



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE FARMACIA  
POSTGRADO EN ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

**DESARROLLO DEL ENSAYO DE DISOLUCION DE  
DEFLAZACORT EN TABLETAS**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PRESENTADO POR  
CARLA FONSECA FARMACÉUTICO  
TUTOR: Esp. MARIA EUGENIA AVILAN

CARACAS, Octubre 2012



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE FARMACIA  
POSTGRADO EN ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

**DESARROLLO DEL ENSAYO DE DISOLUCION DE  
DEFLAZACORT EN TABLETAS**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PRESENTADO POR  
CARLA FONSECA  
FARMACÉUTICO

Trabajo presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela  
para optar al Título de Especialista en Aseguramiento de la Calidad

TUTOR: Esp. MARIA EUGENIA AVILAN



## VEREDICTO

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, para examinar el Trabajo Especial de Grado presentado por la Farmacéutica: **FONSECA BREAMADRID CARLA MERCEDES C.I. 15.990.537**, bajo el título: “**Desarrollo de ensayo de Disolución de Deflazacort en Tabletas**”, a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **ESPECIALISTA EN ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD**, dejan constancia de lo siguiente:

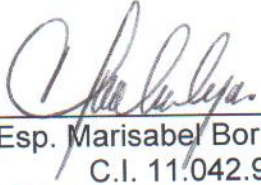
1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día **15 de octubre de 2012** a las **3:26 p.m.**, para que **la autora** lo defendiera en forma pública, lo que **la autora** hizo en el **aula 703**, del **7mo. piso** de la Facultad de Farmacia, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual **respondió** a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **APROBARLO**, por considerar, sin hacerse solidario con la ideas expuestas por **la autora**, que **se ajusta** a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado


Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado constituye un aporte importante en el desarrollo de metodología analítica aplicada al control de calidad de productos en desarrollo, proceso y terminado de Deflazacort en tabletas con indicadores de estabilidad bajo lo criterios internacionales establecidos.

En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los **quince** días del mes de octubre del año **2012**, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como Tutora Coordinadora del jurado la Esp. Maria Eugenia Avilan Avilan.

  
Dra. Miriam Elena Regnault Peña  
C.I. 3.976.826  
Facultad de Farmacia UCV

  
Esp. Marisabel Bor Barragan  
C.I. 11.042.985  
Facultad de Farmacia UCV



  
Esp. María Eugenia Avilan Avilan  
C.I. 6.930.777  
Facultad de Farmacia-UCV  
Tutora-Coordinadora

gl. 16/10/2012.

## DEDICATORIA

*A Dios,*  
*Mi hijo,*  
*Mi esposo*  
*Mis padres.*

## AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud, principalmente está dirigida a Dios y la Virgen por haberme dado la vida y la sabiduría del estudio.

A la Universidad Central de Venezuela, por haberme abierto sus puertas en mi crecimiento profesional científico para contribuir a la salud del país.

A la Facultad de Farmacia de la UCV, por haberme abierto sus puertas brindándome la oportunidad de realizar mis estudios y trabajo de grado en sus espacios, sintiéndome orgullosa de ser parte de sus egresados.

A mi hijo Juan Sebastian Miranda, quien sin saberlo me dio la energía necesaria para culminar este trabajo, que desde antes de nacer me ha acompañado en los análisis experimentales, redacción y correcciones necesarias, siempre con una sonrisa y la mejor actitud permitiéndome así culminar con esta investigación.

A mi esposo Juan Carlos Miranda me brindo su ayuda, apoyo y amor en todo momento, siendo mi pilar de apoyo en los momentos difíciles durante la realización de este trabajo.

A mis padres Juan Carlos Fonseca y Clemy Breamadrid quienes me han apoyado y ayudado en todo momento, gracias por haberme dado la vida y educación que me permitió llegar hasta aquí.

Mi hermana Yvelc Fonseca quien en sus escasos tiempos libres me ayudó y brindo su apoyo.

Muy especialmente a la Profesora María Eugenia Avilán, que más que una tutora fue una amiga y docente inigualable, la cual me ha acompañado durante todo el camino de esta investigación, brindándome siempre su orientación con profesionalismo ético en la adquisición de conocimientos y afianzando mi formación. Más que una tutora una amiga, una guía en todo momento. GRACIAS.

A la Cátedra de Análisis de Medicamentos que me cedió sus espacios y equipos para la realización del presente trabajo, igualmente a las Profesoras Miriam Regnault, Marisabel Bor, Patricia Baffi, Katuska Charris y TSU Dubraska Vega que me brindaron su apoyo y amistad.

Al Departamento de Investigación y Desarrollo de Laboratorios Oftalmi, quien liderado por Ramón Vivas, me permitió realizar el placebo, las tabletas y diversos análisis previos que me sirvieron de base para la realización de esta investigación.

