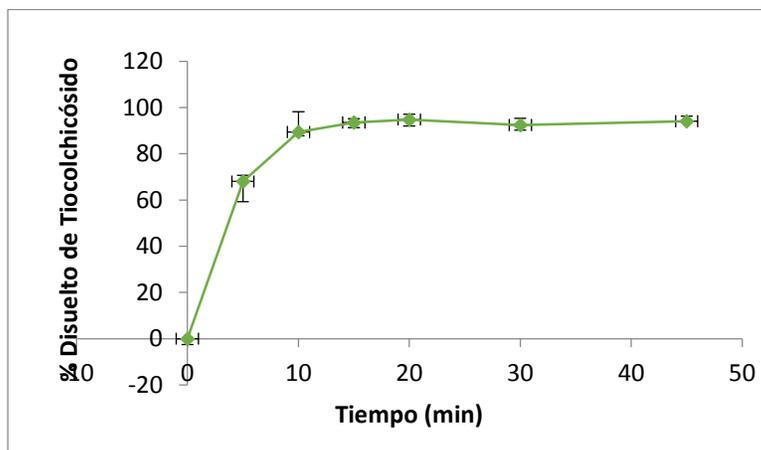


Figura 28. Perfil de disolución del medicamento1 a pH=6,8 por HPLC.

XI.2 Perfil de disolución para el medicamento 1 resolución en buffer acetato pH= 4,5 por HPLC.

XI.2.1 Medio buffer acetato pH=4,5

Se realizó la inyección de un patrón al 100%, obteniéndose el siguiente cromatograma:

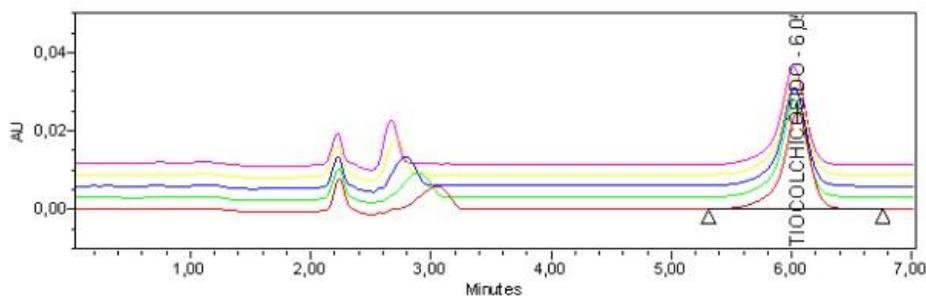


Figura 29. Inyecciones de patrón de Tiocolchicósido en medio buffer acetato pH= 4,5.

Observándose que no existe interferencias del medio o la fase móvil, con el analito de interés. Se observa la separación del principio activo.

XI.2.2 Pureza cromatográfica de patrón

Se realizó el estudio de pureza de la solución patrón de Tiocolchicósido, estudiándose la curva de similitud (PA) y la curva del umbral de ruido (TH). Para el estudio de pureza se realizó la comparación de los valores de PA y TH. Se pudo observar que el valor de PA es menor al valor de TH. Lo cual indica que el pico obtenido en el cromatograma es puro, es decir que el principio activo analizado es solo Tiocolchicósido.

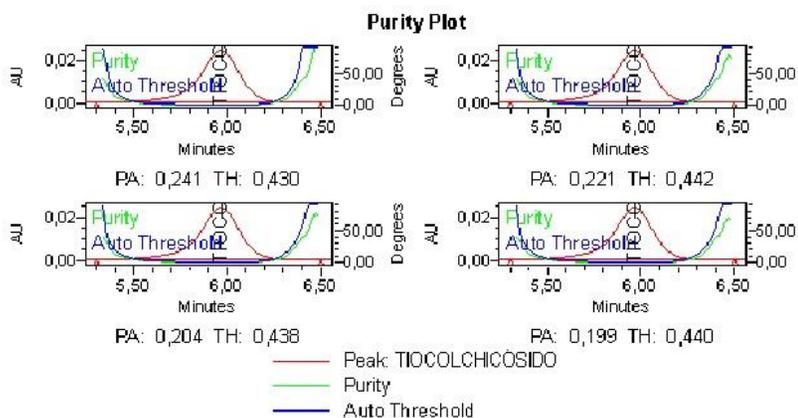


Figura 30. Pureza de pico de solución patrón en medio buffer acetato pH=4,5.

XI.2.3 Pureza de la muestra medicamento 1

Se realizó la comparación de los valores de curva de similitud (PA) y la curva del umbral de ruido (TH), para la inyección de una muestra del medicamento 1 obteniéndose que el valor de PA es menor al valor de TH, indicando que la muestra analizada contiene como principio activo solo el Tiocholchicósido.

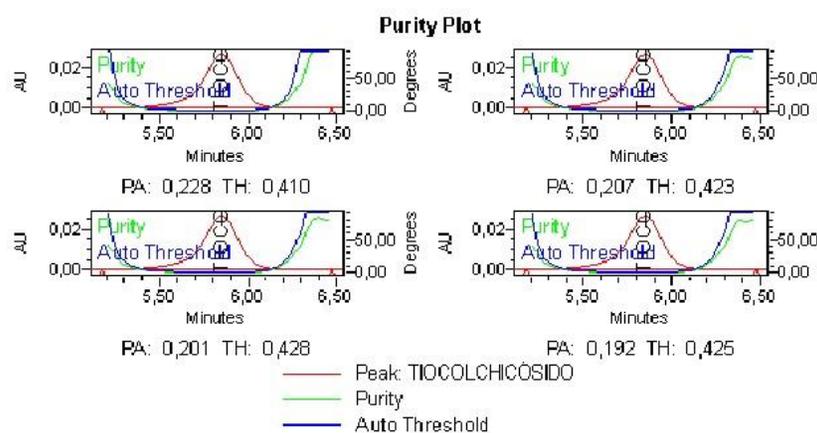


Figura 31. Pureza de pico de la inyección del medicamento 1 en medio buffer acetato a pH=4,5.

XI.2.4 Curva de calibración medicamento 1 por cromatografía de alta resolución en buffer acetato pH= 4,5.

La curva de calibración en medio buffer acetato tuvo un coeficiente de correlación R^2 de 0,999.

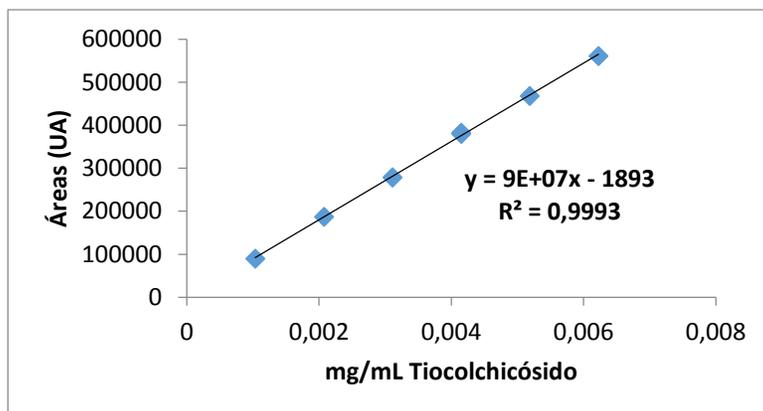


Figura 32. Curva de calibración por HPLC en medio buffer acetato pH=4,5.
Medicamento 1.

XI.2.5 Análisis de la muestra por HPLC en medio buffer acetato pH= 4,5

Los porcentajes disueltos dados por esta metodología para el medicamento 1, fueron los siguientes:

Tabla 14. Porcentaje Disuelto de Tiocolchicósido en medio de disolución de buffer acetato a pH=4,5. Medicamento innovador por HPLC.

TIEMPO (min)	% DISUELTO	DS	CV
0	0	0	0
5	81,22	4,87	5,99
10	96,82	1,35	1,39
15	98,59	1,15	1,17
20	98,81	1,30	1,32
30	98,99	1,33	1,34
45	100,20	1,33	1,33

DS= Desviación estándar CV=Coeficiente de variación

Para el medio de disolución buffer acetato pH= 4,5 se alcanza una liberación completa (100%) del medicamento a los 45 minutos. A partir de los 10 minutos se obtiene un porcentaje disuelto de THC mayor al 85% y los CV son menores al 10%, por lo cual los resultados obtenidos se pueden considerar para realizar comparación de perfiles. El comportamiento de liberación del principio activo en este medio se puede observar en la siguiente figura:

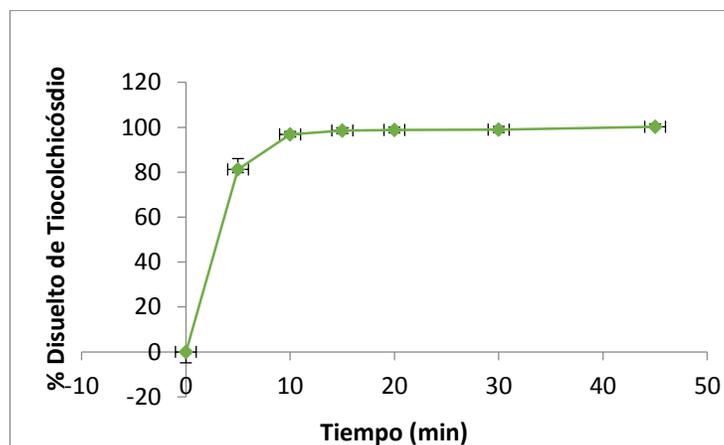


Figura 33. Perfil de disolución del medicamento innovador a pH=4,5 por HPLC.

XI.3 Perfil de Disolución para el medicamento 1 en HCl 0,060 N a pH= 1,2 por HPLC.

XI.3.1 Medio HCl 0,060 N a pH=1,2

Observando el cromatograma del patrón en este medio, no se observa interferencia del medio, ni de la fase móvil o falta de absorbancia del principio activo en el cromatograma.

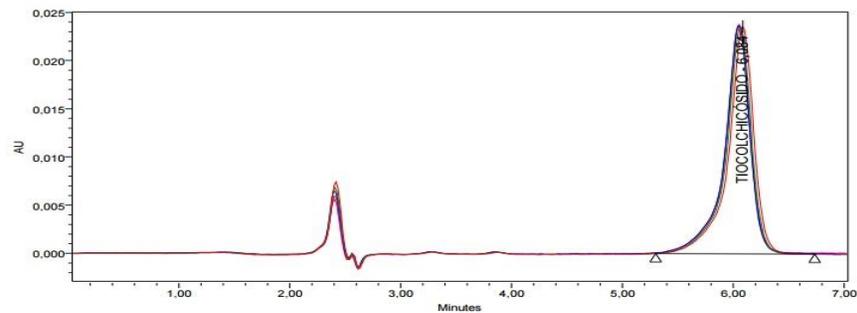


Figura 34. Inyecciones de patrón de Tiocolchicosido en medio HCl 0,060N pH= 1,2.

XI.3.2 Pureza cromatográfica de patrón

El estudio de pureza de la solución patrón de Tiocolchicosido, al comparar los valores de curva de similitud (PA) y la curva del umbral de ruido (TH), se obtuvo que PA es menor que TH. Lo cual nos indica que el compuesto analizado es solo Tiocolchicosido.

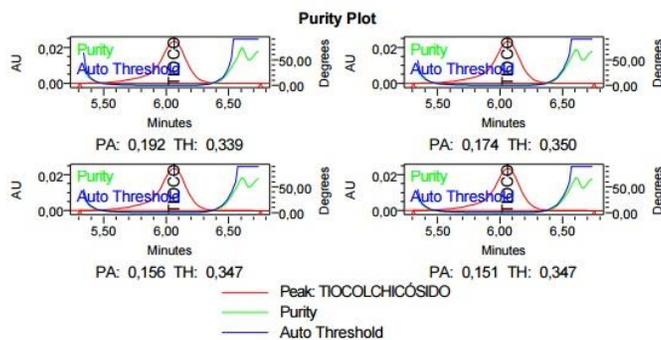


Figura 35. Pureza de Pico de solución patrón en medio HCl 0,060 N pH=1,2.

XI.3.3 Pureza de la muestra medicamento 1

Se realizó la comparación de los valores de curva de similitud (PA) y la curva del umbral de ruido (TH), obteniéndose que el valor de PA era menor al valor de TH, indicando que la muestra analizada contiene como principio activo puro de Ticolchicósido.

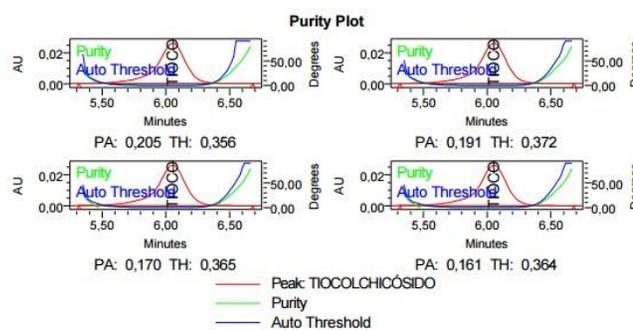


Figura 36. Pureza de pico de la inyección del medicamento 1 en medio HCl 0,060 N pH=1,2.

XI.3.4 Curva de calibración medicamento 1 por cromatografía de alta resolución en HCl 0,060 N a pH= 1,2.

La curva de calibración tuvo un coeficiente de correlación R^2 de 0,999.

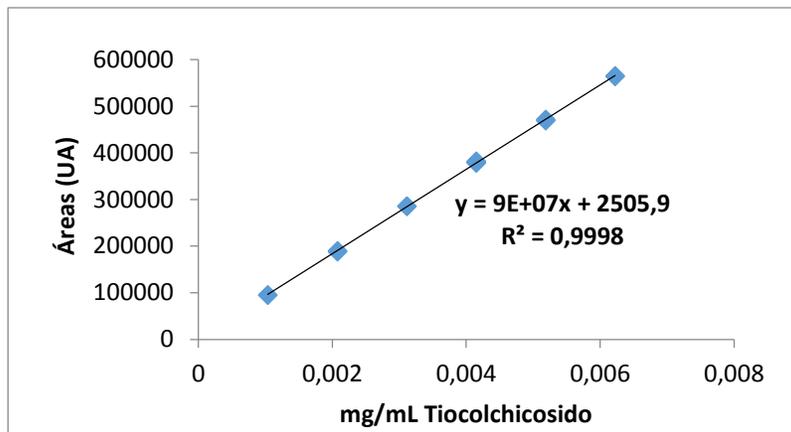


Figura 37. Curva de calibración por HPLC. Medio: Ácido Clorhídrico pH 1,2.

XI.3.5 Perfil de disolución para medicamento 1 en HCl 0,060 N a pH= 1,2.

Los porcentajes disueltos obtenidos por esta metodología para el medicamento 1 podemos observarlos en la Tabla 15.

Los valores de %CV para el medio a pH=1,2 son menores al 10%, al igual que para los demás medios, cumpliendo con las consideraciones de la FDA para realizar comparaciones de perfiles. Al observar los %disuelto podemos notar que se alcanza una liberación mayor al 85% a partir de los 10 minutos.

Tabla 15. Porcentaje Disuelto de Tiocolchicósido en medio de disolución de HCl 0,060 N a pH=1,2 para el medicamento 1 por HPLC.

TIEMPO (min)	% DISUELTO	DS	CV
0	0	0	0
5	71,19	6,14	8,62
10	96,89	3,46	3,57
15	100,67	4,77	4,74
20	100,65	3,41	3,39
30	100,45	3,58	3,57
45	99,65	4,13	4,14

DS= Desviación estándar CV=Coeficiente de variación

El comportamiento de la liberación del principio activo podemos verlo en el perfil de disolución, donde aumenta el porcentaje disuelto de Tiocolchicósido entre los minutos 5 y 15, y disminuye luego este porcentaje al llegar a los 45 minutos. Se supone que una vez liberado el 100% del principio activo, no hay nada que disminuya la cantidad presente liberada del fármaco debido a que el análisis se llevó a cabo de manera *in vitro*. Puede existir disminución si la muestra se degrada o si existe una falla en la metodología.

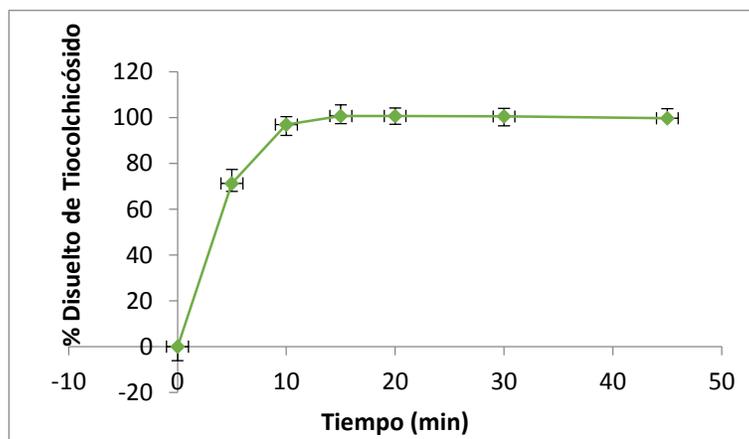


Figura 38. Perfil de disolución para medicamento 1 a pH= 1,2 por HPLC.

XI.4 Perfil de disolución para el medicamento 1 en agua a pH= 7,0 por HPLC.

XI.4.1 Medio Agua a pH=7,0

En el cromatograma se observa la señal del principio activo de interés, no se observa interferencia en el medio o en la fase móvil.

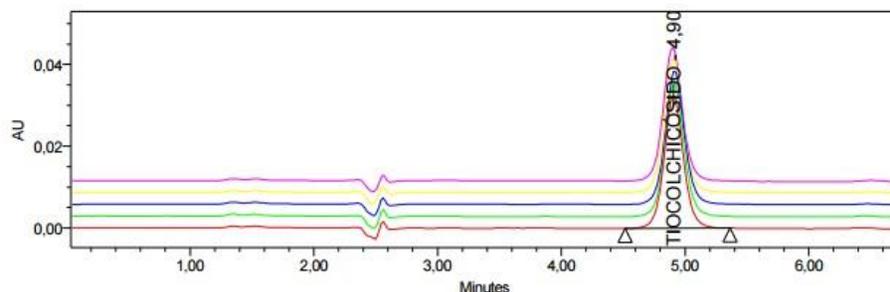


Figura 39. Inyecciones de patrón de Ticolchicósido en medio Agua a pH= 7,0.

XI.4.2 Pureza cromatográfica de patrón

La comparación de los valores de curva de similitud (PA) y la curva del umbral de ruido (TH), se obtuvo que PA es menor que TH. Lo cual nos indica que el compuesto analizado es Ticolchicósido.

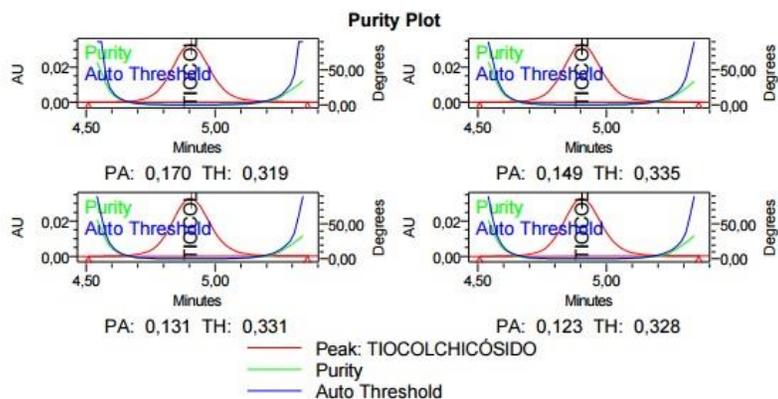


Figura 40. Pureza de pico de solución patrón en medio Agua a pH= 7,0.

XI.4.3 Pureza de la muestra medicamento 1

La pureza de la muestra se analizó comparando los valores de curva de similitud (PA) y la curva del umbral de ruido (TH), para la inyección de una muestra del medicamento 1. Se obtuvo que el valor de PA era menor al valor de TH, indicando que la muestra analizada contiene como principio activo Tiocolchicósido.