## RESUMEN

El ensayo de disolución representa una prueba de control de calidad importante que sirve como indicador de los procesos críticos dentro de la manufactura de una forma farmacéutica sólida. Este ensayo simula el comportamiento de una tableta dentro del tracto gastrointestinal antes de la absorción del fármaco por el organismo. Se desarrolló el ensayo de disolución para la determinación de tabletas de Deflazacort 6 mg elaboradas por el departamento de investigación y desarrollo de un laboratorio nacional venezolano. El Deflazacort es un esteroide utilizado en pacientes con cáncer, trasplantes de órganos, patologías respiratorias y gastrointestinales graves. Las condiciones finales fueron Aparato 2 (paletas), 900 mL de SDS al 0,1%; 37°C, 50 rpm y tiempo de muestro 30 minutos con un  $Q \geq 75\%$ . El ensayo de disolución desarrollado demostró ser sensible a fallas en el proceso de manufactura del producto. Adicionalmente se evaluaron muestras del producto genérico y Calcort<sup>®</sup> de Laboratorios Novartis, demostrando su aplicabilidad en ambos productos fabricados por laboratorios diferentes. Para la cuantificación del Deflazacort se adecuó un método por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa acoplado a PDA. Las condiciones cromatográficas fueron columna Symmetry C18 5 $\mu$ , fase móvil ACN:Agua (45:55), velocidad de flujo 1 mL/min con una longitud de onda de detección de 244 nm. Este método fue validado con criterios de estabilidad según los parámetros establecidos por la USP 35 NF30 y la ICH, demostrando ser un método lineal, preciso, exacto, sensible, específico y robusto. Ambos métodos son útiles para la evaluación de nuevas formulaciones y para el control de calidad lote a lote del producto comercializado.

Palabras claves: Deflazacort, ensayo de disolución, HPLC.

### ABSTRACT

The dissolution test represents an important quality control test that serves as an indicator of critical processes in the manufacture of a solid dosage form. This test simulates the behavior of a tablet within the GIT before drug absorption by the body. Dissolution test conditions were developed for 6 mg Deflazacort tablets made by the research and development department of a Venezuelan national laboratory. The Deflazacort is a steroid used in patients with cancer, organ transplantation, and severe respiratory gastrointestinal diseases. The final conditions were Apparatus 2 (paddles), 900 mL of 0.1% SDS, 37 ° C, 50 rpm and sampling time 30 minutes with a  $Q \geq 75\%$ . The developed dissolution test proved to be sensitive to faults in the process of product manufacturing. Additionally, generic and Calcort<sup>®</sup> Novartis Laboratories samples were evaluated, showing it's been good in both products manufactured by different laboratories. For quantification of Deflazacort a method using reversed-phase high resolution liquid chromatography with PDA detection was adapted. The chromatographic conditions were a 5 $\mu$  C18 Symmetry column, ACN:water

(45:55) as a mobile phase, 1 mL / min as a flow rate with a wavelength of 244 nm for detection. In this work we also present the validation of this stability-indicating HPLC method using criteria set by USP 35 NF30 and ICH, showing to be linear, precise, accurate, sensitive, specific and robust. Both methods are useful for testing new formulations and quality control batch to batch of commercial products.

Keywords: Deflazacort, dissolution test, HPLC.



# INDICE

	Página
Veredicto	iii
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Resumen	vii
Índice	ix
Índice de tablas	xi
Índice de figuras	xiii
1. Introducción	15
2. Objetivos	33
2.1 Objetivo General	33
2.2 Objetivos Específicos	33
3. Materiales y métodos	34
3.1 Equipos	34
3.2 Materiales	34
3.3 Metodología analítica	37
3.3.1 Preparación de las tabletas	37
3.3.2. Cromatografía	40
3.3.2.1. Preparación de la Fase Móvil	40
3.3.2.2. Preparación del Patrón de Deflazacort	40
3.3.2.4. Procedimiento	41
3.3.3. Validación de la Metodología Analítica	43

3.3.3.1. Procedimiento	43
3.3.4. Desarrollo del ensayo de disolución	49
3.3.4.1. Procedimiento	49
3.5 Ensayo de disolución de diferentes tabletas de Deflazacort	52
4. Resultados y discusión	53
4.1. Método cromatográfico	53
4.2. Validación	60
4.3. Desarrollo del ensayo de disolución	78
4.4 Ensayos de Disolución comparativo con tabletas de Deflazacort	88
5. Conclusiones y Recomendaciones	90
5.1 Conclusiones	91
5.2 Recomendaciones	93
6. Referencias bibliográficas	94
Anexos	97