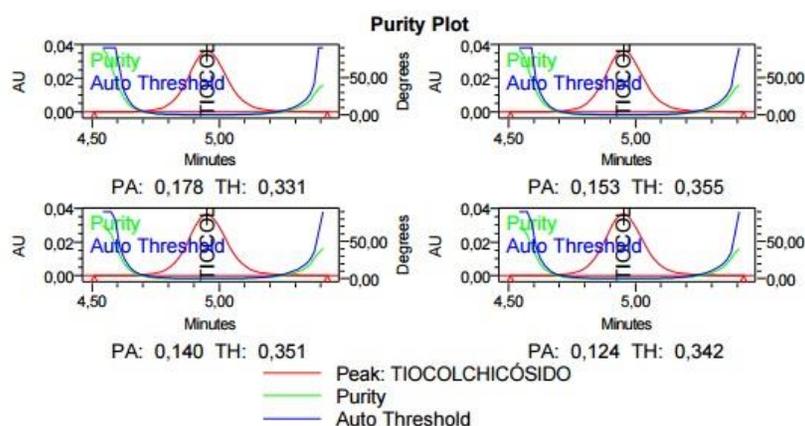


Figura 41. Pureza de pico de la inyección del medicamento 1 en Agua a pH=7,0.

XI.4.4 Curva de calibración medicamento 1 por HPLC en agua a pH= 7,0.

La curva de calibración de Tiocolchicósido en agua tuvo un coeficiente de correlación R^2 de 0,999.

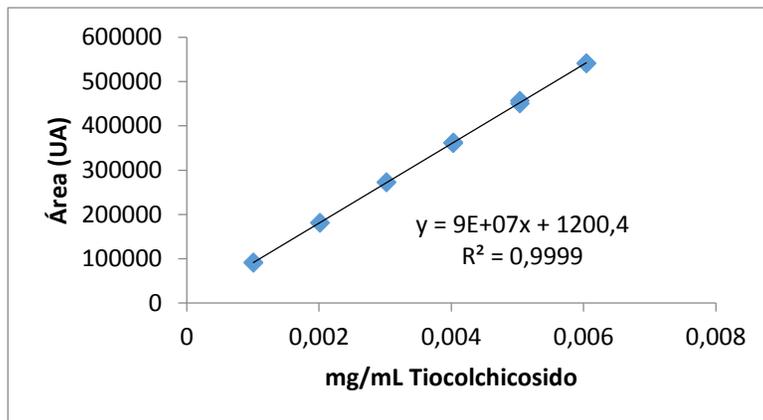


Figura 42. Curva de calibración por HPLC. Medio: Ácido Clorhídrico pH 1,2.

XI.4.5 Perfil de disolución para medicamento 1 en agua a pH=7,0.

Los valores de CV para la liberación del principio activo en agua son menores al 20% para tiempos menores a 15 minutos y menores al 10% para tiempos mayores. Según la FDA los perfiles que cumplen con estas características pueden ser usados para comparación de perfiles, para ello el medicamento debe liberar más del 85% del principio activo, observando la tabla 16, a partir de los 10 minutos se libera más del 85% del principio activo.

Tabla 16. Porcentaje disuelto de Tiocolchicósido en agua a pH=7,0 para el medicamento innovador por HPLC.

TIEMPO (min)	% DISUELTO	DS	CV
0	0	0	0
5	59,09	10,89	18,43
10	88,10	7,12	8,08
15	96,00	3,86	4,02
20	98,64	2,18	2,21
30	99,57	1,97	1,98
45	103,74	8,46	8,15

DS= Desviación estándar CV=Coeficiente de variación

El comportamiento de la liberación del principio activo podemos verlo en el perfil de disolución Figura 43.

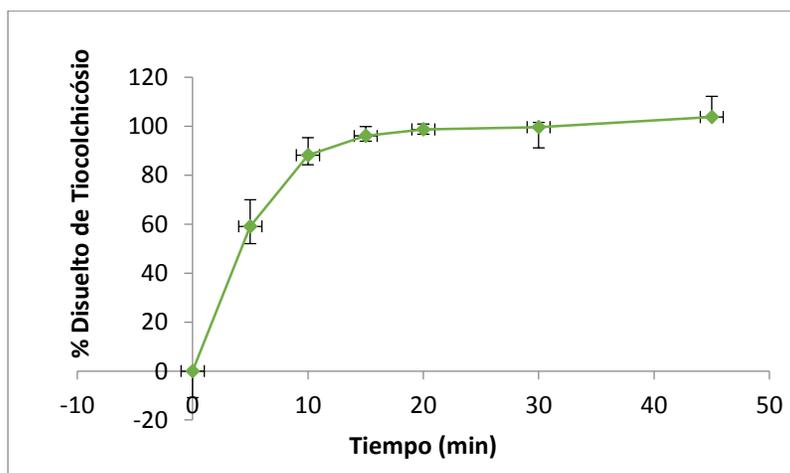


Figura 43. Perfil de disolución para medicamento innovador a pH= 7,0 por HPLC.

XII. PERFILES DE DISOLUCIÓN MEDICAMENTO 3-A POR HPLC

XII.1 Perfil de disolución para el medicamento 3-A en buffer fosfato pH= 6,8 por HPLC.

XII.1.1. Pureza de la muestra medicamento 3-A

Se realizó la comparación de los valores de curva de similitud (PA) y la curva del umbral de ruido (TH), para la inyección de una muestra del medicamento obteniéndose que el valor de PA es mayor al valor de TH. Valores de PA menores a TH indican que el compuesto analizado por HPLC es un compuesto puro, para este caso en particular el valor de PA es mayor a TH lo que nos indica que la muestra analizada no se encuentra pura. Comparando el valor obtenido para la pureza de la muestra del medicamento 1 con el del medicamento 3-A en el medio buffer fosfato de pH= 6,8, pudimos notar que el medicamento 1 en este medio posee un PA menor a TH siendo la muestra analizada Ticolchicósido. Puede deberse a que el medicamento 3-A en este medio sufra una degradación o alguna reacción con un excipiente, etc. Recordemos que cada medicamento posee excipientes diferentes dados por las industrias farmacéuticas que los fabrican.

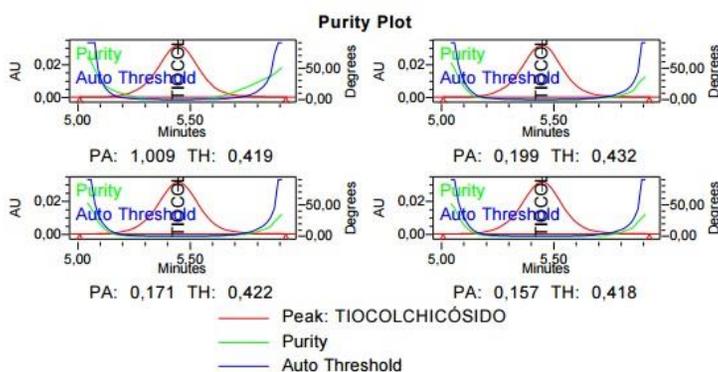


Figura 44. Pureza de pico de la inyección del medicamento genérico en medio buffer fosfato a pH=6,8.

XII.1.2 Curva de calibración medicamento 3-A por HPLC en buffer fosfato pH= 6,8.

La curva presento un coeficiente de correlación R^2 de 0,999.

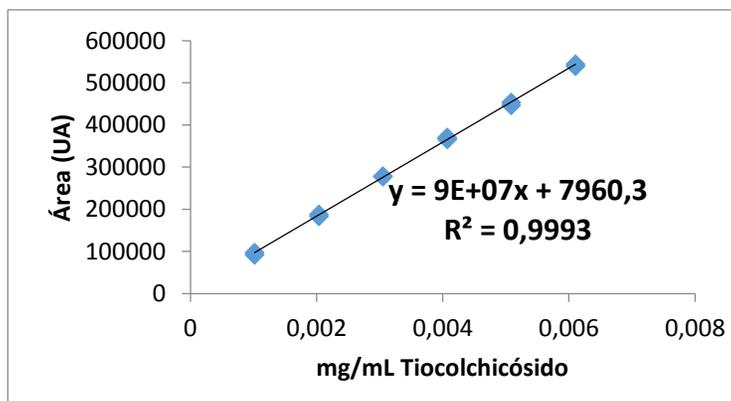


Figura 45. Curva de calibración para el medicamento 3-A en medio buffer fosfato a pH= 6,8.

XII.1.3 Perfil de disolución para medicamento genérico en medio buffer fosfato pH= 6,8.

La metodología planteada por HPLC para el medicamento 3-A se realizó con las mismas condiciones cromatográficas que en el análisis para el medicamento 1. Obteniéndose para el producto genérico los % disueltos de principio activo de la Tabla 17.

Podemos notar que durante el tiempo de análisis dado para la disolución, se alcanza una liberación del principio activo mayor al 85% a partir de los 15 minutos. Observando los valores de CV notamos que los valores son menores al 10%. Esto nos indica que podemos tomar los resultados para realizar comparación de perfiles.

En la figura 46 podemos observar el comportamiento de liberación del principio activo de la muestra.

Tabla 17. Porcentaje Disuelto de Ticolchicósido en medio de disolución de buffer fosfato a pH=6,8. Medicamento 3-A por HPLC.

TIEMPO (min)	% DISUELTO	DS	CV
0	0	0	0
5	69,99	5,38	7,69
10	91,30	5,47	5,99
15	100,14	4,40	4,40
20	102,21	2,70	2,65
30	103,72	1,64	1,58
45	104,19	1,58	1,52

DS= Desviación estándar CV=Coeficiente de variación

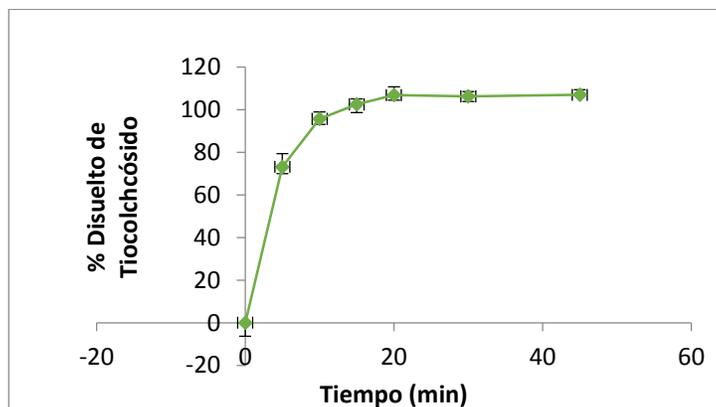


Figura 46. Perfil de disolución medicamento 3-A a pH= 6,8 por HPLC.

XII.2 Perfil de disolución para el medicamento 3-A en buffer acetato pH= 4,5 por HPLC.

XII.2.1 Pureza cromatográfica de la Muestra

Para la inyección de una muestra del medicamento 3-A se obtuvo que el valor de PA es menor al valor de TH, indicando que la muestra analizada contiene como principio activo Ticolchicósido.

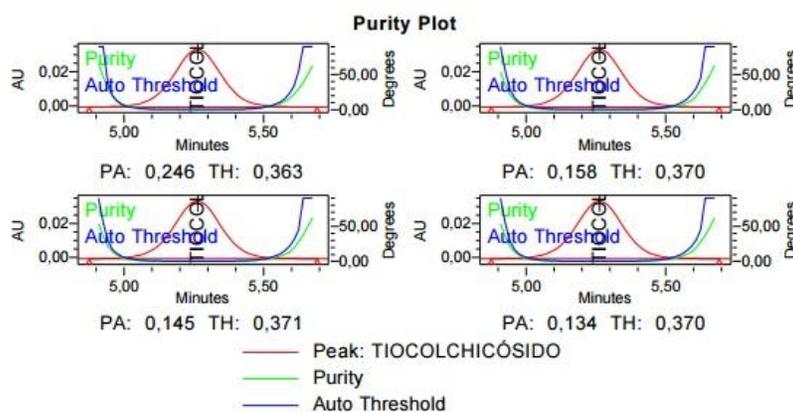


Figura 47. Pureza de pico de la inyección del medicamento 3-A en medio buffer acetato a pH=4,5.

XII.2.2 Curva de calibración medicamento 3-A por HPLC en buffer acetato pH= 4,5.

La curva de calibración en medio buffer acetato tuvo un coeficiente de correlación R^2 de 0,999.

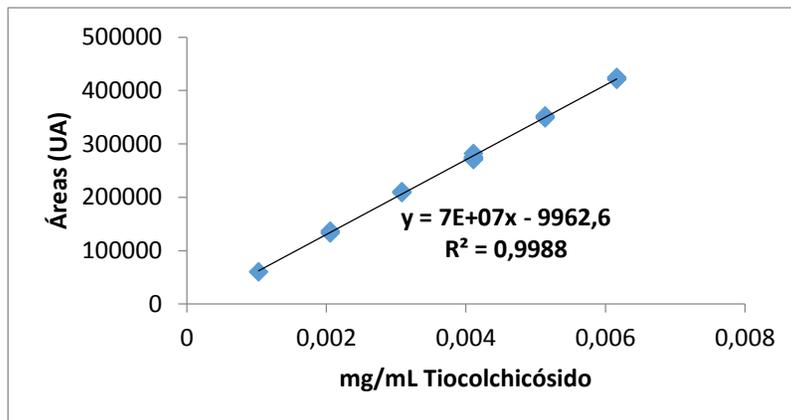


Figura 48. Curva de calibración para el medicamento genérico en medio buffer acetato pH= 4,5.

XII.2.3 Perfil de disolución para medicamento 3-A en medio buffer acetato pH= 4,5

En la Tabla 18 se observa que los % disueltos de Tiocolchicósido tienen un aumento prolongado en el tiempo para el medio a pH 4,5, alcanzándose más del 85% a partir de los 10 minutos de la disolución. Los valores de CV obtenidos son menores al 20% para tiempos menores a 15 minutos, y menores al 10% en los otros tiempos.

Tabla 18. Porcentaje disuelto de Tiocolchicósido en medio de disolución de buffer acetato a pH=4,5. Medicamento 3-A por HPLC.

TIEMPO (min)	% DISUELTO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	CV
0	0	0	0
5	80,42	8,59	10,68
10	95,35	3,98	4,18
15	96,06	2,86	2,98
20	96,55	2,08	2,15
30	96,66	1,93	1,99
45	97,02	2,16	2,23

DS= Desviación estándar CV=Coeficiente de variación

El proceso de liberación del principio activo del medicamento 3-A en este medio lo podemos observar en la figura siguiente:

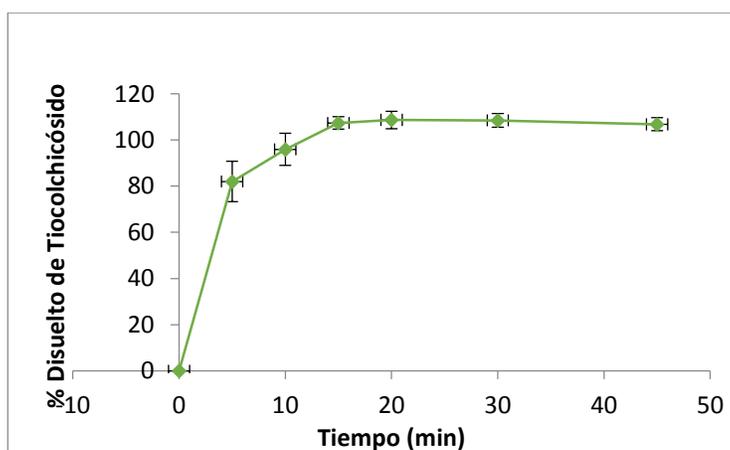


Figura 49. Perfil de disolución para el medicamento 3-A en medio buffer acetato a pH= 4,5.

XII.3 Perfil de disolución para el medicamento 3-A en HCl 0,060 N a pH= 1,2 por HPLC.

XII.3.1 Pureza cromatográfica de la muestra

Se realizó la comparación de los valores de curva de similitud (PA) y la curva del umbral de ruido (TH), para la inyección de una muestra del medicamento 3-A obteniéndose que el valor de PA era menor al valor de TH, indicando que la muestra analizada contiene como principio activo Tiocolchicosido.

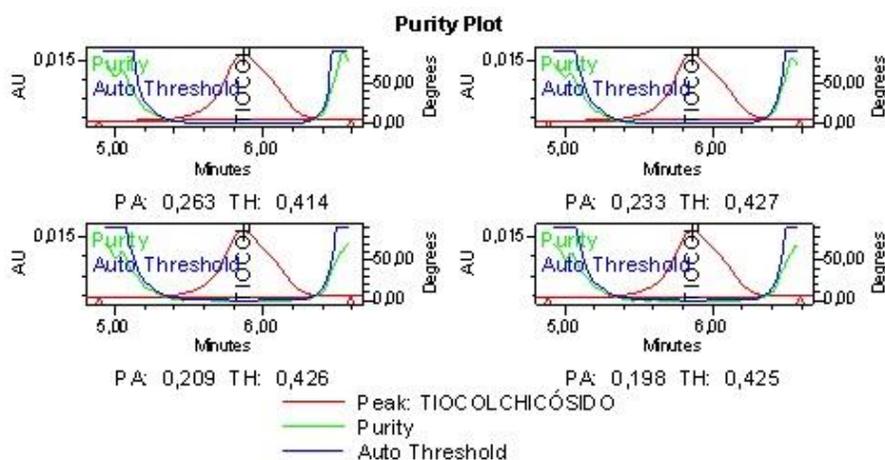


Figura 50. Pureza de pico de la inyección del medicamento 3-A en medio HCl 0,060 N a pH=1,2.

XII.3.2 Curva de calibración medicamento genérico por HPLC en HCl 0,060 N a pH= 1,2.

La curva de calibración tuvo un coeficiente de correlación R^2 de 0,999.

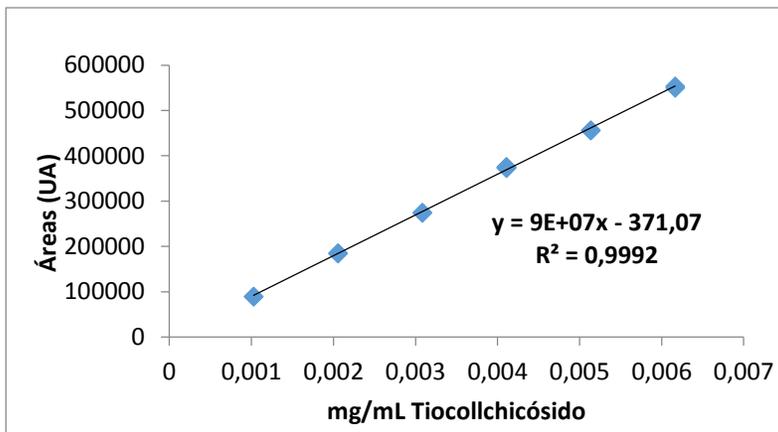


Figura 51. Curva de calibración para el medicamento 3-A en HCl a pH= 1,2.

XII.3.3 Perfil de disolución para medicamento 3-A en HCl 0,060 N a pH= 1,2.

Los porcentajes disueltos obtenidos por esta metodología para el medicamento 3-A fueron los siguientes:

Tabla 19. . Porcentaje Disuelto de Tiocolchicósido en medio de disolución de HCl 0,060 N a pH=1,2. Medicamento 3-A por HPLC,

TIEMPO (min)	% DISUELTO	DS	CV
0	0	0	0
5	83,01	5,94	7,16
10	95,09	2,20	2,31
15	98,79	1,63	1,65
20	99,51	2,03	2,04
30	99,83	2,40	2,40
45	99,76	2,37	2,37

DS= Desviación estándar CV=Coeficiente de variación

Se obtuvo un porcentaje disuelto mayor al 85% a partir de los 10 minutos. Los valores de CV son menores al 10% para cada medida, con estas consideraciones podemos realizar comparación de perfiles. El comportamiento de liberación del fármaco lo podemos observar en la siguiente figura:

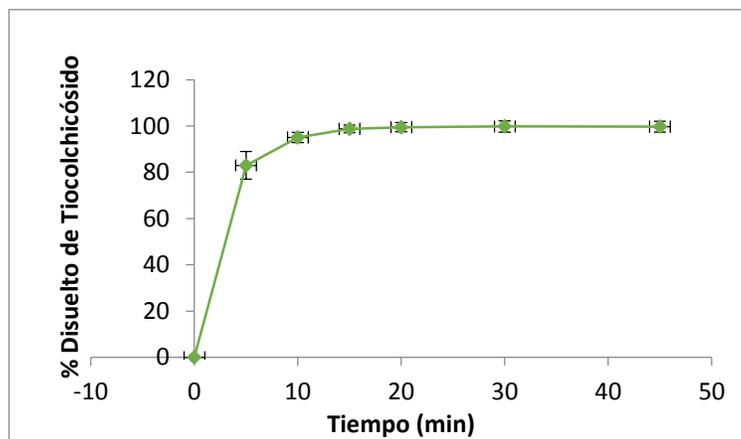


Figura 52. Perfil de disolución para el medicamento 3-A a pH= 1,2.