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I. Aspectos cronológicos de la disolución	17
Tabla II. Criterios de aceptación para el análisis de disolución de formas farmacéuticas sólidas de liberación inmediata.	21
Tabla III. Condiciones de ensayos de disolución de Esteroides en la USP 35 NF 30.	29
Tabla IV. Condiciones cromatográficas de Deflazacort en diferentes matrices.	31
Tabla V. Condiciones finales en desarrollos de ensayos de disolución.	32
Tabla VI. Comparación de parámetros cromatográficos evaluando la fuerza del solvente con las diferentes mezclas de ACN y agua en Deflazacort.	55
Tabla VII. Datos de la curva de calibración.	62
Tabla VIII. Datos de la precisión del sistema cromatográfico	64
Tabla IX. Exactitud del método analítico	65
Tabla X. Resultados obtenidos experimentalmente en tres replicas de una dilución de una muestra que en el límite de cuantificación	66
Tabla XI. Robustez del método cromatográfico	68
Tabla XII. Resultados de la estabilidad de la muestra sometida a diferentes condiciones	76
Tabla XIII. Adecuación del sistema cromatográfico según parámetros establecidos por la USP 35 NF 29.	77
Tabla XIV. Datos crudos de las seis curvas de calibración.	98
Tabla XV. Datos crudos de los tres días de análisis de exactitud.	99
Tabla XVI. Resultados obtenidos de perfiles de disolución con tabletas de Deflazacort de 6 mg en HCl 0.1N en diferentes revoluciones por minuto.	100
Tabla XVII. Resultados obtenidos de perfiles de disolución con tabletas de Deflazacort de 6 mg en Agua en diferentes revoluciones por minuto	100
Tabla XVIII. Resultados obtenidos de perfiles de disolución con tabletas de Deflazacort de 6 mg en Buffer acetato pH 4.5 en diferentes revoluciones por minuto.	100
Tabla XIX. Resultados obtenidos de perfiles de disolución con tabletas de Deflazacort de 6 mg en Buffer fosfato pH 6.8 en diferentes revoluciones por minuto.	101
Tabla XX. Resultados obtenidos de perfiles de disolución con tabletas de Deflazacort de 6 mg en HCl 0.1N con agregado de 0.3% de SDS en diferentes revoluciones por minuto.	101

Tabla XXI. Resultados obtenidos de perfiles de disolución con tabletas de Deflazacort de 6 mg en Agua con agregado de 0.3% de SDS en diferentes revoluciones por minuto.	102
Tabla XXII. Resultados obtenidos de perfiles de disolución con tabletas de Deflazacort de 6 mg en Agua con agregado de SDS en diferentes porcentajes	103
Tabla XXIII. Resultados obtenidos del análisis de tabletas de Deflazacort de 6 mg controladas y no controladas con las condiciones finales del ensayo de disolución	104
Tabla XXIV. Resultados obtenidos del análisis de tabletas de Deflazacort de 6 mg con las condiciones finales del ensayo de disolución	105
Tabla XXV. Resultados obtenidos del análisis de Calcort® 6 mg con las condiciones finales del ensayo de disolución.	106

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura Nº 1. Estructura molecular del Deflazacort.	30
Figura Nº. 2 Cromatograma obtenido utilizando el método descrito por el fabricante para el análisis de Deflazacort.	53
Figura Nº. 3 Cromatograma obtenido utilizando un flujo de 1,5 y 1,0 mL/min con condiciones cromatográficas sugeridas por el fabricante.	54
Figura Nº. 4 Gráficos de Pureza obtenidos para el Deflazacort a flujos de 1,5 y 1,0 mL/min con condiciones cromatográficas del fabricante de la materia prima.	54
Figura Nº. 5 Cromatogramas de Deflazacort obtenidos de la evaluación de la fuerza del solvente con flujo de 1,0 mL/min.	55
Figura Nº. 6 Gráficos de Pureza de Cromatogramas de Deflazacort obtenidos de la evaluación de la fuerza del solvente.	56
Figura Nº. 7 Integración del pico de Deflazacort y parámetros de la adecuación del sistema para las condiciones cromatográficas seleccionadas.	57
Figura No. 8 Cromatograma y espectro obtenido con las condiciones seleccionadas	59
Figura Nº 9 Cromatogramas del placebo y del placebo añadido con estándar de Deflazacort.	60
Figura No. 10. Grafico de pureza del pico cromatográfico de Deflazacort.	61
Figura No. 11 Curva de calibración promedio de Deflazacort	63
Figura Nº 12. Cromatogramas superpuestos demostrando la precisión del sistema cromatográfico	64
Figura Nº 13. Limite de cuantificación concentración de 1 µg/mL	66
Figura Nº 14. Limite de detección concentración de 0,125 µg/mL	67
Figura Nº. 15 Degradación del Deflazacort por hidrólisis ácida.	69
Figura Nº 16 Comparación de espectros de los degradados de Deflazacort en hidrólisis ácida.	70
Figura Nº. 17 Degradación del Deflazacort por hidrólisis alcalina	73
Figura Nº. 18. Degradación del Deflazacort por oxidación	74
Figura Nº. 19. Degradación del Deflazacort por fotólisis	75
Figura Nº. 20. Degradación del Deflazacort por descongelación.	76
Figura Nº 21 Adecuación del Sistema cromatográfico según los parámetros establecidos por la USP 35 NF 30.	77
Figura Nº 22. Perfiles comparativos obtenidos en diferentes condiciones del ensayo de disolución, recomendados por la USP 35 NF 30	79
Figura Nº 23. Cromatograma y espectros de tabletas de Deflazacort en medio HCl 0.1N.	80

Figura N° 24. Perfiles comparativos obtenidos con el agregado de 0.3 % de SDS a los medios de HCl 0.1N y Agua a 50 rpm.	84
Figura N° 25. Perfiles comparativos obtenidos con el agregado de 0.3 % de SDS a los medios de HCl 0.1N y Agua a 75 rpm.	85
Figura N° 26. Perfiles comparativos obtenidos con el agregado de 0.3, 0.2 y 0.1 % de SDS en Agua a 50 rpm.	86
Figura N° 27. Grafico de control de % disuelto de Deflazacort vs numero de muestras bajo las condiciones finales	87
Figura N° 28. Ensayos de disolución de tabletas de Deflazacort 6 mg y Calcort® 6 mg.	88