XII.4 Perfil de disolución para el medicamento 3-A en Agua a pH= 7,0 por HPLC.

XII.4.1 Pureza cromatográfica de la Muestra

El medicamento genérico en Agua a pH= 7,0 posee un valor de la curva de umbral de ruido (TH) menor al valor de la curva de similitud (PA), esto nos indica que la muestra analizada no es pura, esto puede deberse a que el en este medio sufra una degradación o alguna reacción con algún excipiente.

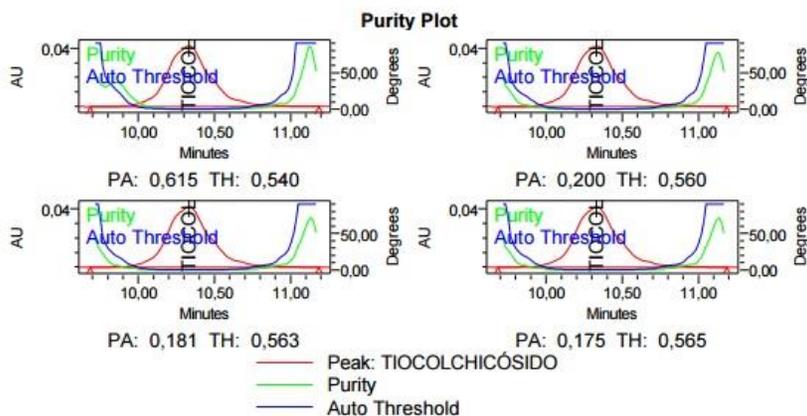


Figura 53. Pureza de pico de la inyección del medicamento 3-A en agua a pH=7,0.

XII.4.2 Curva de calibración medicamento 3-A por HPLC en agua a pH= 7,0.

La curva de calibración tuvo un coeficiente de correlación R^2 de 0,999.

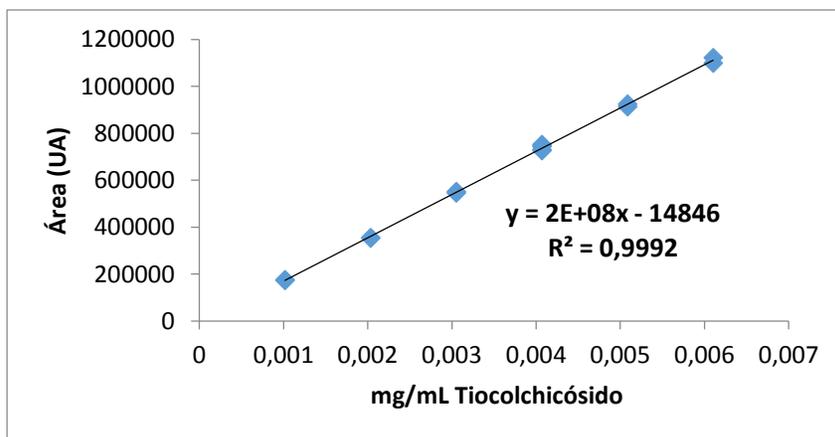


Figura 54. Curva de calibración para el medicamento 3-A en Agua a pH= 7,0.

XII.4.3 Perfil de disolución para medicamento 3-A en agua pH= 7,0.

Los porcentajes disueltos obtenidos por esta metodología para el medicamento 3-A, se encuentran en la Tabla 20.

En este medio se alcanza un porcentaje liberado de principio activo mayor al 85% a partir de los 10 minutos. Los valores de los CV son menores al 10% en todos los tiempos estudiados, por lo cual se puede realizar una comparación de perfiles.

Tabla 20. Porcentaje Disuelto de Tiocolchicósido en medio de disolución Agua a pH=7,0 para el medicamento 3-A por HPLC.

TIEMPO (min)	% DISUELTO	DS	CV
0	0	0	0
5	75,13	5,84	7,78
10	95,23	2,89	3,03
15	97,29	1,18	1,21
20	99,25	0,92	0,93
30	99,49	1,65	1,66
45	100,39	1,64	1,63

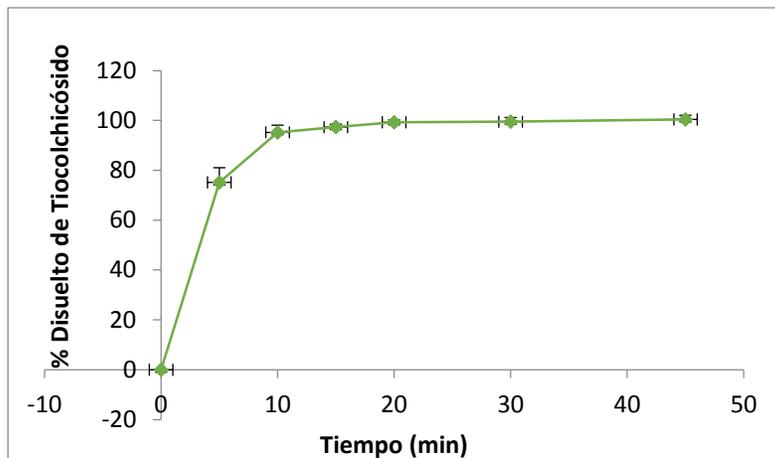


Figura 55. Perfil de disolución para el medicamento 3-A a pH= 7,0.

XIII. PRUEBAS DE COMPARACIÓN PARA MEDICAMENTO 1 Y 3-A POR HPLC

Los análisis desarrollados hasta el momento se han realizado con la finalidad de obtener el medio de disolución adecuado, que permita completar la liberación del principio activo en los tiempos establecidos por la USP para los ensayos de disolución. Por lo cual en el presente trabajo se estudiaron los perfiles de disolución del medicamento 1 y 3-A, de formulaciones que se encuentran en la República Bolivariana de Venezuela, en los diferentes medios de disolución establecidos por la USP.

Para la determinación del mejor medio de los ensayos de disolución para el principio activo Tiocolchicósido se realizaron comparaciones de los perfiles de disolución obtenidos para los distintos medios a pH= 1,2, 4,5, 6,8 y 7,0 de los medicamentos 1 y 3-A , utilizando métodos estadísticos que permiten determinar la similitud (prueba de comparación f_2) y la diferencia porcentual entre las dos curvas en cada punto temporal (prueba de diferencia f_1) de las curvas obtenidas, tomando como referencia el medicamento 1.

Observemos las siguientes comparaciones de los perfiles de disolución obtenidos.

- Prueba de Comparación de Perfiles de Disolución en Medio Buffer Fosfato a pH 6,8.

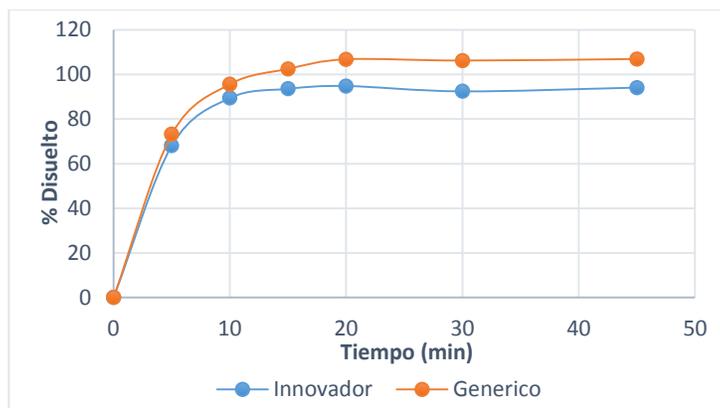


Figura 56. Comparación de los perfiles de disolución de Ticolchicósido del medicamento 1 y 3-A para el medio buffer fosfato a pH=6,8.

Tabla 21. Comparación de perfiles de disolución del medicamento 1 Y 3-A en medio buffer fosfato pH= 6,8.

Comparación de Perfiles a pH 6,8	
Factor de Similitud (f_2)	60,02
Factor de Diferencia (f_1)	7,35

Los valores obtenidos para este medio se encuentran dentro de los rangos establecidos por la FDA. Ya que el valor de f_2 es mayor a 50 y el valor de f_1 se encuentra entre 0 y 15.

- Prueba de comparación de perfiles de disolución en medio buffer acetato a pH 4,5.

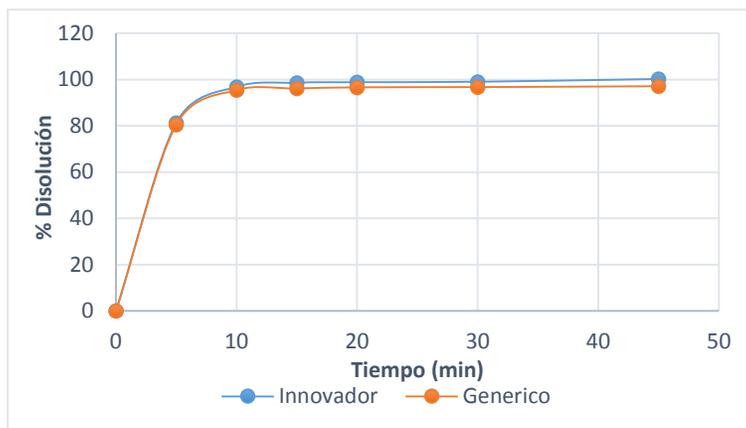


Figura 57. Comparación de los perfiles de disolución de Tiocolchicósido del medicamento 1 y 3-A para el medio buffer acetato a pH=4,5.

Tabla 22. Comparación de perfiles de disolución del medicamento 1 y 3-A en medio buffer acetato pH= 4,5

Comparación de Perfiles a pH 4,5	
Factor de Similitud (f_2)	84,19
Factor de Diferencia (f_1)	2,19

En este medio de disolución la comparación de los perfiles da un valor de factor de similitud (f_2) mayor a 50 y muy cercano a 100; y para el factor de diferencia (f_1) se obtuvo un valor de 2,19 el cual se encuentra entre 0-15, valores estipulados por la FDA, este valor de f_1 es un valor bastante cercano a cero, el cual nos indica que la diferencia entre las curvas es muy pequeña. Con los resultados obtenidos para los

factores de similitud y diferencia se puede decir que las curvas de Ticolchicósido en el medio Buffer Acetato aseguran la igualdad o equivalencia entre las dos curvas.

- Prueba de comparación de perfiles de disolución en medio ácido clorhídrico a pH 1,2.

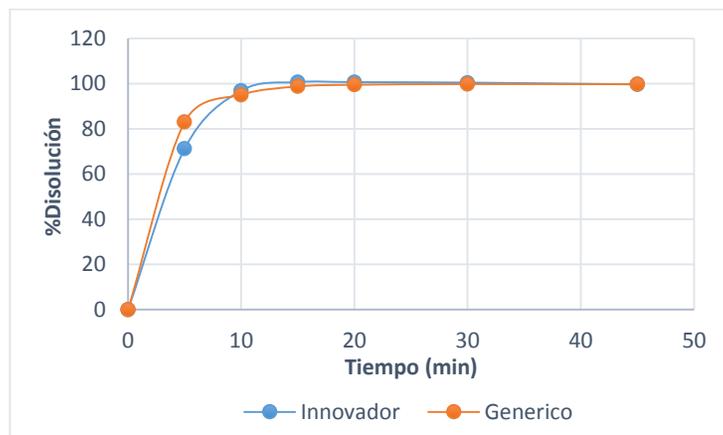


Figura 58. Comparación de los perfiles de disolución de Ticolchicósido del medicamento 1 y 3-A para el medio ácido clorhídrico 0,060 N a pH=1,2.

Tabla 23. Comparación de perfiles de disolución del medicamento 1 y 3-A en medio Ácido Clorhídrico 0,060N a pH= 1,2.

Comparación de Perfiles a pH 1,2	
Factor de Similitud (f_2)	64,75
Factor de Diferencia (f_1)	3,05

El valor de factor de similitud obtenido en este medio de disolución fue de 64,75, valor que se encuentra en el intervalo de 50-100 para f_2 . Para el factor de diferencia en este medio se obtuvo un valor de 3,05 muy cercano a cero. El valor obtenido de f_2 mayor a 50 indica que el medicamento puede ser equivalente.

- Prueba de comparación de perfiles de disolución en Agua a pH 7,0.

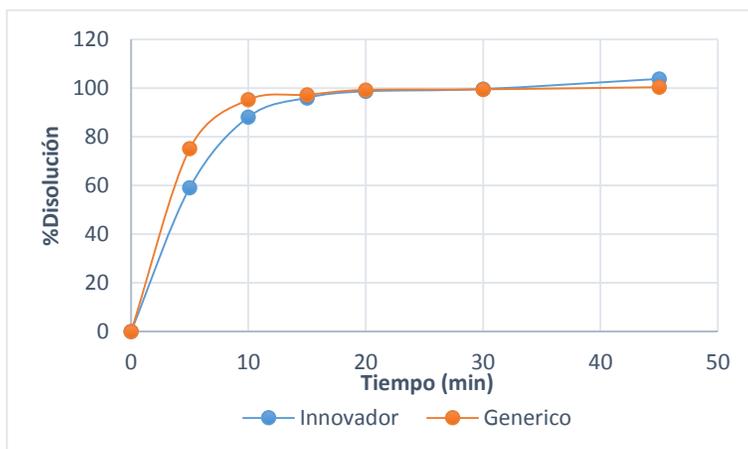


Figura 59. Comparación de los perfiles de disolución de Tiocolchicósido del medicamento 1 y 3-A en Agua a pH 7,0.

Tabla 24. Comparación de perfiles de disolución del medicamento 1 y 3-A a pH= 7,0.

Comparación de Perfiles a pH 7,0	
Factor de Similitud (f_2)	56,96
Factor de Diferencia (f_1)	5,23

En este medio a pH 7,0 el valor de f_1 es un número negativo el cual no cumple con el intervalo estipulado para el factor de diferencia (0-15), el factor de similitud es de 56,96, este valor de f_2 es un número bastante alejado de 100, lo cual disminuye la similitud de las curvas.

Tabla 25. Comparación de los factores de similitud y diferencia para los diferentes medios.

Medios de disolución	pH= 6,8	pH = 4,5	pH= 1,2	pH= 7,0
Factor de Similitud (f_1)	60,02	84,19	64,75	56,96
Factor de Diferencia (f_2)	7,35	2,19	3,05	5,23

Aunque todos los medios estudiados cumplen con el criterio dado por la FDA donde se aseguran similitud o equivalencia entre las dos curvas, cuando los valores de f_1 de hasta 15 (0-15) y los valores de f_2 mayores de 50 (50-100). Se puede notar que los valores obtenidos para el medio buffer acetato a pH 4,5 es el mejor medio para el ensayo de disolución, debido a que su valor de f_2 es más cercano a 100 y su valor de f_1 más cercano a 0.

XIV. ESTUDIO DE CINÉTICA DE DISOLUCIÓN

La determinación del orden cinético no se pudo llevar a cabo debido a que no se obtuvieron puntos de muestras suficientes en los primeros lapsos de tiempo para realizar la estimación de la cinética en los procesos de disolución realizados en los diferentes medios. Para la realización del estudio cinético era necesario obtener un mínimo de cinco tomas de muestras de los perfiles de disolución en un tiempo menor a 10 minutos.

Con los datos que se obtuvieron para cada medio, nos basamos en la ecuación de Noyes-Whitney, para un proceso cinético de orden uno (Ecuación 9) para lograr determinar las constantes de disolución (K_d) de los diferentes perfiles de disolución del medicamento innovador y genérico, agregando un punto extra (0,0) no experimental para lograr generar información del comportamiento del fármaco en los diferentes medios. Obteniéndose las siguientes constantes de disolución;

Tabla 26. Constantes de disolución para Medicamento Innovador y Genérico en diferentes medios de disolución.

Medio de Disolución	K _d Innovador	K _d Genérico
Buffer Fosfato pH 6,8	0,272	0,224
Buffer Acetato pH 4,5	0,34	0,235
HCl pH 1,2	0,355	0,306

Observando las constantes de disolución podemos notar que no existen diferencias significativas entre las constantes de disolución de ambos medicamentos, ya que los valores obtenidos son similares para los medios de disolución. En la siguiente figura (Figura 60) tenemos las representaciones gráficas del estudio cinético para la determinación de las constantes de disolución. Existen pequeñas diferencias entre los puntos a los tiempos de 5 y 10 minutos para cada medio, no significativas ya que cada punto de las tomas de muestra se encuentran uno sobre otro, quedando cada punto del medicamento genérico dentro de los errores del medicamento innovador. Además podemos observar que el comportamiento del principio activo en los medios es similar.

A partir del estudio cinético no se obtuvieron diferencias estadísticas debido a que se realizaron los estudios con pocos puntos de tomas de muestras, lo cual dificultó el estudio cinético, el cual debe realizarse con un mínimo de cuatro puntos de toma de muestras en los primeros minutos de disolución. Los perfiles de disolución de Tiocolchicosido obtenidos para el medicamento innovador y genérico nos permiten observar que existe una velocidad de disolución del fármaco rápida, ya que a los 10 minutos se alcanza un 90% o más del principio activo liberado, por lo cual es recomendable para realizar el estudio cinético obtener un mínimo de cuatro tomas de muestras en un periodo menor a 10 minutos para poder afinar la primera parte de las curvas de los perfiles de disolución lo cual son de interés para los estudios cinéticos de disolución.

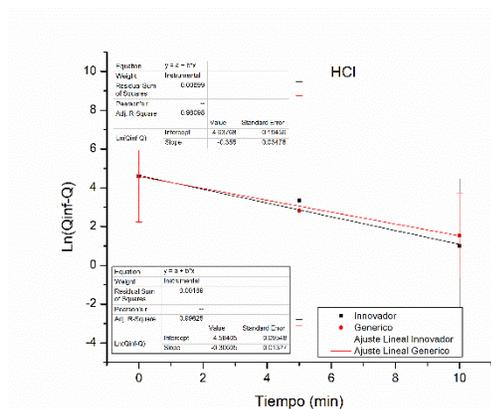
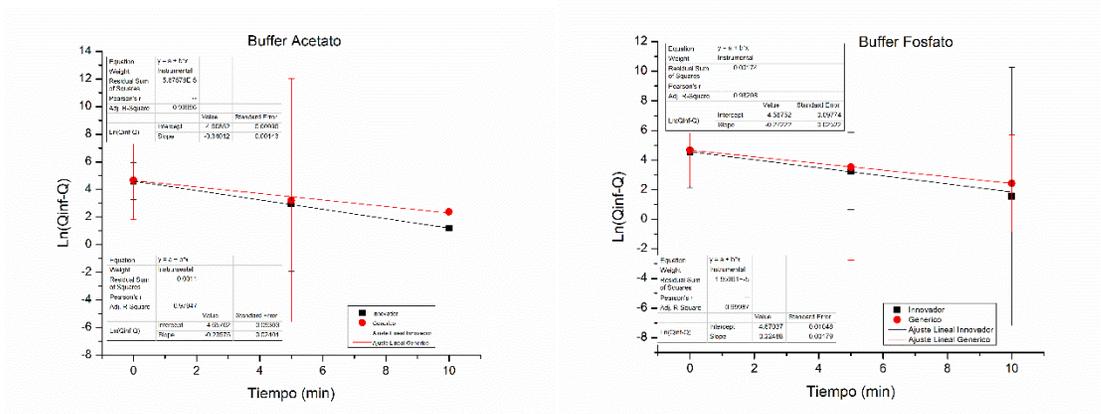


Figura 60. Graficas de cinética de primer orden para Ticolchicósido en distintos medios.

Debido a la poca información que se pudo obtener con respecto al estudio cinético de Ticolchicósido en los distintos medios, por el comportamiento similar del fármaco en cada uno de ellos por el análisis de solo tres puntos, la elección del mejor medio de disolución para la metodología para el ensayo de disolución de Ticolchicósido se realizó a través de la comparación de los perfiles de disolución aplicando los factores de similitud y diferencia dados por el método independiente para comparación de perfiles de la FDA y la USP 38.

XV. PROCEDIMIENTO DE DISOLUCIÓN PARA EL ENSAYO DE DISOLUCIÓN DE TIICOLCHICÓSIDO EN TABLETAS.

La comparación de los perfiles de disolución realizadas para los distintos medios, nos ayudan a evaluar el proceso de liberación del principio activo Tiicolchicósido, permitiéndonos obtener el medio de disolución adecuado para el desarrollo de una metodología de disolución resistente y reproducible para las operaciones diarias y capaz de ser transferido entre laboratorios.