## 1. INTRODUCCIÓN

El ensayo de disolución es una prueba de carácter farmacopéico que mide la velocidad de disolución; la cual viene dada por la cantidad de fármaco presente en una forma de dosificación sólida, que se disuelve por unidad de tiempo bajo condiciones estandarizadas de interfase líquido/sólida, temperatura y composición del solvente. La disolución del fármaco depende de la constante de disolución intrínseca ( $K_d$ ), la cual se estudia determinando la velocidad de disolución del fármaco en un comprimido sin excipientes y con área superficial fija (Hanson, 1990).

El objetivo del estudio de la disolución intrínseca es determinar la velocidad (cantidad/tiempo y extensión) a la cual el fármaco se libera de la forma farmacéutica, según la ecuación de Noyes-Whitney, modificada por Underwood y Cadwallader:

$$\frac{dM}{dt} = -k_d A(C_s - C)$$

Donde;  $M$  = masa de sustancia remanente para ser disuelta

$A$  = área superficial del fármaco expuesta al medio de disolución

$C_s$  = concentración de disolución (solubilidad)

$C$  = concentración del fármaco en el medio al tiempo  $t$

$k_d$  = constante de disolución intrínseca (Hanson, 1990).

La constante de velocidad de disolución intrínseca ( $K_d$ ), varía de fármaco a fármaco y es una función del coeficiente de difusión del fármaco ( $D$ ) y el espesor de la interfase sólido/líquido ( $l$ ). Esto implica que la velocidad de disolución influye directamente en el control de la liberación del fármaco de la forma farmacéutica, de forma tal que si  $K_d > 1 \text{ mg/min.cm}^2$ , implicaría una liberación sin problemas. Un valor de  $K_d < 0.1 \text{ mg/min.cm}^2$ , implicaría limitación en la velocidad de liberación afectando la biodisponibilidad del fármaco (Hanson, 1990). Si se aumenta la velocidad de agitación, el espesor de la interfase líquido/sólida disminuye progresivamente; por lo tanto,  $K_d$  es una función de la prueba de disolución (Remington, 1987).

En formas farmacéuticas sólidas de fármacos poco solubles, la desintegración es rápida pero la disolución es lenta y una adecuada absorción solo se logra controlando la solubilidad intrínseca del fármaco, siendo en estos casos la selección de los excipientes de la formulación un factor importante para mejorar la solubilidad, es por ello que debe evaluarse la disolución a través de un ensayo normalizado, robusto y confiable.

El ensayo de disolución ha tomado mayor importancia a lo largo de los años. El papel del proceso de disolución en la eficacia de una forma farmacéutica sólida, ha sido objeto de extensas investigaciones desde la década del 50 (Ver Tabla I). Sin embargo, es a partir de 1970 cuando se convierte en una prueba de carácter farmacopéico por la relación directa entre la velocidad de disolución y



la absorción de un fármaco; convirtiéndose en una prueba fisicoquímica utilizada en el control de calidad de los diferentes lotes de producción.

**Tabla I. Aspectos Cronológicos de la disolución.** En la tabla se muestra la cronología de los hallazgos del ensayo de disolución a lo largo de los años hasta la actualidad.

Año	Hallazgo
1950*	La prueba de desintegración se oficializa en la USP XIV.
1958*	Se desarrolla el método de botella rotatoria para estudiar las formulaciones de liberación prolongada.
1960*	- Se reconoce que la desintegración es un proceso esencial para la biodisponibilidad. - El Panel Conjunto USP-NF reconoce la necesidad de una prueba de disolución estandarizada.
1970*	Aparece en la USP XVIII la primera prueba oficial de disolución.
1975*	La USP recomienda dos aparatos para las pruebas de disolución.
1978*	- La USP establece el uso de Calibradores - La USP publica un estudio para tres Calibradores: Prednisona (desintegrante), Acido salicílico (no desintegrante). - La USP y la FDA enfatizan la necesidad de obtener una prueba de disolución estandarizada. - La FDA publica "Guía para la prueba de disolución"
1990*	Se incorporan a la USP XXII aparatos 3, 4, y 5 para la disolución de parches transdérmicos.
1995*	La USP XXIII incorpora 2 nuevos aparatos para productos de liberación prolongada y enumera los 7 aparatos.
1997**	La Guía para la industria Farmacéutica de la FDA, se hace obligatoria para las formas farmacéuticas sólidas orales.
2000**	La FDA publica varias Guías relacionadas con disolución.
2004***	Se publica la Norma Venezolanas de Biodisponibilidad y Bioequivalencia de Productos Farmacéuticos, donde se hace de obligatorio el ensayo de disolución para productos farmacéuticos sólidos orales, bien sea innovadores ó genéricos.

\* Rockville, 2008

\*\* FDA, 1997

\*\*\* Normas Venezolanas de Biodisponibilidad y Bioequivalencia de Productos Farmacéuticos, 2004

Siendo actualmente el ensayo de disolución la única prueba de control de calidad que evalúa la velocidad de disolución de un fármaco presente en un medicamento por unidad de tiempo bajo condiciones estandarizadas de interfase líquido/sólido, temperatura y composición del solvente. (Hanson, 1990).

El ensayo de disolución también permite evaluar aquellos fármacos, que son absorbidos por difusión pasiva, determinando la velocidad (cantidad/tiempo y extensión) a la cual el fármaco se libera de la forma de dosificación, siendo de gran utilidad como simulador “*in vitro*” del comportamiento “*in vivo*” de productos farmacéuticos. Por lo tanto, el principal factor que afecta la absorción del fármaco es generalmente la liberación del principio activo; la cual puede ser afectada por una deficiente formulación o la aplicación inadecuada de tecnología en el desarrollo de la forma farmacéutica.

Esto trae como consecuencia que la curva dosis-respuesta tenga amplio rango de efectividad, debido a las variaciones de la biodisponibilidad que se traduce en respuestas terapéuticas inadecuadas. Si la velocidad de disolución es lenta o incompleta, el nivel sanguíneo alcanzado con el fármaco resultará bajo e insuficiente para lograr un efecto terapéutico adecuado. Si la velocidad de disolución es muy rápida puede provocar saturaciones del sitio de absorción o nivel sanguíneo elevado. De ahí que hoy día se conceda enorme importancia a la cinética de disolución de fármacos, a partir de una forma farmacéutica sólida.

El ensayo de disolución asegura la calidad del producto lote a lote y su optimización después de un cambio en manufactura, formulación y escalamiento del proceso, permitiendo controlar el comportamiento tecnológico del producto farmacéutico, ya que proporciona evidencia que permite establecer una correlación de los parámetros “*in vivo*”/ “*in vitro*” para evaluar la liberación del fármaco en el sitio de absorción (Rockville, 2008).

Este ensayo debe especificar las condiciones, tales como velocidad de agitación, duración del ensayo, medio de disolución, volumen, temperatura, límites de aceptación y descripción del método analítico para la cuantificación del fármaco (Remington, 1987).

El desarrollo del ensayo de disolución se realiza en aparatos de disolución calibrados, y siguiendo las recomendaciones descritas en las diferentes guías de la FDA y en los Capítulos de la USP35 NF 30 secciones <711>, <724>, <1087>, y <1088> para Disolución, Liberación de Fármacos, Disolución Intrínseca, Evaluación de Formas Farmacéuticas y Correlación *In Vitro/In Vivo* respectivamente. Estas pruebas de disolución son métodos de control “*in vitro*” que permiten evaluar las características de liberación de un fármaco desde su forma farmacéutica a un medio de disolución apropiado en condiciones experimentales cuidadosamente estandarizadas. De forma general, se realiza en un mínimo de seis comprimidos, en donde el volumen del medio de disolución es establecido por la condición “*Sink*” del medio de disolución. Luego de alcanzar la temperatura de 37°C, la forma farmacéutica sólida es sumergida en el medio de disolución a tiempo cero, utilizando la velocidad de agitación y el tipo de aparato especificado. La toma de la muestra se realiza al tiempo establecido en la monografía, se filtra y analiza para determinar el porcentaje de fármaco disuelto.

Los equipos de disolución deben estar calibrados y calificados, manteniendo bajo control las variables que pudieran interferir en el análisis, garantizando así la fiabilidad de los resultados. En la actualidad las principales farmacopeas del mundo incluyen métodos, técnicas y normas al respecto, con el fin de asegurar la efectividad de los medicamentos elaborados por los laboratorios industriales. (Hanson, 1990).

Los medios de disolución utilizados generalmente son Agua, Medio HCl 0,1N; Medio Buffer Acetato pH 4,5 y Medio Buffer Fosfato pH 6,8. Para fármacos insolubles o poco solubles en agua, la FDA (1997) recomienda utilizar algún agente surfactante para coadyuvar en la disolución. El agente ampliamente utilizado es el dodecilsulfato de sodio (SDS) en una concentración máxima permitida del 3%, sin embargo, el añadido de surfactante debe ser determinado experimentalmente teniendo como objetivo el uso de la menor cantidad de tensoactivo con la cual se solubilice no más del 85% del principio activo de la forma farmacéutica (FDA 1997).

La USP 35 (2012), clasifica en la Categoría III (características de desempeño, disolución) al ensayo de disolución. En el cual se debe realizar el estudio de la precisión para la validación, mientras que los restantes parámetros se evalúan dependiendo de la naturaleza específica del ensayo.

La USP describe los criterios de aceptación, siendo Q la cantidad de ingrediente activo disuelto expresado como porcentaje del contenido declarado (Ver tabla II).

**Tabla II. Criterios de aceptación para el análisis de disolución de formas farmacéuticas sólidas de liberación inmediata.** La tabla muestra los niveles de análisis, el número de muestras a analizar en cada caso y los criterios para la aprobación o rechazo de cada nivel. (Tomado de USP 35 NF 30, 2012).