La elección del medio de disolución para el ensayo de disolución de Tiicolchicósido en tabletas se realizó a través de la comparación de los factores de similitud y de diferencia de los perfiles de disolución. Al comparar los medios de disolución encontramos mejores resultados con el Buffer Acetato de pH 4,5, con el cual se obtuvo un valor factor de similitud de 80,58 y un factor de diferencia de 2,18 (Tabla 22).

Además el apartado <1092> nos indica que una prueba diseñada adecuadamente debe dar como resultados datos que posean la menor variabilidad, considerando alta variabilidad si los coeficientes de variación (%CV) para análisis por HPLC es mayor el 2%, al observar las Tablas 14 y 18 de los perfiles de disolución para Tiicolchicósido en buffer acetato a pH 4,5 para los medicamentos innovador y genérico, podemos notar que los valores de CV son menores al 2%. También podemos observar que el porcentaje de disolución que se alcanza a partir de los 30 minutos del tiempo de disolución en este medio es mayor al intervalo de 75% a 80% disuelto.

El apartado <1092> de la USP también nos indica que la duración del procedimiento de los ensayos de disolución para formas farmacéuticas de liberación inmediata es usualmente entre 30 y 60 minutos.

De los resultados obtenidos y de la información extraída de la bibliografía se pueden definir las condiciones para la metodología analítica por ensayo de disolución de Tiocolchicósido en Tabletas.

Tabla 27. Condiciones de la metodología para el ensayo de disolución del Tiocolchicósido en Tabletas

Ensayo de Disolución	
Medio de Disolución	Buffer Acetato pH=4,5
Aparato	Paletas
Volumen de medio	900 mL
Velocidad de agitación	50 rpm
Temperatura	37 °C
Equipo	HPLC

Una vez obtenidas las condiciones experimentales, se procedió a la determinación de los parámetros de calidad para la validación de la metodología analítica propuesta para el ensayo de disolución de Tiocolchicósido en Tabletas.

Para determinar el tiempo de toma de muestra para el ensayo de disolución de Tiocolchicósido, se realizaron tomas de muestras para los tiempos de 20, 30 y 45 minutos.

Las condiciones cromatográficas para el ensayo de disolución de Tiocolchicósido en tableta, se encuentran establecidas en el apartado X.3 "Optimización de las condiciones cromatograficas".

XVI. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA EL ENSAYO DE DISOLUCIÓN DE TIOCOLCHICÓSIDO EN TABLETAS POR HPLC.

Una vez desarrollada la metodología analítica se procedió a realizar la validación, esto se llevó a cabo evaluando los parámetros sugeridos por el apartado <1225>Validación de Procedimientos Analíticos y el apartado <1092> de la USP 38.

XVI.1 Linealidad

Para su determinación se construyeron curvas de calibración, partiendo de un patrón puro de Tiocolchicósido. Las curvas se elaboraron con 6 niveles de concentraciones, siendo 5 concentraciones el rango mínimo de niveles para la elaboración de la curva según lo recomendado por la ICH (Guía Q2 (R1)). Los niveles de concentración utilizados en la curva están comprendidos entre 0,001 y 0,006 mg/mL. Las concentraciones de los patrones se encuentran en la Tabla 28.

Tabla 28. Concentraciones de patrones de Tiocolchicósido utilizados para la curva de calibración.

NIVEL	CONCENTRACIÓN (mg/mL)
25 %	0,001
50 %	0,002
75 %	0,002
100 %	0,004
125 %	0,005
150 %	0,006

El patrón se disolvió en el medio de disolución Buffer Acetato a pH 4,5.

Las soluciones de patrón preparadas fueron analizadas por duplicado. El estudio se basó en la construcción de curvas de calibración, las cuales fueron realizadas en tres días diferentes.

La verificación de la linealidad de los gráficos de calibración para los ensayos de disolución fue evaluada mediante el uso de los métodos de coeficiente de determinación (R^2), el cálculo de regresión por el método de mínimos cuadrados y análisis de residuales del modelo de regresión.

Tabla 29. Curva de Calibración. Linealidad Día 1. Tiocolchicósido

Patrón	Niveles de Concentración (%)	Concentración (mg/mL)	Áreas
1	25%	0,001007	87915
1	25%	0,001007	88844
2	50%	0,002014	176328
2	50%	0,002014	176108
3	75%	0,003021	265905
3	75%	0,003021	266149
4	100%	0,004028	356608
4	100%	0,004028	354321
4	100%	0,004028	355941
4	100%	0,004028	358295
4	100%	0,004028	355721
5	125%	0,005035	444703
5	125%	0,005035	445977
6	150%	0,006042	532648
6	150%	0,006042	536443
Pendiente			88772452,38
Punto de Corte			-1690,827715
Ecuación de la recta			y= 9E+07x - 1690,8
Coefficiente de Determinación (R2)			0,9999

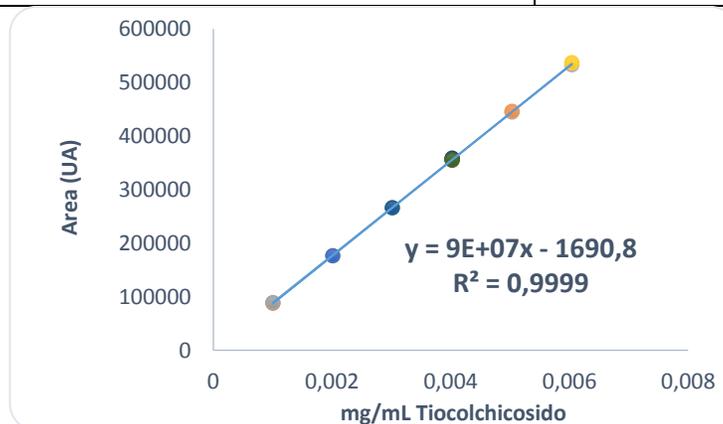
**Figura 61.** Curva de Calibración Día 1. Linealidad, Validación de la metodología.

Tabla 30. Curva de Calibración. Linealidad Día 2. Tiocolchicosido

Patrón	Niveles de Concentración (%)	Concentración (mg/mL)	Áreas
1	25%	0,001007	87428
1	25%	0,001007	87364
2	50%	0,002014	176348
2	50%	0,002014	176940
3	75%	0,003021	259623
3	75%	0,003021	259994
4	100%	0,004028	351905
4	100%	0,004028	352260
4	100%	0,004028	353520
4	100%	0,004028	352104
4	100%	0,004028	353828
5	125%	0,005035	441025
5	125%	0,005035	448813
6	150%	0,006042	527695
6	150%	0,006042	525111
Pendiente			87769439,76
Punto de Corte			-1251,2397
Ecuación de la recta			$y = 9E+07x + 1251,2$
Coefficiente de Determinación (R2)			0,9996

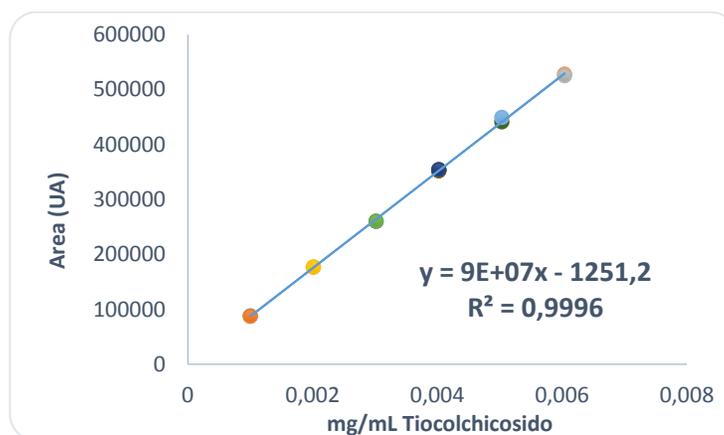
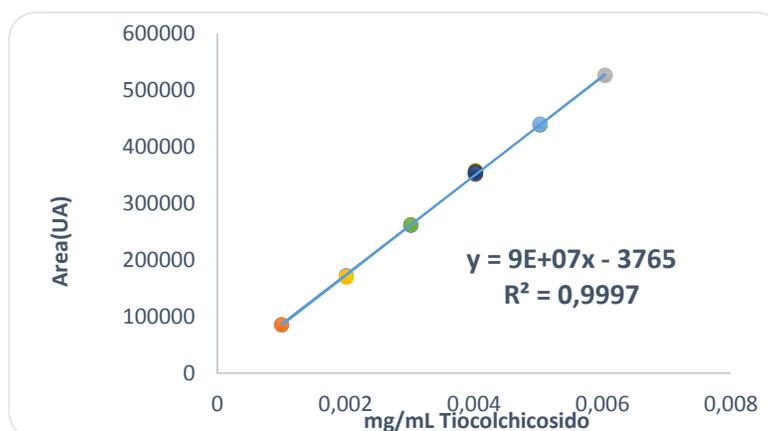
**Figura 62.** Curva de Calibración Día 2. Linealidad, Validación de la metodología.

Tabla 31. Curva de Calibración. Linealidad Día 3. Tiocolchicosido

Patrón	Niveles de Concentración (%)	Concentración (mg/mL)	Áreas
1	25%	0,001007	84969
1	25%	0,001007	85046
2	50%	0,002014	172015
2	50%	0,002014	169254
3	75%	0,003021	261040
3	75%	0,003021	262033
4	100%	0,004028	351297
4	100%	0,004028	351602
4	100%	0,004028	351015
4	100%	0,004028	356719
4	100%	0,004028	354295
5	125%	0,005035	438315
5	125%	0,005035	439508
6	150%	0,006042	525219
6	150%	0,006042	525132
Pendiente			87975536,41
Punto de Corte			-3764,981273
Ecuación de la recta			y = 9E+07x - 2631,5
Coefficiente de Determinación (R2)			0,9997

**Figura 63.** Curva de Calibración Día 3. Linealidad. Validación de la metodología.

Los coeficiente de determinación (R^2), expresan la proporción de variabilidad del conjunto de datos originada por la regresión de la variación total. Idealmente su valor debe acercarse a la unidad. (29) Según los criterios de aceptación para la validación de la linealidad para los ensayos de disolución en el Apartado <1092> de la USP 38, el coeficiente de determinación debe ser mayor o igual 0,98 para demostrar linealidad. Al observar las curvas de calibración concernientes a la evaluación de la linealidad vemos que los valores de coeficientes de determinación son cercanos a uno, dando un comportamiento ideal.

Tabla 32. Linealidad curvas de calibración de Tiocolchicósido.

LINEALIDAD	Ecuación de la Recta	R^2	R	Error Típico	Desviación Estándar		Factor de Respuesta	
					Pendiente	Pto. Corte	f	CV_f
1	$y = 9E+07x - 1690,8$	0,9999	0,9999	147936,8805	24621924	89167,521	8,8E+07	0,53
2	$y = 9E+07x + 1251,2$	0,9996	0,9998	146292,8792	24348304	96010,002	8,7E+07	0,89
3	$y = 9E+07x - 2631,5$	0,9997	0,9998	146626,5898	24403845	96229,011	8,7E+07	1,55

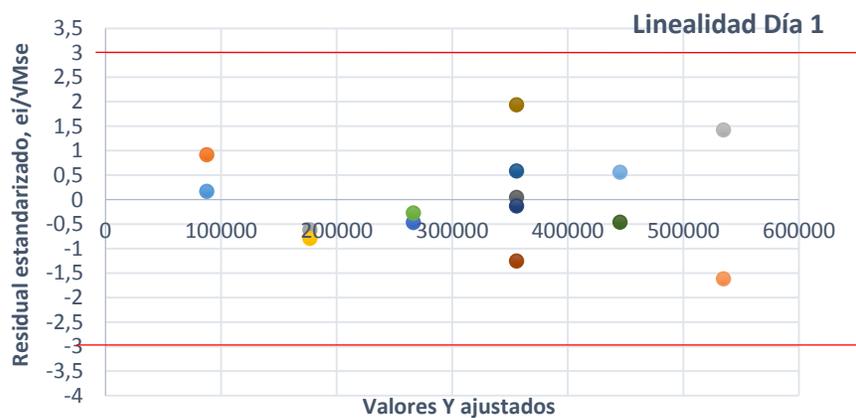
R^2 Coeficiente de Determinación, R, Coeficiente de Correlación. f, Factor de Respuesta. CV_f , Coeficiente de Variación del factor de respuesta.

Otro procedimiento para determinar la linealidad fue el uso del factor de respuesta, el cual expresa la relación entre la lectura o respuesta y la concentración. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes y cercanos al valor de la pendiente. Para el factor de respuestas los coeficientes de variación superiores al 5% son indicativos de una posible falta de linealidad, siendo recomendables valores no superiores al 2%. Observando la tabla anterior podemos notar que los CV_f son menores a estos valores, siendo el comportamiento de las curvas de calibración lineal.

También se realizó el análisis de residuales el cual aporta información acerca de la validez del modelo de regresión por mínimos cuadrados. En el Grafico 1 se muestran las representaciones graficas de los residuos versus los valores de \hat{y} del Tiocolchicósido.

En el análisis de los gráficos residuales estandarizados no se observan patrones (curvas, rombos o triangulo) en el conjunto de los datos estudiados, además ninguno de los residuales supera los límites de -3 y 3. En consecuencia los valores son normales, independientes y la varianza de los errores son constante. El análisis de los gráficos no da información directa acerca de la validez del modelo de regresión, se realizó un análisis de varianza para la regresión y los residuales, la cual permite evaluar la linealidad del modelo de regresión.

Gráficos 1. Análisis de Residuales Estandarizados contra valores ajustados.



Para el análisis de varianza del modelo de regresión, se planteó la siguiente hipótesis:

H₀: No hay regresión cuando la pendiente $\beta_1 = 0$

H₁: Si hay regresión cuando la pendiente $\beta_1 \neq 0$

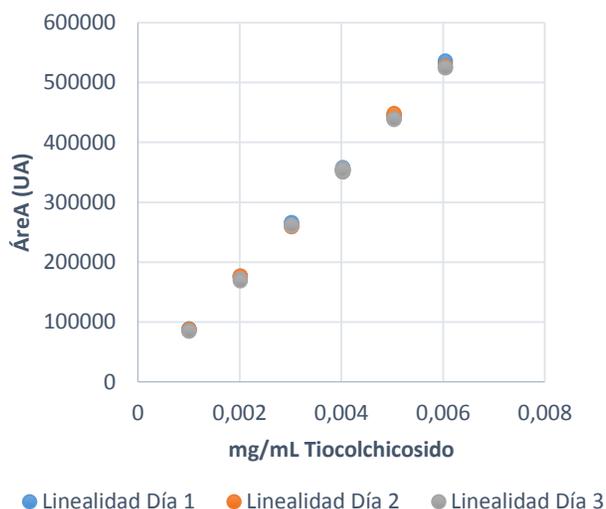
Los Resultados correspondientes a la estadística para rechazar la hipótesis son presentados en la Tabla 33, en función a estos resultados podemos observar que $F_{\text{regresión}} > F$ ($v_1=5$, $v_2=15$, $p= 0,05$) al nivel del 95%. Lo que indica que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa; es decir, que si hay regresión dado que el valor de las pendientes son diferentes de cero.

Tabla 33. Linealidad del modelo de Regresión.

LINEALIDAD	n	Grados de Libertad	F _{Regresión}	F _{Tabulado}	
1	15	n-2	182760,0795	F($\alpha, 1 ; n-2$)	4,6672
2			29075,4060		
3			41496,5198		

Las siguientes graficas permiten observar la linealidad y correlación entre las curvas realizadas en distintos días, resultado que demuestran similitud en la precisión del conjunto de datos.

Gráficos 2. Linealidad del Ticolchicósido. Superposición de curvas de linealidad día 1, 2 y 3.



Para el análisis de las curvas de calibración podemos establecer que las respuestas de las áreas por variación de la concentración del Ticolchicósido presentan alta tendencia a la linealidad en un rango de concentración de 0,001 mg/mL a 0,006 mg/mL.

XVI.2 Precisión

La precisión del método se realizó evaluando la precisión intermedia y la repetibilidad. Se analizaron un número de alícuotas con la finalidad de calcular estadísticamente la desviación estándar y el coeficiente de variación (%CV).

XVI.2.1 Precisión del sistema cromatográfico

La precisión del sistema cromatográfico se estudió evaluando la dispersión de inyecciones consecutivas del patrón de Ticolchicósido al 100% de la

concentración, con la finalidad de evaluar las condiciones cromatográficas del método de análisis establecido. Los resultados se presentan en la tabla 34, en la cual podemos ver la precisión del sistema y del método cromatográfico el cual cumple con el apartado <1092> de la USP 38 ya que el valor del coeficiente de variación es menor al 2%.

Tabla 34. Evaluación de la precisión del sistema y del método de análisis cromatográfico.

Precisión del sistema Cromatográfico			Precisión de método
Replica	Tiempo de Retención	Área	C _{THC} (mg/ 10mL)
1	5,115	351297	0,004036
2	5,117	351602	0,004039
3	5,116	351016	0,004033
4	5,101	356719	0,004098
5	5,101	354296	0,004070
Promedio	5,11	352986	0,004055
Desviación Estándar	0,008	2464,775	2,80E-05
CV	0,16	0,70	0,69

C_{THC} concentración de Ticolchicósido. CV. Coeficiente de Variación.

XVI.2.2 Precisión Intermedia

El estudio de la precisión intermedia se efectuó evaluando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en condiciones operativas diferentes en el mismo

laboratorio. Fue determinada bajo las siguientes condiciones operativas: Mismo analista y diferentes días.

La precisión intermedia del método fue evaluado analizando tres perfiles de disolución, de un lote de estrecha uniformidad de contenido del producto farmacéutico Ticolchicósido, tomando muestras de 6 tabletas en los tiempos de 10, 20 y 30 min, evaluando el porcentaje disuelto de Ticolchicósido liberado analizadas por duplicado.

Tabla 35. Evaluación de la Precisión Intermedia del análisis cromatográfico. Ticolchicósido.

Tiempo (min)	Precisión día 1			Precisión día 2			Precisión día 3		
	% Disuelto THC	Desviación Estándar	%CV	% Disuelto THC	Desviación Estándar	%CV	% Disuelto THC	Desviación Estándar	%CV
10	97,096	4,600	4,734	98,026	3,009	3,070	98,720	2,552	2,585
20	101,217	2,000	1,976	101,565	1,116	1,099	102,416	1,225	1,196
30	101,998	2,037	1,997	102,455	0,999	0,975	103,750	2,198	2,119

%CV coeficiente de variación, DS desviación estándar

Tabla 36. Comparación de la Precisión Intermedia del análisis cromatográfico de los perfiles de disolución de Ticolchicósido.

Tiempos (min)	Precisión Día 1	Precisión Día 2	Precisión Día 3	Promedio	Desviación Estándar	%CV
	% Disuelto de Ticolchicósido					
10	97,10	98,03	98,72	97,95	0,81	0,83
20	101,22	101,57	102,42	101,73	0,62	0,61
30	102,00	102,46	103,75	102,73	0,91	0,88

%CV coeficiente de variación, DS desviación estándar

Los resultados exhiben coeficientes de variación menores al 2% según el apartado <1092> el %CV para análisis realizados por HPLC debe ser menor o igual al 2%. Además podemos observar los porcentajes disueltos de Tiocolchicósido los cuales son mayores al 85%, cumplen con el criterio de aceptación para medicamentos de liberación de inmediata (Tabla 2) dado por la USP 38 y por el apartado <1092> para los 30 minutos, tiempo requerido por la USP la cual cita " Para las formas farmacéuticas de liberación inmediata, la duración del procedimiento es usualmente entre 30 y 60 minutos" permitiendo esta metodología determinar la calidad del medicamento de principio activo Tiocolchicósido. Los valores de concentración obtenidos entre los tiempos no exceden del 5% en diferencias entre los porcentajes disueltos de Tiocolchicósido, cumpliendo con el criterio de aceptación también requerido en el apartado <1092> de la USP 38.

XVI.2.3 Repetibilidad

La repetibilidad se determinó por el mismo analista, realizando tres perfiles de disolución del mismo Lote de Tiocolchicósido en un mismo día. Se analizaron por duplicado una serie de alícuotas tomadas en los tiempos de 10, 20 y 30 min.