Nivel	Número Probado	Criterios de aceptación
S(1)	6	Cada unidad no deberá ser menor que Q + 5%.
S(2)	6	El promedio de 12 unidades [S(1)+S(2)], deber ser igual o mayor que Q, y ninguna unidad deberá ser menor que Q -15%.
S(3)	12	El promedio de 24 unidades [S(1)+S(2)+S(3)] deberá ser igual o mayor que Q, no más de 2 unidades deberán ser menor de Q-15%, y ninguna unidad deberá ser menor que Q -25%.

La importancia del ensayo de disolución según la USP 35 NF 30 sección <1088> (2012), viene dada por:

- Predecir el desempeño “*in vivo*” del principio activo, ya que ha logrado demostrar su importancia en simulador de las condiciones “*in vivo*”, permitiendo ajustar las especificaciones de disolución adecuadas para cada formulación.
- Permitir establecer un criterio en la selección de la formulación más adecuada para desarrollo, suministrando los datos iniciales de las formulaciones o lotes con diferentes características biofarmacéuticas. Las variaciones en la velocidad de disolución “*in vitro*”, deben ser acompañadas solo por cambios en los procesos y componentes que se espera varíen

durante el proceso normal de manufactura (variables de producción críticas), desarrollando un ensayo de disolución que pueda distinguir entre las formulaciones o lotes preparados. (Bergum, 1990).

- Controlar la calidad proporcionando evidencia sobre la consistencia física del producto y el proceso de fabricación, haciendo la extracción de muestras en puntos críticos del proceso. Estas muestras son sometidas a ensayos, generalmente rápidos y sencillos, que permiten comprobar si el producto cumple con las especificaciones correspondientes a la etapa que se está llevando a cabo. Adicionalmente, la disolución es un excelente ensayo para evaluar la calidad del producto final, ya que es capaz de discriminar fallas en el proceso de fabricación o cambios en la formula maestra. (FDA, 1997).
  
- Evaluar la Calidad lote a lote, siendo útil durante las primeras etapas del desarrollo del producto y de su formulación óptima para la biodisponibilidad del fármaco, demostrando que el principio activo se disuelve correctamente.
  
- Establecer un criterio en los cambios referentes al escalamiento y post-aprobación del producto, al realizar pruebas de disolución a varias formulaciones y obtener resultados que demuestren que las mismas son bioequivalentes lo cual permite asumir que producirán el mismo efecto terapéutico, permitiendo realizar cambios en la formulación sin afectar la eficacia terapéutica del medicamento. (FDA, 1995).

- Evaluar la estabilidad del producto, luego de la comercialización, con la finalidad de garantizar la reproducción de la calidad del diseño en los lotes de comercialización. (Hanson,1990)
- Permitir a las entidades regulatorias tomar la decisión de otorgar la autorización para la comercialización y la evaluación de cambios menores en la formulación y procesos de fabricación post aprobación, por eso se convierte en un requisito regulatorio de formas farmacéuticas sólidas. (Normas Venezolanas de Biodisponibilidad y Bioequivalencia de Productos Farmacéuticos, 2004)

Existen diferentes factores que influyen en la velocidad de la disolución de formas farmacéuticas sólidas tales como:

- 1) El estado amorfo o cristalino del fármaco donde la forma amorfa es más soluble que la cristalina, así mismo en fármacos polimorfos, presenta mayor solubilidad que la forma metaestable. Por otra parte son más solubles las formas hidratadas que las anhidras. Todos estos factores relacionados con la formulación del fármaco modifican el proceso de absorción, pudiendo afectar la biodisponibilidad del fármaco (Cardoso, 2008).
- 2) El estado químico (ácido, base o sal), las sales son más solubles.
- 3) Las propiedades físico-químicas del fármaco, siendo la condición “Sink” determinante en la disolución. Esta condición establece que el volumen de medio de disolución debe ser de 5 a 10 veces mayor que el requerido para obtener una solución saturada.

- 4) A menor tamaño de partícula, mayor área superficial, mayor solubilidad.
- 5) A menor dosis mayor solubilidad. Dosis altas provocan saturación debido a la cantidad acumulada de fármaco disminuyendo la velocidad liberación.
- 6) La capacidad de humectación de la forma farmacéutica.
- 7) La capacidad de penetración del medio de disolución.
- 8) El proceso de desintegración y disgregación.
- 9) Las características fisicoquímicas de los excipientes (diluyentes, desintegrantes, lubricantes, granulantes, etc).
- 10) Las características tecnológicas tales como tamaño del gránulo, distribución, fuerza de compresión y la humedad durante el proceso de granulación y compresión; debido a que estos factores intrínsecos de la formulación afectan la capacidad de disolución de un fármaco (Hanson, 1990).

Para la cuantificación del principio activo en el ensayo de disolución la metodología analítica más recomendada es la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP), la cual es un tipo de cromatografía en columna utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. Su elevada resolución permite la purificación de rutina de mezclas cuya separación no se consigue por otras técnicas, su velocidad permite que la mayor parte de las separaciones se consigan significativamente en tiempos menores a 10 minutos.



Su elevada sensibilidad permite la valoración cuantitativa exacta y precisa. Permite la automatización, buena estabilidad, reproducibilidad, amplio margen de respuesta lineal, bajo volumen muerto, logra minimizar el ensanchamiento de la banda cromatográfica y es insensible a cambios presión y temperatura. Todas estas ventajas cumplen con los criterios establecidos por la FDA para glucocorticoides, siendo muy importante la exactitud y precisión en la cuantificación del principio activo con la finalidad de garantizar la calidad del producto final que será dispensado al paciente (FDA, 1997).