Para este estudio se realizó una curva de calibración para el análisis de los tres perfiles, la cual se muestra en la figura siguiente.

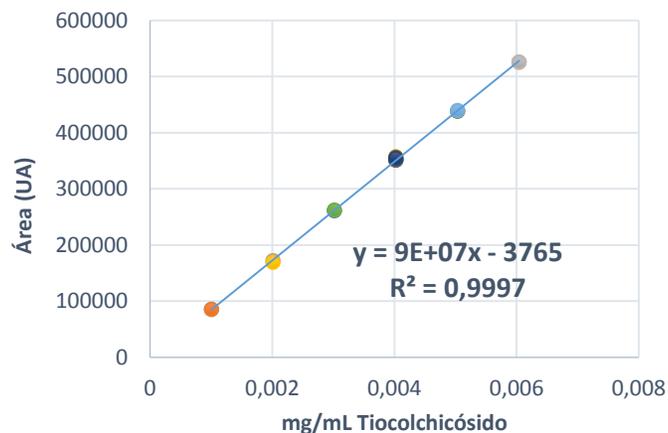


Figura 64. Curva de calibración empleada para la metodología por ensayo de disolución de Tiocolchicósido en la evaluación de la repetibilidad.

La precisión evaluada a través de la repetibilidad del sistema se encuentra dentro de los límites establecidos para métodos cromatográficos, la USP indica que el coeficiente de variación o desviación estándar relativa porcentual del sistema debe ser menor al 2 %, en los porcentajes disueltos de Tiocolchicósido (Tabla 37) para cada tiempo observamos que él CV es menor a 2%, exceptuando a los obtenidos en el tiempo de 10 minutos, valores que no interfieren con el análisis debido a que en este tiempo todavía existe principio activo no liberado. En la Tabla 38 de comparación de la repetibilidad observamos que los CV del promedio del porcentaje disuelto de Tiocolchicósido de los tres perfiles realizados el mismo día son menores al 2%, lo cual cumple con el criterio dado por el apartado <1092> de la USP.

Tabla 37. Evaluación de la repetibilidad del análisis cromatográfico. Tiocolchicósido por perfil de disolución.

tiempo (min)	Perfil 1			Perfil 2			Perfil 3		
	% Disuelto THC	Desviación Estándar	%CV	% Disuelto THC	Desviación Estándar	%CV	% Disuelto THC	Desviación Estándar	%CV
10	98,567	1,769	1,794	97,108	2,355	2,425	97,368	2,702	2,775
20	102,159	0,380	0,372	100,403	1,410	1,404	100,746	1,304	1,295
30	104,185	1,892	1,816	100,974	1,133	1,122	101,080	1,162	1,150

Tabla 38. Comparación de la repetibilidad del análisis cromatográfico de los perfiles de disolución de Tiocolchicósido.

Tiempos (min)	Perfil 1	Perfil 2	Perfil 3	Promedio	Desviación Estándar	%CV
	% Disuelto de Tiocolchicósido					
10	98,57	97,11	97,37	97,68	0,78	0,80
20	102,16	100,40	100,75	101,10	0,93	0,92
30	104,18	101,14	101,08	102,13	1,78	1,74

%CV coeficiente de variación

El método desarrollado muestra con el análisis de los tres perfiles que la metodología por ensayo de disolución para Tiocolchicósido es reproducible, además muestra que los porcentajes disuelto de Tiocolchicósido cumplen con el criterio de aceptación para medicamentos de liberación inmediata (Tabla 2) liberando más del 85% de principio activo a los 30 minutos tiempo requerido para el ensayo de disolución para una toma de muestra única.

XVI.2.4 Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado o de referencia (valor verdadero) y el valor experimental encontrado, se expresa como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito añadida sobre la muestra o como la diferencia entre la medida obtenida y el valor aceptado como verdadero.

Este debe demostrarse en todo el rango especificado para el método analítico. Para el estudio de la exactitud en esta metodología se realizaron determinaciones sobre 3 niveles de concentración del analito, los cuales cubren un rango de $Q \pm 20\%$ para un producto de liberación inmediata.

Se realizaron soluciones a tres niveles de concentración, como sugiere la literatura, estos valores fueron 50, 75 y 100%, tomando un valor del porcentaje del contenido declarado (Q) de 75%, valor que se encuentra en el intervalo dado por la USP 38 en el aparato <1092> como el criterio de aceptación característico para la cantidad disuelta de ingrediente activo, expresada como porcentaje, el cual se encuentra entre 75% a 80%.

Para la preparación de los tres niveles de concentración requeridos se realizaron ensayos de disolución por triplicado de cuatro tabletas de un mismo lote, con la metodología planteada para el análisis de THC. Añadiendo simultáneamente a tres tabletas, alícuotas de 5,0; 6,0; y 8,0 mL de soluciones patrones de Tiocolchicósido de una concentración al 125, 130 y 140 % respecto a la cantidad de Tiocolchicósido declarada, llevándose a un volumen final de 900 mL. Con la finalidad de alcanzar concentraciones finales en el vaso disolutor de 50, 78 y 98% de THC. Dejando una

cuarta tableta no enriquecida con patrón en un volumen de 900 mL de medio de disolución.

Tabla 39. Recuperación del porcentaje disuelto de Ticolchicósido. Evaluación de la exactitud del método.

Nivel de Enriquecimiento	Ensayos Disolución	% Recuperación	Recuperación Promedio (%)
50%	1	102,81	103,66
		100,62	
	2	101,53	
		105,19	
	3	106,71	
		105,13	
75%	1	98,87	99,34
		102,49	
	2	97,77	
		101,77	
	3	96,59	
		98,57	
100%	1	101,60	100,84
		100,87	
	2	101,59	
		102,86	
	3	97,90	
		100,21	

Al terminar el ensayo de disolución en un tiempo de 30 minutos, se analizaron las muestras enriquecidas y no enriquecidas. Posteriormente se determinó el porcentaje promedio de recuperación a cada nivel de concentración obteniendo como resultados porcentajes de recuperación que se encuentran dentro de los

límites dados por la USP 38 en el apartado <1092> los cuales se encuentran entre 95 % y 105% de la cantidad agregada (Tabla 39).

XVI.2.5 Especificidad

En este trabajo la especificidad se evaluó mediante el estudio de las diferencias de los ángulos de pureza del patrón de referencia y las muestras utilizadas para esta metodología, bajo las mismas condiciones y medios de disolución utilizados.

Patrón:

Se pesaron de 10 mg de Patrón de THC y fue llevado a un matraz aforado de 50,0 mL con medio Buffer Acetato de pH 4,5. De esta solución patrón se tomó una alícuota de 5,0 mL, la cual luego fue llevada a un matraz de 100 mL con la finalidad de obtener una concentración de THC de 0,01 mg/mL.

De la concentración de 0,01 mg/mL se tomó una alícuota de 4,0 mL y de llevo a un matraz aforado de 10 mL para obtener una concentración del 100% de THC sobre el valor declarado del medicamento. El patrón al 100% fue inyectado en el cromatógrafo obteniéndose el siguiente cromatograma.

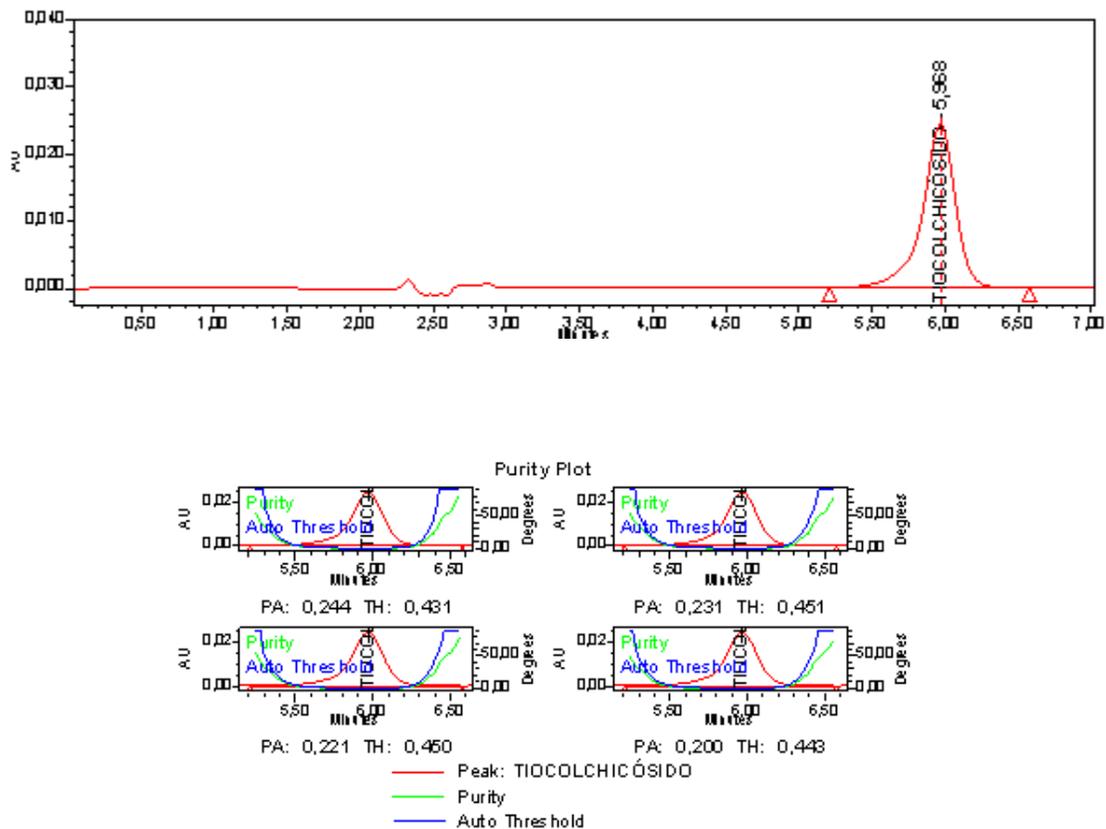


Figura 65. Cromatograma y gráfico de pureza del pico de Tiocolchicosido. Patrón de THC. Evaluación de la Especificidad

En el cromatograma observamos que el tiempo de retención obtenido es de 5,968 minutos, y el valor obtenido de PA: 0,244 es menor al valor de TH: 0,431; lo cual indica que no hay interferencia en el método desarrollado para la determinación de Tiocolchicosido.

Muestra:

En la figura 67 observamos para la muestra del medicamento Innovador, que el tiempo de retención obtenido fue de 5,874 minutos y el valor de PA: 0,289 el cual

es menor al valor de TH: 0,392; lo cual indica que al igual que el patrón no hay interferencia en el método.

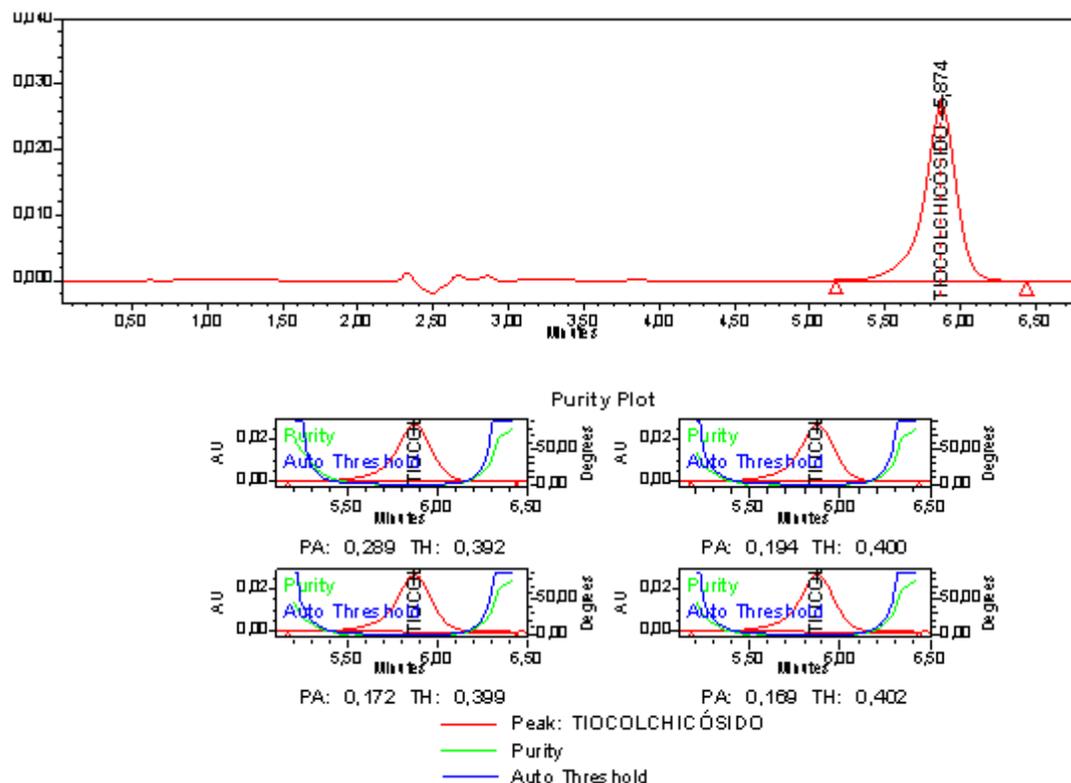


Figura 66. Cromatograma y gráfico de pureza del pico Tiocolchicosido. Muestra Medicamento Innovador. Evaluación de la Especificidad.

Para el medicamento genérico podemos observar que su cromatograma nos indica un tiempo de retención 5,265 minutos y un valor de PA: 0,246 el cual también es menor al valor de TH: 0,363, indicando que al igual que al patrón no hay interferencia en el método.

Al observar los picos cromatográficos del patrón y las muestras notamos que los tiempos de retención son similares, además que presentan valores de TH mayores

a los valores de PA, lo cual indica que en las muestras y patrón no interfiere en el método realizado para el desarrollo del ensayo de disolución para el Tiocolchicósido.

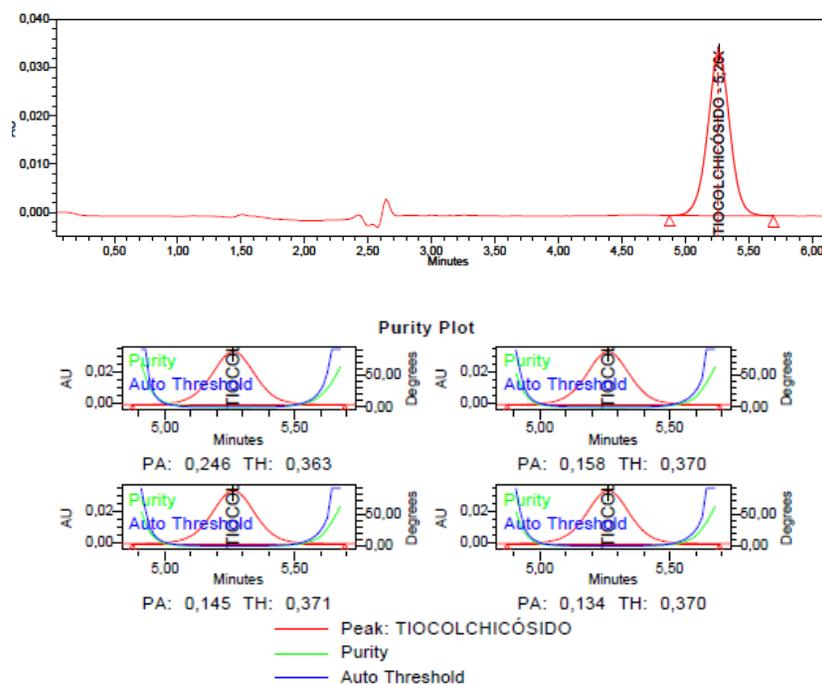


Figura 67. Cromatograma y gráfico de pureza del pico Tiocolchicósido. Muestra medicamento generico. Evaluación de la Especificidad.

XVII. ANÁLISIS DE UNA MUESTRA DE TI COLCHICÓSIDO 24 HORAS DESPUES DE REALIZAR EL ENSAYO DE DISOLUCIÓN DE TI COLCHICÓSIDO EN TABLETAS.

Este análisis tuvo como finalidad conocer si la metodología desarrollada para el ensayo de disolución del Tiocolchicósido, permite analizar una muestra luego de tener 24 horas de haber pasado por el tratamiento del aparato de disolución.

Para su desarrollo se establecieron las condiciones de la Tabla 27 para el análisis del ensayo de disolución del medicamento. La muestra utilizada fue un medicamento de Ticolchicósido, al cual se le realizó un perfil de disolución un primer día y las mismas muestras tomadas se dejaron en el laboratorio por 24 horas sin presencia de luz. Las muestras luego de las 24 horas fueron inyectadas en el HPLC obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 40. Porcentaje disuelto de Ticolchicósido obtenido para la muestra en el primer día y la muestra analizada a las 24 horas por metodología del ensayo de disolución para Ticolchicósido.

Tiempo (min)	MUESTRA PRIMER DÍA			MUESTRA A LAS 24 HORAS		
	% Disuelto THC	DS	CV	% Disuelto THC	DS	CV
10	98,57	1,77	1,79	101,89	4,38	4,30
20	102,16	0,38	0,37	103,45	3,17	3,07
30	104,18	1,89	1,82	104,73	1,79	1,71

DS desviación estándar; CV coeficiente de variación

Los %disuelto de THC en ambas muestras nos indica que se ha liberado más del 85% del principio activo a partir de los 10 minutos activos cumpliendo con los criterios de aceptación para los productos farmacéuticos de liberación inmediata. Los CV en cada muestra son menores al 10% para cada tiempo. Tomando estas dos consideraciones, se realizó la comparación de los perfiles obtenidos.

Observando los perfiles de disolución de ambas muestras podemos ver la alta similitud de las curvas, lo cual es corroborado con el factor f_2 (factor de similitud) el cual es de 81,83 valor bastante cercano a 100.

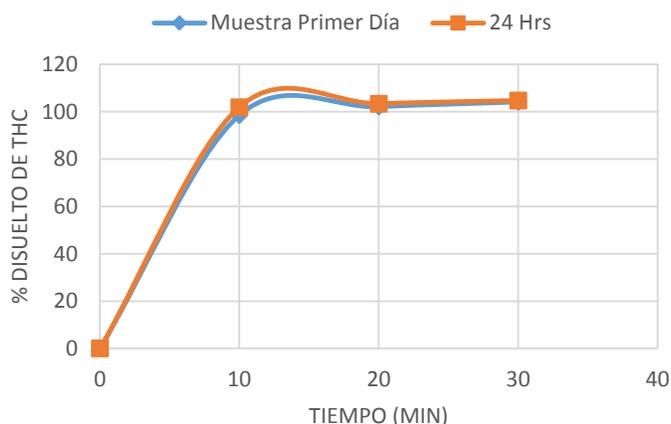


Figura 68. Comparación Perfiles de Disolución para la estabilidad. Muestra en el primer día y muestra analizada a las 24 horas.

Debido que el análisis se desarrolló en días distintos, se realizó para cada análisis una curva de calibración para cada estudio de las muestras.

Esta prueba nos muestra que la metodología es capaz de determinar los porcentajes disueltos de tiocolchicósido, hasta 24 horas después de haber realizado el ensayo de disolución, obteniéndose resultados similares o equivalentes a si se realizara la determinación del %disuelto justo después de la disolución.

XVIII. EVALUACIÓN DE MUESTRA VENCIDA DE TIICOLCHICÓSIDO POR METODOLOGÍA DESARROLLADA DEL ENSAYO DE DISOLUCIÓN DE TIICOLCHICOSIDO.

Una vez realizada la validación de la metodología para el ensayo de disolución se procedió a analizar una muestra vencida del Tiicolchicósido,

Para este análisis se utilizó una muestra del medicamento 1 con 6 meses de vencimiento y se comparó con el análisis del ensayo de disolución del mismo medicamento vigente. Ambas muestras fueron analizadas bajo las mismas condiciones del ensayo de disolución y cromatográficas.

Los comportamientos de las muestras en el ensayo de disolución fueron similares. Se puede observar que para la muestra vencida el proceso de liberación es más lento al inicio de la disolución, sin embargo la muestra libera más del 85% del principio activo a partir de los 10 minutos cuando se encontraba vigente, y a partir de los 20 minutos al estar vencida. Los CV en ambos casos son menores del 10%, por lo cual se pudo realizar la comparación de ambos perfiles.

Tabla 42. Análisis del porcentaje disuelto de Ticolchicósido obtenido para la muestra vencida y vigente por metodología del ensayo de disolución.

Tiempo (min)	MUESTRA VIGENTE			MUESTRA VENCIDA		
	% Disuelto THC	DS	CV	% Disuelto THC	DS	CV
10	96,82	1,35	1,39	85,16	4,18	4,91
20	98,81	1,30	1,32	95,30	4,52	4,75
30	98,99	1,33	1,34	98,26	4,34	4,42
40	100,20	1,33	1,33	99,51	4,37	4,39

DS desviación estándar; CV coeficiente de variación.

Para cada análisis de las muestra se realizó una curva de calibración el mismo día.

Comparando los perfiles de disolución de ambas muestras, se obtuvo un valor de f_2 de 60,41. Por lo general valores de f_2 mayores de 50, aseguran la equivalencia de las dos curvas, teniendo mayor similitud aquellas curvas cuyos valores están cercanos a 100. Esto nos indica que nuestra muestra vencida, a pesar de obtener

un valor bajo de similitud, se encuentra en un valor donde muestra equivalencia en el perfil de disolución con la muestra vigente. Este análisis realizado nos permite observar que el medicamento cumple con un comportamiento similar en la liberación del principio activo y también nos permite ver la diferencia entre los porcentajes disueltos de ambos medicamentos, permitiéndonos observar el proceso de liberación del fármaco. Los perfiles de disolución los podemos observar en la Figura 69.

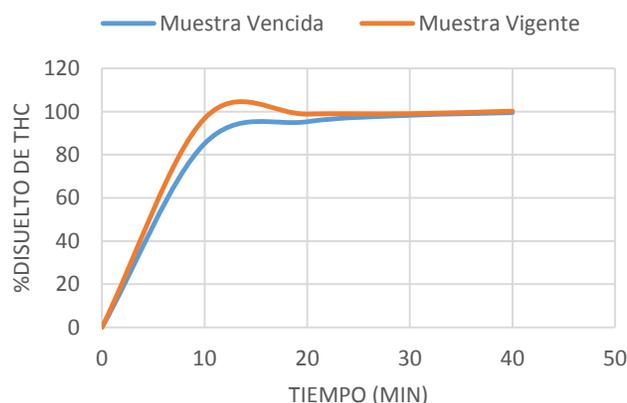


Figura 69. Comparación Perfiles de Disolución de una muestra vencida y una muestra vigente.

El método desarrollado nos permite observar si la liberación del principio activo después de los 30 minutos cumple con el criterio de aceptación para productos de liberación inmediata dados por la USP 38, el cual nos indica que si Q es mayor o igual al 85% (siendo Q igual a 80%) se cumple con el criterio de aceptación de la etapa S1 (Tabla 2). Observando el % disuelto de Ticolchicósido (Q) de la muestra vigente y vencida para un tiempo mayor o igual a 30 minutos, podemos notar que los valores de porcentaje liberado son mayores al 85%, lo cual nos indica que el medicamento en este caso en particular, cumple con el criterio de aceptación exigido por la USP 38.

Esta prueba nos muestra que la metodología por ensayo de disolución de tiocolchicósido propuesta, es capaz de determinar la calidad y el desempeño del medicamento durante su periodo de validez y en etapas posteriores.

XIX. ESTUDIO DE DISTINTAS MARCAS COMERCIALES POR LA METODOLOGÍA ENSAYO DE DISOLUCIÓN DE TIOCOLCHICÓSIDO EN TABLETAS

Luego del desarrollo de la metodología, su validación y los distintos estudios realizados, se procedió a analizar distintas marcas comerciales de Tiocolchicósido en tabletas por la metodología desarrollada para el ensayo de disolución del principio activo Tiocolchicósido. El análisis de contenido de THC para cada muestra comercial se realizó previamente obteniéndose los resultados de la Tabla 7.

Los medicamentos se analizaron bajo las mismas condiciones, la metodología empleada se describe en la Tabla 27. Para este estudio se realizaron curvas de calibración con concentraciones de 25 a 150% de Tiocolchicósido para determinar la cantidad de principio activo disuelto para cada medicamento. Se realizaron toma de muestras en los tiempos 10, 20, 30 y 40 minutos, con la finalidad de también poder observar el proceso de liberación del fármaco a través del perfil de disolución de la muestra.

A continuación se observan los cromatogramas y pureza de las muestras comerciales analizadas y los resultados del porcentaje de disolución del principio activo.

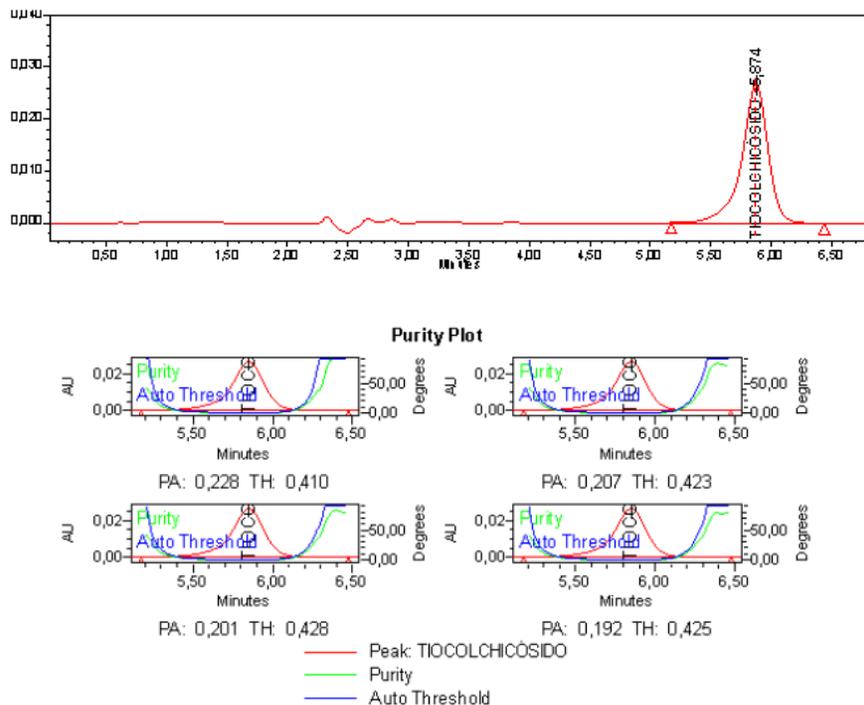


Figura 70. Cromatograma y gráficos de pureza de muestra. Muestra medicamento

1.

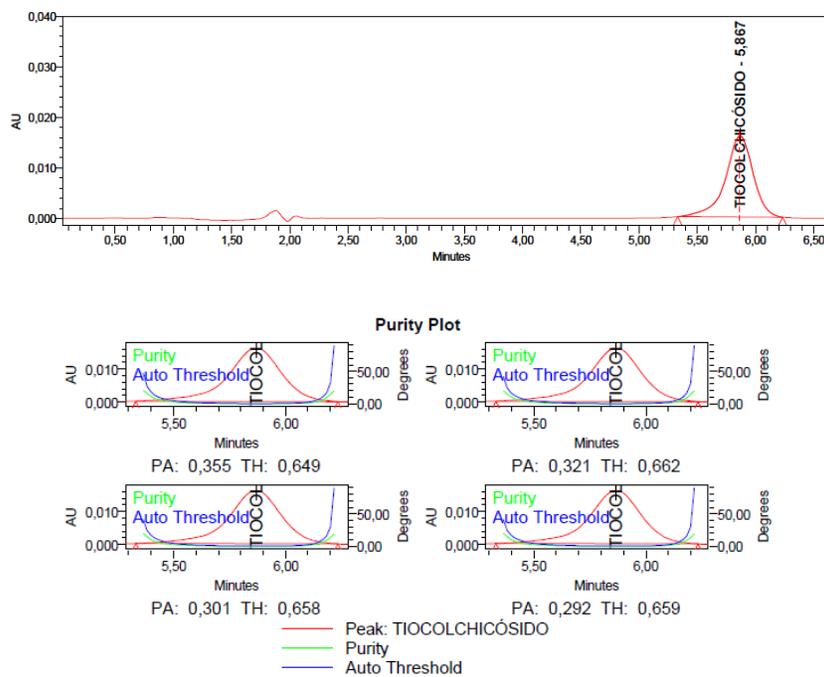


Figura 71. Cromatograma y gráficos de pureza de muestra. Muestra medicamento

2.

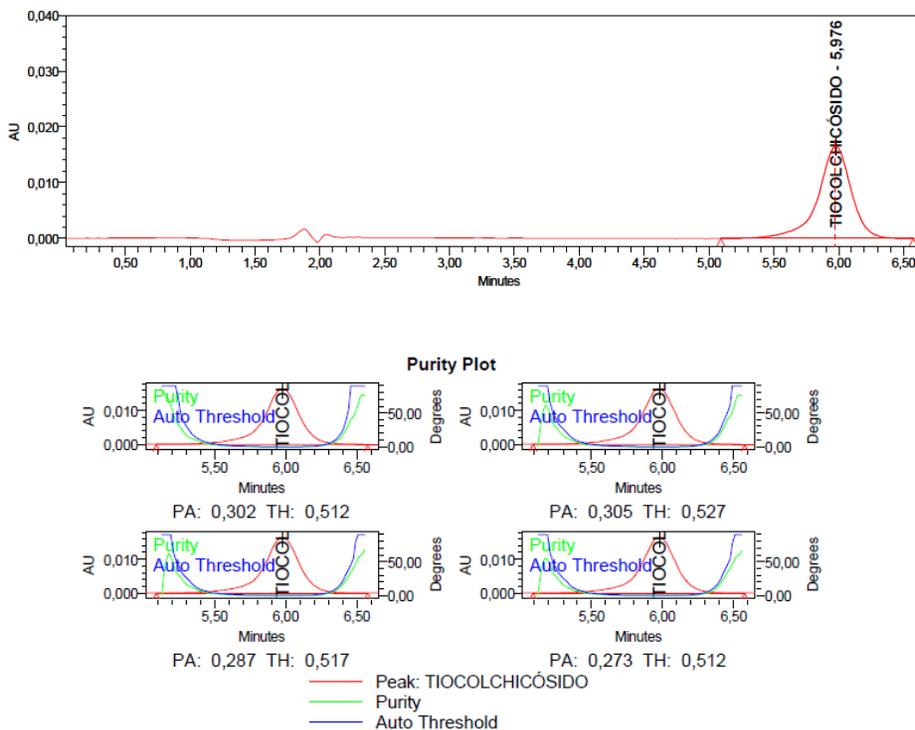


Figura 72. Cromatograma y gráficos de pureza de muestra. Muestra medicamento 3-A.

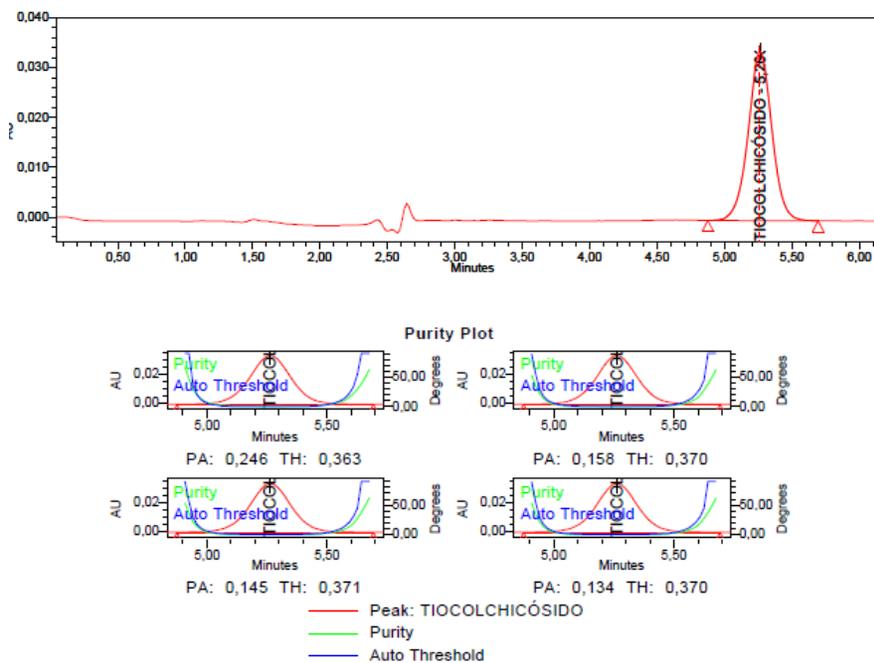


Figura 73. Cromatograma y gráficos de pureza de muestra. Muestra medicamento 4.

Para cada una de las muestras se observa en el cromatograma un solo pico correspondiente a Tiocolchicósido, también se pudo observar con los gráficos de pureza que la señal detectada es del principio activo de interés, ya que los valores de PA son menores al valor de TH en los gráficos de pureza de cada medicamento.

El análisis por ensayo de disolución de Tiocolchicósido presente en tres muestras de diferentes marcas comerciales presento comportamientos diferentes en el aparato disolutor en la desintegración de las tabletas, observándose una similitud de disolución en los medicamento 1, 2 y 3-A pero una disolución diferente en el medicamento 4 en el cual a los 40 minutos todavía se observaban gránulos de tabletas en el fondo de los vasos del aparato disolutor.

Tabla 41. Porcentajes disuelto de Tiocolchicósido para los perfiles de disolución de las distintas marcas comerciales.

Tiempos (min)	Medicamentos			
	% Disuelto de Tiocolchicósido			
	1	2	3-A	4
0	0	0	0	0
10	96,82	83,98	95,35	35,80
20	98,81	88,92	96,55	60,66
30	98,99	90,76	96,66	80,93
40	100,20	92,27	97,02	91,82

Los porcentajes de Tiocolchicósido disuelto de los medicamentos analizados liberan más del 85% del principio activo a los 10 minutos, exceptuando el medicamento número 2 que libera más del 85% en un tiempo de 20 minutos y el medicamento 4 el cual consigue liberar más del 85% a un tiempo mayor de los 30 minutos.

Tabla 42. Coeficientes de variación de cada muestra obtenidos de los perfiles de disolución.

Medicamentos				
Tiempos (min)	CV			
	1	2	3-A	4
10	1,39	6,06	7,27	12,05
20	1,31	3,09	3,48	11,69
30	1,34	2,51	2,67	11,71
40	1,33	1,81	2,65	8,71

DS desviación estándar; %CV Coeficiente de Varianza

Al observar los coeficientes de variación podemos notar que el medicamento 1, 2 y 3-A, cumplen con las consideraciones de la FDA para la comparación de perfiles, ya que liberan más del 85% de THC y poseen CV menores al 20% en tiempos menores (10 minutos) y menores al 10% para tiempos mayores, permitiendo así tomar los perfiles obtenidos para realizar comparaciones con respecto al medicamento 1. Para el medicamento 4 los CV son para tiempos mayores a 10 minutos mayores al 10%, no cumpliendo con la FDA, sin embargo se realizó la comparación de su perfil.

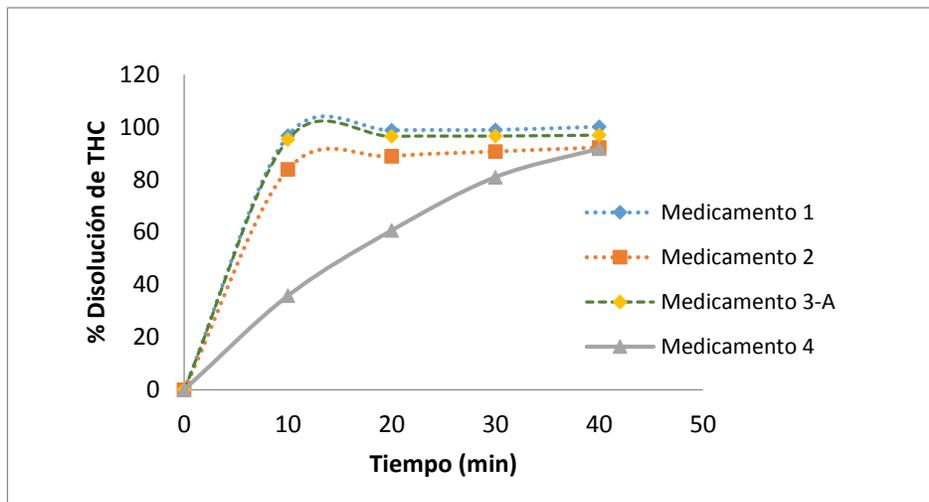


Figura 74. Perfiles de Disolución de Ticolchicosidio para las distintas marcas comerciales.

A cada medicamento analizado se le determinó para la curva de disolución el factor de similitud y diferencia con respecto al medicamento 1, para asegurar la equivalencia de los productos, obteniéndose los siguientes valores:

Tabla 43. Factor de similitud (f_2) y factor de diferencia (f_1). Comparación entre las curvas de Ticolchicosidio del medicamento 1 y los medicamentos de las distintas marcas comerciales. (2, 3-A y 4)

Factor	Medicamento 2	Medicamento 3-A	Medicamento 4
f_2	50,07	79,33	21,38
f_1	9,80	2,34	31,81

Las curvas aseguran la igualdad o equivalencia de los productos cuando los valores de f_2 están cercanos a 100 y los valores de f_1 estén cercanos a 0.

Por lo general valores de f_2 mayores de 50 y valores de f_1 cercanos a cero (0), aseguran la equivalencia de las dos curvas.

Comparando los valores de f_2 obtenidos (Tabla 43) podemos observar que existe una mayor igualdad en las curvas entre el medicamento 1 y el medicamento 3-A, la cual posee un valor de f_2 de 79,33 siendo este valor mayor a 50 y cercano a 100 aumentando la similitud de las curvas. El medicamento 2 cumple con un f_2 igual a 50 asegurando en este factor la posible equivalencia entre las dos curvas, aunque su similitud comparada con el medicamento 3 es menor. El medicamento 4 posee una curva no equivalente al medicamento 1, observando las curvas podemos notar que la liberación del fármaco es distinta, el f_2 entre estas dos curvas es de 21,38 no cumpliendo con los criterios dados por la FDA.

Los gráficos de perfiles de disolución de Tiocolchicósido para las distintas marcas comerciales muestran, de manera visual, la similitud existente entre las curvas. Siendo la curva para el medicamento 3-A la de mayor equivalencia, lo que corrobora los valores obtenidos del factor de similitud (f_2) 79,33 y del factor de diferencia (f_1) 2,34; donde el valor de f_2 es mayor a 50 y cercano a 100 y el valor de f_1 es menor a 15 y cercano a cero (0), asegurando la igualdad o equivalencia entre las curvas.

Este tipo de comportamientos, donde se cumple la equivalencia con los medicamentos innovadores (medicamento 1), es el que se espera tener de los productos genéricos. Caso que no se cumple con el medicamento 4, el cual el factor f_1 (31,81) supera el valor de 15 y su valor f_2 (21,38) es mucho menor a 50. Estos valores nos indican que el producto no es equivalente con el medicamento innovador. Para esta muestra (medicamento 4) es necesario evaluarlo bajo otras etapas de los criterios de aceptación para formulas farmacéuticas sólidas de liberación inmediatas, indicadas en la USP. Ç

Las formulaciones de productos genéricos deben asegurar igualdad o equivalencia en la liberación de los principios activos con el medicamento innovador, de esto no ser así, no se cumple con la calidad necesaria del producto genérico para su consumo, distribución y comercialización. Esta es una de las razones de la importancia del estudio de disolución, ya que nos permite evaluar la calidad de los productos genéricos distribuidos de las distintas marcas comerciales, como también permite asegurar a los laboratorios farmacéuticos que sus formulaciones terminadas o en procesos de producción cumplen con los criterios dados por los entes regulatorios y con la calidad, igual o equivalencia del medicamento innovador, propiedades necesarias que aseguran la eficacia del fármaco.

Con esta metodología desarrollada (Tabla 27) se puede observar y comparar la calidad de los medicamentos de Tiocolchicósido de distintas marcas comerciales, siendo esta metodología capaz de determinar la cantidad disuelta de ingrediente activo, expresada como un porcentaje de disolución, término que se requiere para la evaluación del criterio de aceptación dado por la USP 38 en el apartado <1092>, en el cual se indica que para una cantidad disuelta de ingrediente activo del contenido declarado (Q) entre 75-80 %, no se debe obtener una liberación menor al 85% del principio activo. Lo cual también cumple con la Tabla 2 de los criterios de aceptación para los medicamentos de liberación inmediata para un Q de 80%.