Usualmente esta técnica permite obtener separaciones en minutos, por lo tanto se requieren columnas de alta tecnología y sistemas de bombeo de alta presión.

Los métodos de HPLC proporcionan muy buena información de tipo cuantitativo, efectuando análisis con precisión del 1%. Los detectores actuales tales como el Detector de Arreglo Regular de Diodo (PDA) proporcionan buena sensibilidad y según el tipo de muestra suelen detectar y cuantificar hasta  $10^{-9}$  g (nanogramos), con la ventaja adicional que permite la evaluación del analito de interés a diferentes longitudes de onda solo con una inyección del mismo (Skoog, 2000)

La cromatografía en fase reversa se basa en el principio de separación de mezclas, fundamentado en la velocidad de desplazamiento diferencial que se establece entre el analito que interactúa con la fase móvil y la fase estacionaria, empacada en columnas, permitiendo analizar gran variedad de compuestos;

iónicos, lábiles, polímeros y poli funcionales de alto peso molecular. Proporcionando un sistema de gran resolución por la utilización de columnas de diámetros pequeños y gran selectividad debido a la combinación de solventes en las fases móviles. (Regnault, 2005)

Según la USP 35 NF 30 sección <621> (2012), en cromatografía existen una amplia variedad de columnas disponibles, siendo necesario definir las condiciones cromatográficas de forma específica, debido a los procesos que tienen lugar en la columna durante la separación. Estos contribuyen a la variación de los parámetros cromatográficos del pico, el ensanchamiento de la banda y factores que afectan los procesos termodinámicos y cinéticos dentro de la columna, debido a las interacciones del fármaco con las fases estacionaria y móvil (transferencia de masa) (Marques, 2002).

En cromatografía líquida se usan velocidades de flujo en rangos mayores que en la cromatografía de gases, para hallar un valor mínimo de ancho de pico, como lo señala la ecuación de Van Deemter, lo cual indica que la altura equivalente al plato teórico es menos dependiente del flujo de la fase móvil (Regnault, 2005).

La cromatografía líquida de alta resolución utilizada como técnica analítica para el control de calidad de medicamentos debe ser validada de acuerdo a las normativas internacionales vigentes.

En general, las siguientes condiciones de validación deben considerarse, según la Guía Q2 de la Conferencia Internacional de Armonización (1994):

- La prueba de aptitud del sistema.
- La idoneidad del sistema usando calibradores
- Validación de los procedimientos manuales y automáticos
- Validación de cualquier etapa determinante en la prueba de disolución
- Validación del método analítico en general.

Los parámetros de la validación de métodos cromatográficos según la USP 35 NF 30 sección <1225> (2012) son pruebas experimentales que demuestran científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Implica la demostración de las fuentes de variabilidad, error sistemático y el azar en un procedimiento, no solo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales.

En conclusión los parámetros exigidos son:

1. Especificidad.
2. Linealidad y rango.
3. Exactitud y precisión.
4. Límites de cuantificación y detección.
5. Robustez.
6. Estabilidad de la muestra.

El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que es apto para el propósito indicado. (*ICH Guideline Q2A ,1994*)

En la validación de los ensayos de disolución se pretende otorgar una fiabilidad adecuada al uso rutinario del mismo. La Farmacopea de Estados Unidos, USP 35 NF30 sección <1029> (2012), plantea para el ensayo de disolución el estudio de la precisión; sin embargo, en otros reportes o fuentes se incluyen aspectos tan importantes como la especificidad con respecto al placebo, linealidad, precisión y la influencia de la filtración. (Rockville, 2008).

La validación de las metodologías analíticas persiguen como objetivo demostrar precisión, exactitud y reproducibilidad en el tiempo. Los parámetros a validar según el Comité de Armonización Internacional son Linealidad y Rango, Exactitud, Precisión, Límite de detección y cuantificación, Especificidad, Robustez y estabilidad, los cuales son evaluados en el presente trabajo. Mientras que la validación del ensayo de disolución es importante para la demostración de resultados confiables; principalmente en los ensayos de disolución de esteroides reportados (Ver Tabla III). En la USP 35 NF 30, los análisis cuantitativos de esteroides son realizados por diferentes métodos tales como espectrofotométrico y mediante RP- HPLC.

En la actualidad no existen reportados análisis de cuantificación ni de disolución de Deflazacort en las guías farmacopéicas americana, europea, británica y

japonesa. Solo existen publicaciones en revistas científicas internacionales (Ver Tabla IV).

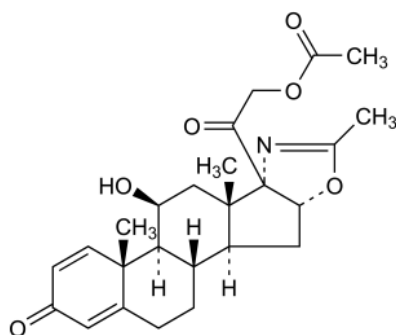
**Tabla III. Condiciones de ensayos de disolución de Esteroides en la USP 35 NF 30.** La tabla muestra las diferentes condiciones de los ensayos de disolución de esteroides descritos en la farmacopea americana.