También utilizando esta metodología para el ensayo de disolución del Tiocolchicósido en tabletas, se pueden realizar estudios del comportamiento de liberación del fármaco en productos genéricos existentes, en desarrollo o de futuras producciones, realizando con este método perfiles de disolución del principio activo para así poder comparar el comportamiento de la tabletas al momento de la liberación del fármaco con el producto innovador, y así garantizar la calidad de los mismos.

XX. CONCLUSIONES

- Se desarrolló una metodología para el ensayo de disolución de Tiocolchicósido en tabletas utilizando la técnica analítica HPLC. Estableciéndose las siguientes condiciones de disolución: equipo disolutor con aparato II (Paletas) a una temperatura de $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, con un volumen de llenado de medio de 900 mL de disolución Buffer Acetato a pH 4,5 para un análisis de disolución de 30 minutos con una toma de muestra de punto único.
- El análisis por Espectrofotometría UV-Visible presenta resultados erróneos para la detección del Tiocolchicósido disuelto por la metodología del ensayo de disolución, ya que por UV-Visible no es posible de separar ni discriminar el principio activo de interés.
- Se seleccionó como medio para la metodología del ensayo de disolución de Tiocolchicósido el medio Buffer Acetato a pH 4,5, el cual posee un f_2 de 80,58 y un f_1 de 2,18 que indica igualdad o equivalencia entre las curvas de los perfiles de disolución del medicamento innovador con el producto genérico.
- No se realizó la determinación del orden cinético para los medios de disolución debido a la falta de datos necesarios para el estudio cinético.
- El comportamiento del principio activo Tiocolchicósido basado en las constantes cinéticas son similares en cada medio de disolución.

- La metodología validada para el ensayo de disolución de Tiocolchicósido en Tabletas presenta un comportamiento lineal en el rango de concentraciones de 0,001 a 0,006 mg/mL y un coeficiente de determinación de 0,999.
- El método validado para el ensayo de disolución por HPLC es preciso, al presentar una dispersión de datos menores al 2% el cual cumple con el apartado <1092> de la USP 38, garantizando la habilidad del método para generar resultados reproducibles.
- La exactitud medida como porcentaje de recuperación para el principio activo Tiocolchicósido se encontró entre 99,34% y 103,66% para niveles de concentración enriquecidas entre 50% y 100%, resultados que se encuentran dentro del límite de aceptación comprendido entre 95% y 105% según el apartado <1092> de la USP.
- El método desarrollado por HPLC demostró ser específico para Tiocolchicósido siendo selectivo al permitir reconocer sin equivocación la presencia de Tiocolchicósido.
- La metodología desarrollada para el ensayo de disolución de Tiocolchicósido en tabletas es específico, preciso, reproducible, exacto y lineal en el rango de concentraciones establecidas.
- El medicamento 4 analizado por la metodología desarrollada, no cumplió con los criterios de la USP y FDA de liberación inmediata, siendo no equivalente con el medicamento 1 (innovador), obteniéndose un factor f_1 de 31,81 (f_1 mayor 15) y un valor de f_2 de 21,38, valores que se encuentran fuera del intervalo establecido por la FDA.
- La metodología nos permite determinar si un medicamento cumple con los criterios de aceptación para formas farmacéuticas de liberación inmediata.

- La aplicación de la metodología para el ensayo de disolución de Tiocolchicósido en tabletas cumple de manera satisfactoria con los criterios del apartado <1092> de la USP, proporcionando la confianza de que el medicamento cumple con la calidad necesaria para su comercialización y administración a los pacientes.
- La metodología puede ser aplicada como un método rutinario para pruebas de control de calidad.

XXI. RECOMENDACIONES

- Realizar los estudios de orden cinético para los distintos medios con un mínimo de tres puntos, es decir tres tomas de muestras, tomadas en tiempos menores de 10 minutos.

XXII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1]. Manual de Buenas Prácticas de Manufactura para la Fabricación de Productos Farmacéuticos (BPM) de la Organización Mundial de la Salud (OMS). República Bolivariana de Venezuela, Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Agosto 2004.
- [2]. Aguilar-Díaz, Johnny Edward. (2014) ASPECTOS GENERALES DEL ENSAYO DE DISOLUCIÓN USP I Y USP II PARA FORMAS FARMACÉUTICAS SÓLIDAS. Novartis Pharmaceutical Spain.
- [3]. Medicamentos seguros eficaces y de calidad. [Internet]. Consultado en noviembre del 2016: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2958s/6.4.html>
- [4]. Camero, Lirio. (2004). Formulación magistral en la práctica profesional. Pág. 19. Vol. 1.
- [5]. Universidad autónoma de Madrid. (2008). Formas Farmacéuticas y vías de administración de fármacos. [Internet]. Consultado en marzo del 2017.
- [6]. Farmacopea de los Estados Unidos de América. (2015). Apartado 1090 Evaluación de Desempeño. USP 38. pág. 1175. Vol. 1.
- [7]. Disoluciones: Leyes y Comportamientos. [Internet]. Consultado en noviembre del 2015 en: <http://www.encyclonet.com/articulo/disoluciones-leyes-y-comportamiento/>.
- [8]. Instituto Nacional de Higiene Rafael Rengel. (2006) Norma venezolana de biodisponibilidad y bioequivalencia de productos farmacéuticos.
- [9]. Berrozpe, J.D. Prácticas de Biofarmacia y Farmacocinética. Editorial: Universitat de Barcelona.
- [10]. Biblioteca Virtual de Chile. Perfiles de disolución. [Internet]. Consultado en Octubre del 2015 en: http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/cide01/cap1/1-5-7.html.

- [11]. Ballesta, Ramon Iriarte. (2015) Desarrollo de medios de disolución biorrelevantes para fármacos con problemas de bioequivalenci.
- [12]. Martinez Agro, Yennifer Zulay. (2014). Desarrollo de una metodología por hplc para la determinación de clorhidrato de propafenona en tabletas recubiertas. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela.
- [13] Administracion de Alimentos y Drogas. (1997). Guía para la Industria: Pruebas de disolución de formas de dosificación oral solidas de liberación inmediata.
- [14]. Farmacopea de los Estados Unidos de América. (2015). Apartado 711 Disolución. USP 35. Vol. 1.
- [15]. A. Aguilar. (2008). Biofarmacia y Farmacocinética. Ejercicios y Problemas Resueltos. Editorial: Elseiver.
- [16]. U.S Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research Services. Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms.
- [17]. Farmacopea de los Estados Unidos de América. (2015). Apartado 1092 Procedimiento de Disolución: Desarrollo y Validación. USP 38. Vol. 1.
- [18] Skoog, Douglas. (2005). Fundamentos de Química Analítica. Octava. Editorial: Cengage Learning Editores, S.A. pág. 795.
- [19] Skoog, Douglas. (2005). Fundamentos de Química Analítica. Octava. Editorial : Cengage Learning Editores S.A. pág. 985.
- [20]. Farmacopea de los Estados Unidos de América. (2015). Apartado 1225 Validación de Procedimientos Farmacopeicos.
- [21]. ICH Harmonised Tripartite Guideline. (1994). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Págs. 6-13.

[22]. Organización Mundial de la Salud. (2005). Criterios Científicos para los Ensayos de Bioequivalencia (in vivo e in vitro), las Bioexcepciones y las Estrategias para su Implementación.

[23].Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. (2001). Validación de métodos analíticos.

[24]. Thiocolchicoside. Pubchem. [Internet]. Consultado en noviembre del 2015 en: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/72067#section=Top>.

[25]. Planta: Cólquico (*Colchicum autumnale*). [Internet]. Consultado en noviembre del 2015 en: [http://www.rdnatural.es/plantas-y-nutrientes-para-el-organismo/plantas/colquico/..](http://www.rdnatural.es/plantas-y-nutrientes-para-el-organismo/plantas/colquico/)

[26].M.Bor, A.Guilarte, L. Guzmán, K. Macías y W. Mendoza. (2017). Validación de un método por RP-HPLC para la determinación de Ticolchicósido en tabletas. AFINIDAD, Vol. LXXV, pág. 28.

[27]. Herrero, A.T. Gonzalo Hernández. Tratado de Medicina Farmacéutica. Medica Panamericana.

[28]. Singh, P. K. S a U. V. S. S. Devendra. (2013). Development, optimization and evaluation of solids dosage form Thiocolchicoside by using absorption enhancers.

Apéndice A.

Determinación de Contenido

Tabla 1. Determinación contenido de Ticolchicósido para el medicamento 1.

Innovador	Peso de 1 Tableta mg	1/4 Peso Tableta (mg)	V (mL)	Áreas	mg/mL	% THC	mg THC en 1/4 Tableta	mg THC en Tabletas	Promedio de THC Tabletas	THC Tableta mg	DS	CV
1	148,1	37	25	2337341,6	0,039	97,375	0,992	3,971	3,971	4,052	0,070	1,730
1				2337969,4	0,039	97,400	0,992	3,972				
2				2408814,6	0,040	100,298	1,021	4,089	4,098			
2				2419023,8	0,041	100,716	1,026	4,107				
3				2405501,6	0,040	100,163	1,020	4,084	4,086			
3				2407347,7	0,040	100,238	1,021	4,087				

Tabla 2. Determinación contenido de Ticolchicósido para el medicamento 2.

Medicamento 1	Peso de 5 Tableta mg	1/4 Peso Tableta (mg)	V (mL)	Áreas	mg/mL	% THC	mg THC en 1/4 Tableta	mg THC en 5 Tabletas	mg THC en 1 Tableta	Promedio de THC Tabletas	THC Tableta mg	DS	CV
1	814,7	40,6	25	2269341,7	0,038	94,594	0,963	19,337	3,867	3,864	3,946	0,0794	2,0129
1				2266003,2	0,038	94,457	0,962	19,309	3,861				
2		40,7		2360299,4	0,040	98,314	1,001	20,098	4,019	4,0234			
2				2364850,1	0,040	98,500	1,003	20,136	4,027				
3		40,6		2321472,9	0,039	96,726	0,985	19,773	3,954	3,950			
3				2316481,5	0,039	96,522	0,983	19,731	3,946				

Tabla 3. Determinación contenido de Ticolchicósido para el medicamento 3-A.

Medicamento 2	Peso de 5 Tableta mg	1/4 Peso Tableta (mg)	V (mL)	Áreas	mg THC en 1/4 Tableta	mg THC en 5 Tabletas	mg THC en 1 Tableta	Promedio de THC Tabletas	THC Tableta mg	DS	CV
1	545,8	27,3	25	1329229	0,924	18,477	3,695	3,699	3,797	0,089	2,335
1				1331891	0,926	18,514	3,703				
2		27,3		1373642	0,955	19,085	3,817	3,821			
2				1376725	0,957	19,128	3,826				
3		27,3		1396152	0,970	19,394	3,879	3,871			
3				1390773	0,966	19,320	3,864				

Tabla 4. Determinación contenido de Ticolchicósido para el medicamento 4.

Medicamento 4	Peso de 5 Tableta mg	1/4 Peso Tableta (mg)	V (mL)	Áreas	mg THC en 1/4 Tableta	mg THC en 5 Tabletas	mg THC en 1 Tableta	Promedio de THC Tabletas	THC Tableta mg	DS	CV
1	1081,7	54,3	25	1393657	0,968	19,290	3,858	3,862	3,903	0,082	2,090
1				1396551	0,970	19,330	3,866				
2		54,2		1379982	0,959	19,139	3,828	3,850			
2				1396169	0,970	19,360	3,872				
3		54,2		1447549	1,005	20,063	4,013	3,997			
3				1436076	0,997	19,906	3,981				

Apendice B.

Determinación del %Disuelto . Perfiles de Disolución de Tiocolchicósido por Espectrofotometria UV-Visible

Tabla 1. Determinación del %Disuelto de Tiocolchicósido del medicamento innovador para el primer vaso del aparato disolutor por UV-Visible.

Vaso 1							
Tiempo (min)	Volumen de medio (mL)	Absorbancias	Concentración alícuota (mg/mL)	Masa THC alícuota (mg)	masa THC vaso(mg)	Masa Total (mg)	% Disuelto
5	900	0,219	0,0060	0,0301	5,4216	5,4216	135,5420
10	895	0,173	0,0047	0,0239	4,2944	4,3246	108,1151
15	890	0,176	0,0048	0,0243	4,3416	4,3957	109,8938
20	885	0,172	0,0047	0,0238	4,2229	4,3014	107,5355
30	880	0,171	0,0047	0,0237	4,1756	4,2779	106,9493
45	875	0,166	0,0046	0,0230	4,0353	4,1613	104,0347
60	870	0,161	0,0044	0,0223	3,8963	4,0454	101,1368

Ecuación de la Recta: $y = 37,527x - 0,0071$; Volumen de Toma de Muestra (V_{tm}) = 5 mL

- Concnetración THC en Alícuota= (Absorbancia – Pto.corte)/ Pendiente
- Masa THC en Alícuota= (Concentración Alícuota x V_{tm})
- Masa THC= (Concnetración Alícuota x Volumen de medio)
- Masa Total= Masa vaso + Masa Alícuota de Toma Anterior
- % Disuelto= (Masa Total x 100) / Cantidad Declarada

Apéndice C.

Determinación del %Disuelto. Perfiles de Disolución de Tiocolchicósido por HPLC.

Tabla 1. Determinación del %Disuelto de Tiocolchicósido del medicamento innovador para el primer vaso del aparato disolutor por HPLC.

Vaso 1										
Tiempo (min)	Volumen de medio (mL)	Áreas	Concentración alícuota (mg/mL)	masa THC alícuota (mg)	masa THC vaso (mg)	Masa Total (mg)	% Disuelto	Promedio % Disuelto	DS	CV
5	900	250164	0,0027	0,0055	2,5015	2,5015	62,54	62,73	0,26	0,42
5	900	251655	0,0028	0,0056	2,5165	2,5165	62,91			
10	897	372474	0,0041	0,0083	3,7181	3,7236	93,09	93,14	0,06	0,07
10	897	372839	0,0041	0,0083	3,7217	3,7273	93,18			
15	894	402552	0,0044	0,0089	4,0058	4,0197	100,49	100,73	0,34	0,34
15	894	404479	0,0045	0,0090	4,0251	4,0390	100,97			
20	891	404405	0,0045	0,0090	4,0108	4,0337	100,84	100,72	0,16	0,16
20	891	403456	0,0045	0,0089	4,0014	4,0243	100,61			
30	888	406160	0,0045	0,0090	4,0147	4,0466	101,16	101,14	0,04	0,04
30	888	405931	0,0045	0,0090	4,0125	4,0444	101,11			
45	885	408800	0,0045	0,0091	4,0273	4,0681	101,70	101,83	0,18	0,18
45	885	409851	0,0045	0,0091	4,0376	4,0786	101,96			

Ecuación de la Recta: $y = 9E+07x - 1200,4$; Volumen de Toma de Muestra (V_{tm})= 2 mL

- Concentración THC en Alícuota= (Absorbancia – Pto.corte)/ Pendiente
- Masa Alícuota= (Concentración Alícuota x V_{tm})
- Masa THC = (Concentración THC en Alícuota x Volumen Vaso)
- Masa Total= Masa THC + Masa THC en Alícuota de Toma Anterior
- % Disuelto= (Masa Total x 100) / Cantidad Declarada.

Apéndice D.

Linealidad

Tabla 1. Representación de la linealidad de las curvas de calibración de Ticolchicósido.

LINEALIDAD	Ecuación de la Recta	R2	R	Error Típico	Desviación Estándar		Factor de Respuesta	
					Pendiente	Pto. Corte	F	CV
1	$y = 9E+07x - 1690,8$	0,9999	0,9999	147936,8805	24621924	89167,52105	88173960,1	0,53
2	$y = 9E+07x + 1251,2$	0,9996	0,9998	146292,8792	24348304,1	96010,00158	87320833,1	0,89
3	$y = 9E+07x - 2631,5$	0,9997	0,9998	146626,5898	24403845,4	96229,01126	86518521,5	1,55

Tabla 2. Cálculos para la determinación de los factores de respuestas para determinación de la linealidad. Curva de calibración 1.

Patrón	Xi	Yi	Xi2	(X-Xpro)	(Xi-Xpro)2	Yi-Yprom	(Yi-Yprom)2	(Xi-Xpro)(Yi-Ypro)	Yi/xi
1	0,001007	87915	1,01405E-06	-0,0026	6,85497E-06	-232212,07	53922443906	607,9776329	87303872,9
1	0,001007	88844	1,01405E-06	-0,0026	6,85497E-06	-231283,07	53491856927	605,5453251	88226415,1
2	0,002014	176328	4,0562E-06	-0,0016	2,59597E-06	-143799,07	20678171574	231,6890562	87551142
2	0,002014	176108	4,0562E-06	-0,0016	2,59597E-06	-144019,07	20741491564	232,0435202	87441906,7
3	0,003021	265905	9,12644E-06	-0,0006	3,65058E-07	-54222,067	2940032514	32,76097268	88018867,9
3	0,003021	266149	9,12644E-06	-0,0006	3,65058E-07	-53978,067	2913631681	32,61354788	88099635,9
4	0,004028	356608	1,62248E-05	0,0004	1,62248E-07	36480,9333	1330858497	14,69451995	88532274,1
4	0,004028	354321	1,62248E-05	0,0004	1,62248E-07	34193,9333	1169225077	13,77331635	87964498,5
4	0,004028	355941	1,62248E-05	0,0004	1,62248E-07	35813,9333	1282637821	14,42585235	88366683,2
4	0,004028	358295	1,62248E-05	0,0004	1,62248E-07	38167,9333	1456791135	15,37404355	88951092,4
4	0,004028	355721	1,62248E-05	0,0004	1,62248E-07	35593,9333	1266928090	14,33723635	88312065,5
5	0,005035	444703	2,53512E-05	0,00141	1,98754E-06	124575,933	15519163166	175,6271508	88322343,6
5	0,005035	445977	2,53512E-05	0,00141	1,98754E-06	125849,933	15838205720	177,423236	88575372,4
6	0,006042	532648	3,65058E-05	0,00242	5,84092E-06	212520,933	45165147105	513,6205917	88157563,7
6	0,006042	536443	3,65058E-05	0,00242	5,84092E-06	216315,933	46792583014	522,7923477	88785667
N	Promedio Factor de Respuesta		CVf						
15	88173960,1		0,53						

Donde $F_{regresión} = \frac{SS_R}{SS_E/(n-2)}$ (ec.1)

SS_R = Fuente de variación de Regresión.

SS_E = Fuente de variación de Residual.

n = Número total de inyecciones.

La suma de cuadrados de regresión (SS_R) y de residual (SS_E) puede determinarse a partir de las siguientes ecuaciones:

$$SS_R = \frac{S_{XY}}{S_{XX}} \cdot S_{XY} \text{ (ec. 2)} \quad SS_E = SS_Y - SS_R \text{ (ec. 3)}$$

Las desviaciones estándares de la regresión, del conjunto de datos de x, y del conjunto de datos de y se representan con las ecuaciones a continuación:

$$S_{XY} = \sum_{i=1}^n (X_i - X_p)(Y_i - Y_p) \text{ (ec. 4)} \quad S_{XX} = \sum_{i=1}^n (X_i - X_p)^2 \text{ (ec. 5)} \quad S_{YY} = \sum_{i=1}^n (Y_i - Y_p)^2 \text{ (ec. 6)}$$

La prueba realizada para el análisis de la varianza por regresión fue empleada como prueba en la evaluación de la linealidad de las curvas de calibración. Esta prueba nos permitió establecer que el modelo de regresión lineal simple empleado es el correcto.

Apéndice E.

Precisión

Tabla 1. Precisión Intermedia Día 1. Curva de calibración.

	Conc. (mg/mL)	Areas
25%	0,001007	87428
25%	0,001007	87364
50%	0,002014	176348
50%	0,002014	176940
75%	0,003021	259623
75%	0,003021	259994
100%	0,004028	351905
100%	0,004028	352260
100%	0,004028	353520
100%	0,004028	352104
100%	0,004028	353828
125%	0,005035	441025
125%	0,005035	448813
150%	0,006042	527695
150%	0,006042	525111

Tabla 2. Precisión intermedia muestras de Tiocolchicósido a los 10 minutos de disolución.

Tiempo Tomas de Muestra (min)	Muestras	Tiempo de Retención (min)	Áreas	Concentración (mg/mL)	Masa (mg)	Porcentaje Disuelto	Promedio Porcentaje Disuelto
10	1	5,131	370692	0,00424	3,81396	95,349	95,905
	1	5,131	375028	0,00429	3,85842	96,460	
	2	5,133	371937	0,00425	3,82672	95,668	95,285
	2	5,128	368947	0,00422	3,79606	94,902	
	3	5,127	402680	0,00460	4,14197	103,549	103,643
	3	5,128	403413	0,00461	4,14948	103,737	
	4	5,128	390904	0,00447	4,02121	100,530	100,410
	4	5,128	389966	0,00446	4,01160	100,290	
	5	5,127	349601	0,00400	3,59769	89,942	90,236
	5	5,133	351892	0,00402	3,62118	90,529	
	6	5,128	378833	0,00433	3,89744	97,436	97,563
	6	5,13	379823	0,00434	3,90759	97,690	
Promedio		5,129	377809,667	0,004	3,887	97,174	97,174
Desviación estándar		0,002	17155,151	0,000	0,176	4,398	4,600
Coeficiente de variación		0,043	4,541	4,526	4,526	4,526	4,734

Tabla 3. Precisión intermedia Día 1. Muestras de Tiocolchicósido a los 20 minutos de disolución.

Tiempo Tomas de Muestra (min)	Muestras	Tiempo de Retención (min)	Áreas	Concentración (mg/mL)	Masa (mg)	Porcentaje Disuelto	Promedio Porcentaje Disuelto
20	1	5,131	397653	0,0045	4,0898	102,2451	102,327
	1	5,132	398286	0,0046	4,0964	102,4095	
	2	5,135	382947	0,0044	3,9394	98,4843	98,847
	2	5,134	385787	0,0044	3,9684	99,2090	
	3	5,136	403254	0,0046	4,1478	103,6960	104,084
	3	5,135	406284	0,0046	4,1789	104,4714	
	4	5,138	396453	0,0045	4,0780	101,9497	102,038
	4	5,139	397149	0,0045	4,0851	102,1272	
	5	5,139	386118	0,0044	3,9713	99,2826	99,191
	5	5,133	385396	0,0044	3,9640	99,0993	
	6	5,132	391847	0,0045	4,0306	100,7647	100,817
	6	5,139	392251	0,0045	4,0347	100,8686	
Promedio		5,135	393618,750	0,004	4,049	101,217	101,217
Desviación estándar		0,003	7482,755	0,000	0,077	1,922	2,000
Coeficiente de variación		0,058	1,901	1,895	1,899	1,899	1,976

Tabla 4. Precisión intermedia Día 1. Muestras de Tiocolchicósido a los 30 minutos de disolución.

Tiempo Tomas de Muestra (min)	Muestras	Tiempo de Retención (min)	Áreas	Concentración (mg/mL)	Masa (mg)	Porcentaje Disuelto	Promedio Porcentaje Disuelto
30	1	5,144	397672	0,0045	4,0900	102,2500	102,126
	1	5,127	396686	0,0045	4,0800	102,0012	
	2	5,108	385978	0,0044	3,9703	99,2578	99,759
	2	5,123	389904	0,0045	4,0104	100,2597	
	3	5,119	403138	0,0046	4,1467	103,6664	104,247
	3	5,123	407676	0,0047	4,1931	104,8267	
	4	5,124	397937	0,0045	4,0931	102,3284	102,765
	4	5,128	401359	0,0046	4,1281	103,2016	
	5	5,127	385501	0,0044	3,9650	99,1252	99,346
	5	5,129	387231	0,0044	3,9827	99,5676	
	6	5,140	402552	0,0046	4,1399	103,4967	103,743
	6	5,178	404479	0,0046	4,1596	103,9893	
Promedio		5,131	396676,083	0,005	4,080	101,998	101,998
Desviación estándar		0,017	7728,814	0,000	0,079	1,984	2,037
Coeficiente de variación		0,340	1,948	1,942	1,945	1,945	1,997

Apéndice F.

Repetibilidad

Tabla 1. Determinación Porcentaje disuelto a los 10 minutos para el análisis de repetibilidad 1.

Tiempo Tomas de Muestra (min)	Muestras	Áreas	Concentración (mg/mL)	Masa (mg)	Porcentaje Disuelto	Promedio Porcentaje Disuelto
10	1	387467	0,004447054	4,00234881	100,05872	100,018567
	1	387153	0,004443485	3,99913655	99,9784137	
	2	382283	0,004388129	3,94931588	98,732897	99,2937632
	2	386669	0,004437984	3,99418517	99,8546293	
	3	388179	0,004455147	4,00963265	100,240816	100,542349
	3	390537	0,00448195	4,03375526	100,843882	
	4	374145	0,004295626	3,86606319	96,6515798	96,8143665
	4	375418	0,004310096	3,87908613	96,9771533	
	5	371315	0,004263458	3,83711196	95,9277991	96,1664165
	5	373181	0,004284668	3,85620136	96,405034	
	6	383310	0,004399802	3,95982221	98,9955553	99,1330225
	6	384385	0,004412022	3,97081959	99,2704897	
Promedio		382003,500	0,004	3,946	98,661	98,661
Desviación estándar		6699,752	0,000	0,069	1,713	1,769
Coeficiente de variación		1,754	1,737	1,737	1,737	1,793

Tabla 2. Determinación Porcentaje disuelto a los 10 minutos para el análisis de repetibilidad 2.

Tiempo Tomas de Muestra (min)	Muestras	Áreas	Concentración (mg/mL)	Masa (mg)	Porcentaje Disuelto	Promedio Porcentaje Disuelto
10	1	385271	0,0044	3,9799	99,4971	99,7219
	1	387029	0,0044	3,9979	99,9467	
	2	385713	0,0044	3,9844	99,6101	99,3753
	2	383877	0,0044	3,9656	99,1406	
	3	372063	0,0043	3,8448	96,1191	96,0870
	3	371812	0,0043	3,8422	96,0549	
	4	360961	0,0041	3,7312	93,2797	93,8080
	4	365092	0,0042	3,7734	94,3362	
	5	371804	0,0043	3,8421	96,0529	96,5467
	5	375666	0,0043	3,8816	97,0406	
	6	383038	0,0044	3,9570	98,9260	99,1571
	6	384845	0,0044	3,9755	99,3881	
	Promedio	377264,250	0,004	3,898	97,449	97,449
	Desviación estándar	8885,538	0,000	0,091	2,273	2,355
	Coeficiente de variación	2,355	2,332	2,332	2,332	2,416

Tabla 3. Determinación Porcentaje disuelto a los 10 minutos para el análisis de repetibilidad 3.

Tiempo Tomas de Muestra (min)	Muestras	Áreas	Concentración (mg/mL)	Masa (mg)	Porcentaje Disuelto	Promedio Porcentaje Disuelto
10	1	390744	0,0045	4,0359	100,8968	100,5742
	1	388221	0,0045	4,0101	100,2516	
	2	375424	0,0043	3,8791	96,9787	96,8442
	2	374372	0,0043	3,8684	96,7096	
	3	360223	0,0041	3,7236	93,0910	92,9111
	3	358816	0,0041	3,7092	92,7311	
	4	380926	0,0044	3,9354	98,3858	98,0727
	4	378477	0,0043	3,9104	97,7595	
	5	382119	0,0044	3,9476	98,6910	98,4388
	5	380147	0,0044	3,9275	98,1866	
	6	388161	0,0045	4,0094	100,2362	99,6785
	6	383800	0,0044	3,9648	99,1209	
Promedio		378452,500	0,004	3,910	97,753	97,753
Desviación estándar		10160,162	0,000	0,104	2,598	2,702
Coeficiente de variación		2,685	2,658	2,658	2,658	2,764

Tabla 4. Comparación de los porcentajes disueltos entre los análisis de repetibilidad.

Tiempos	Perfil 1	Perfil 2	Perfil 3	% Disuelto Promedio	Desviación Estándar	CV
	% Disuelto de Tiocolchicósido					
10 min	98,57	97,11	97,37	97,68	0,78	0,80
20 min	102,16	100,40	100,75	101,10	0,93	0,92
30 min	104,18	101,14	101,08	102,13	1,78	1,74

Apéndice G.

Exactitud

Tabla 1. Contenido de Ticolchicósido en las muestras control sin enriquecimiento.

CONTROL	Tabletas	Áreas	Concentración Final (mg/mL)	Promedio (mg/mL)	DS	CV
1	Primera serie	626019	0,0045	0,0046	6,5E-06	0,14
		627282	0,0046			
2	Segunda Serie	624750	0,0046	0,0046	3,6E-05	0,77
		631607	0,0046			
3	Tercera Serie	626983	0,0046	0,0046	1,9E-05	0,41
		632216	0,0046			

Tabla 2. Determinación del porcentaje de recuperación en las muestras enriquecidas con patrón.

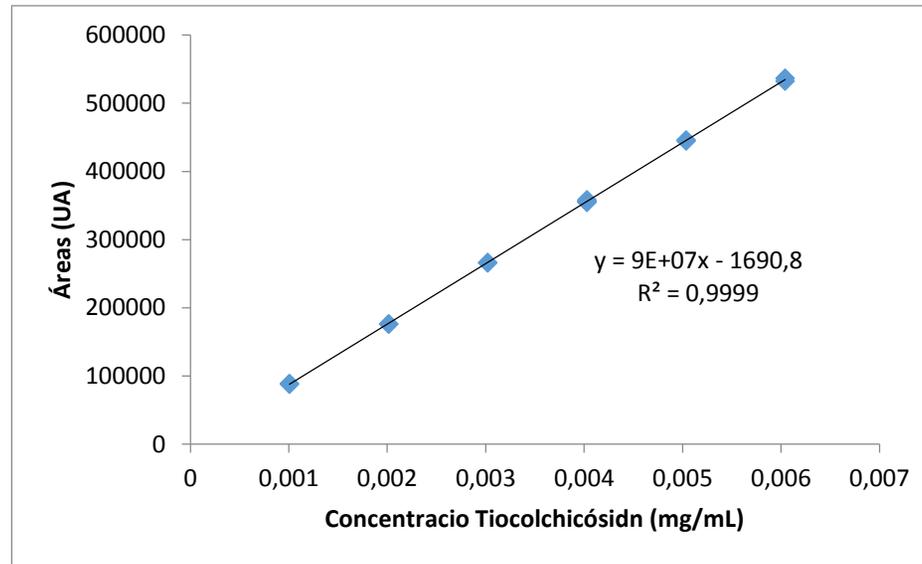
Nivel de Enriquecimiento %	Masa de Tableta (\pm 0,01 mg)	Área señal	mg/mL de THC	Recuperación (%)	Rp (%)	Nivel de concentración estimada (%)
50	163,9	312835	0,0057	102,81	103,66	50
		311508	0,0057	100,62		
	169,8	312668	0,0057	101,53		
		314889	0,0058	105,19		
	167,2	316376	0,0058	106,71		
		315420	0,0058	105,13		
75	165,4	483777	0,0059	98,86	99,34	78
		487728	0,0059	102,48		
	164,8	483777	0,0059	97,77		
		487869	0,0060	101,77		
	165,2	483069	0,0059	96,59		
		485225	0,0059	98,57		
100	157,7	611054	0,0064	101,60	100,84	98
		609806	0,0064	100,87		
	170,1	612103	0,0064	101,59		
		614253	0,0064	102,86		
	157,8	606829	0,0064	97,89		
		610748	0,0064	100,21		

Apéndice H.

Muestra Vencida

Tabla 1. Curva de calibración. Muestra vencida

	Concentración Patrón (mg/mL)	Áreas
25%	0,001007	87915
25%	0,001007	88844
50%	0,002014	176328
50%	0,002014	176108
75%	0,003021	265905
75%	0,003021	266149
100%	0,004028	356608
100%	0,004028	354321
100%	0,004028	355941
100%	0,004028	358295
100%	0,004028	355721
125%	0,005035	444703
125%	0,005035	445977
150%	0,006042	532648
150%	0,006042	536443



Curva de calibración Muestra vencida

Apéndice I.

Pruebas de 24 horas luego del ensayo de disolución

Tabla 1. Curva de calibración primer día análisis.

	Concentración Patrón (mg/mL)	Áreas
25%	0,001007	84969
25%	0,001007	85046
50%	0,002014	172015
50%	0,002014	169254
75%	0,003021	261040
75%	0,003021	262033
100%	0,004028	351297
100%	0,004028	351602
100%	0,004028	351015
100%	0,004028	356719
100%	0,004028	354295
125%	0,005035	438315
125%	0,005035	439508
150%	0,006042	525219
150%	0,006042	525132

Grafico 1. Curva de calibración. Primer día.

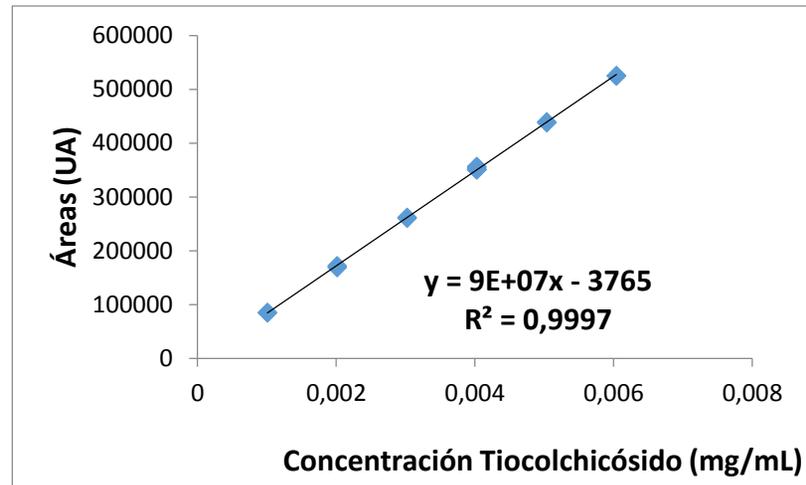
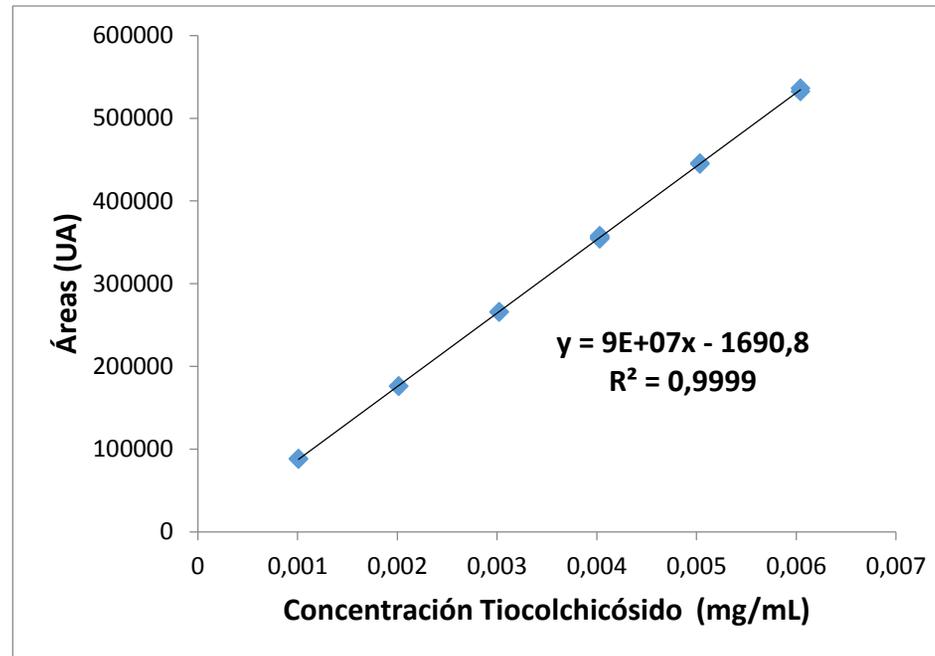


Tabla 2. Curva de calibración segundo día análisis a muestras después de 24 horas del ensayo de disolución.

	Concentración Patrón (mg/mL)	Áreas
25%	0,001007	87915
25%	0,001007	88844
50%	0,002014	176328
50%	0,002014	176108
75%	0,003021	265905
75%	0,003021	266149
100%	0,004028	356608
100%	0,004028	354321
100%	0,004028	355941
100%	0,004028	358295
100%	0,004028	355721
125%	0,005035	444703
125%	0,005035	445977
150%	0,006042	532648
150%	0,006042	536443

Grafico 2. Curva de calibración.



Apéndice J.

Análisis de Medicamentos de distintas marcas comerciales

Tabla 1. Medicamento 1. Primer vaso del aparato disolutor.

Tiempo (min)	Volumen Medio (mL)	Áreas	Concentración THC alícuota (mg/mL)	Masa THC Total (mg)	% Disuelto	Promedio % Disuelto	DS	%CV
5	900	345201	0,003809345	3,4284	85,7102	85,9957	0,4036	0,4694
5	900	347513	0,003834719	3,4512	86,2811			
10	897	390395	0,004305348	3,8733	96,8331	96,9906	0,2227	0,2296
10	897	391667	0,004319308	3,8859	97,1480			
15	894	389734	0,004298094	3,8668	96,6709	96,7673	0,1363	0,1408
15	894	390508	0,004306588	3,8745	96,8638			
20	891	390531	0,004306841	3,8746	96,8658	96,9324	0,0941	0,0971
20	891	391061	0,004312657	3,8799	96,9989			
30	888	389899	0,004299904	3,8684	96,7118	96,7988	0,1231	0,127
30	888	390597	0,004307565	3,8754	96,8859			
45	885	414908	0,004574377	4,1114	102,7845	102,7612	0,0329	0,0321
45	885	414697	0,004572062	4,1095	102,7379			

Tabla 2. Medicamento 2. Primer vaso del aparato disolutor.

Tiempo (min)	Áreas	Concentración THC alicuota (mg/mL)	Masa THC Total (mg)	% Disuelto	Promedio % Disuelto	DS	%CV
5	227431	0,003391093	3,0519	76,29959	76,6706	0,5247	0,6844
5	229740	0,003424077	3,0816	77,04172			
10	227414	0,00339085	3,0517	76,29414	84,2211	11,2105	13,3108
10	276846	0,004096971	3,6859	92,14820			
15	306956	0,004527083	4,0698	101,7457	104,4098	3,7675	3,6084
15	323492	0,004763295	4,2829	107,0738			
20	334566	0,004921483	4,4224	110,5606	110,1544	0,5743	0,5214
20	331869	0,004882958	4,3899	109,7483			
30	334098	0,004914798	4,4164	110,4115	110,1367	0,3885	0,3527
30	332226	0,004888057	4,3944	109,8620416			
45	330257	0,004859931	4,3676	109,1907	108,8594	0,4685	0,4304
45	328029	0,004828104	4,3411	108,5280			

Tabla 3. Medicamento 3. Primer vaso del aparato disolutor.

Tiempo (min)	Áreas	Concentración THC alícuota (mg/mL)	Masa THC Total (mg)	% Disuelto	Promedio % Disuelto	DS	%Cv
10	265706	0,00390051	3,5104	87,7614	87,8436	0,1161	0,1322
10	266200	0,00390781	3,5170	87,9257			
20	270464	0,00397082	3,5735	89,3399	89,6159	0,3903	0,4356
20	272127	0,003995394	3,5956	89,8919			
30	272989	0,004008132	3,6070	90,1757	89,9289	0,3490	0,3881
30	271493	0,003986025	3,5872	89,6821			
40	278395	0,004088017	3,6784	91,9611	92,3623	0,5673	0,6142
40	280823	0,004123896	3,7105	92,7635			

Tabla 4. Medicamento 4. Primer vaso del aparato disolutor

Tiempo (min)	Áreas	Concentración THC alícuota (mg/mL)	Masa THC Total (mg)	% Disuelto	Promedio % Disuelto	DS	%Cv
10	109519	0,001592513	1,4332	35,8315	35,8361	0,0065	0,0183
10	109547	0,001592926	1,4336	35,8408			
20	185481	0,002715014	2,441	61,0316	60,8581	0,2453	0,4031
20	184435	0,002699557	2,427	60,6846			
30	252523	0,003705703	3,328	83,2231	82,9228	0,4246	0,5120
30	250711	0,003678927	3,304	82,6225			
40	288831	0,004242231	3,808	95,2145	95,3888	0,2465	0,2584
40	289893	0,004257925	3,822	95,5631			