Principio Activo**	Aparato	Medio	Vol. (mL)	Vel. (rpm)	Temp (+/-0,5 °C)	Tiempo (min)	Método analítico
Betametasona	2	Agua	900	50	37	45	RP-HPLC 254nm
Cortisona	2	SDS *0,5%	1000	50	37	45	UV 242 nm
Dexametasona	1	HCl 0,1N	500	100	37	45	VIS 525 nm
Hidrocortisona	2	Agua	900	50	37	30	UV 248 nm
Prednisona <10mg >10mg	2	Agua	500 900	50	37	30	UV 242 nm
Triamcinolona	1	HCl 0,1N	900	100	37	45	UV 238 nm

\*Cumple con el 3% de SDS aprobado por la FDA y USP.

\*\*El Q debe ser mayor de 75% y no mayor de de 85% para todos los esteroides.

El Deflazacort es un esteroide de nueva generación, derivado de la prednisolona, cuya estructura y fórmula molecular se muestra en la figura N°1; de fórmula química  $C_{25}H_{31}NO_6$ , peso molecular 441.517 g/mol y número CAS/SN 14484-47-0.



**Figura N° 1. Estructura molecular del Deflazacort.** La siguiente figura muestra la estructura molecular del Deflazacort y su nomenclatura química es: 11beta, 21-Dihydroxy - 2'- methyl -5'-betaH-pregna - 1,4 - dieno [17,16-d] oxazole - 3,20 - dione 21- acetate. (The Index Merck, 2001).

El Deflazacort se presenta como un polvo blanco, fino, cuya absorptividad molar es 352,5; punto de fusión entre 252-258 °C, humedad menor a 1%, rotación específica entre +58.0° y +68.0°, solubilidad de 1% en acetonitrilo y metanol, 0.5 % cloroformo y 0.01% en agua. Debe mantenerse almacenado en envases bien cerrados a una temperatura de 25 °C. (The Index Merck, 2001).

El Deflazacort es un glucocorticoide con propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras indicado para el tratamiento de enfermedades alérgicas, reumáticas, dermatológicas, respiratorias, hematológicas, renales, neoplásicas y trasplantes. La dosificación recomendada en pacientes adultos va desde 120 mg hasta 18 g una vez al día. (Goodman y Gilman, 1991).

Se absorbe a nivel gastrointestinal, logrando altas concentraciones plasmáticas rápidamente, sufre metabolismo de primer paso, actuando sobre los receptores intracelulares aumentando o disminuyendo la síntesis proteica influyendo sobre el metabolismo de carbohidratos y proteínas; se elimina por vía renal (Goodman y Gilman, 1991).

A nivel del sistema nervioso central produce aumento del estado de ánimo, sensación de bienestar, cambios del comportamiento, euforia, insomnio, aumento de la actividad motora, ansiedad, depresión y psicosis (Goodman y Gilman, 1991). Se debe tener especial cuidado en pacientes diabéticos, hipertensos, con deficiencias renales y trastornos mentales. (Harrison, 2002).

En el mercado venezolano el Deflazacort existe, bajo el nombre comercial de Calcort® de 6 mg y 30 mg. El Deflazacort ha sido estudiado como materia prima, producto terminado y en diferentes matrices biológicas (Ver Tabla IV), utilizando la cromatografía líquida de alta eficiencia como método analítico; debido a que es una técnica precisa, exacta y confiable.

**Tabla IV. Condiciones cromatográficas de Deflazacort en diferentes matrices.** La tabla muestra las condiciones cromatográficas de los diferentes estudios realizados previamente con el Deflazacort

Referencia	Método	Columna	Fase móvil	Flujo (mL/min)	Temp (°C)	Longitud de onda (nm)	Observación
Santos y col (1994)	RP- HPLC	Columnas C18.	THF : Agua	NE	NE	NE	Metabolitos en orina
Bernareggi y col (1997)	RP- HPLC	Sep-Pak Plus C18	THF : Agua gradiente	NE	NE	NE	Mayor potencia que betametasona
Santos y col (1999)	RP- HPLC	C18 Hypersil 250 mm x 3.2 mm	BuOH: Agua (2:98).	0,5	NE	245	Metabolitos en orina
Santos y col (2007)	RP- HPLC	C18 Hypersil 250 mm x 3.2 mm	ACN: Agua (65:35).	1	30°C	245	Metabolitos en orina
Cardozo (2008)	Espectrofotometría UV	NA	NA	NA	NA	245	Análisis de Tabletas
Sperandeo (2009)	RP- HPLC	C18 Phenomenex 250mmx4.6mm,4.5um	MeOH: Agua (80:20).	0,8	20°C-25°C	245	Análisis de Tabletas
Piazzon (2010)	RP- HPLC	Columnas C18.	ACN: Agua (80:20).	1	NE	244	Análisis de Tabletas
	Colorimétrica, redox con azul tetrazolio en medio alcalino	NA	NA	NA	NA	244	Análisis de Tabletas
Patel (2011)	Espectrofotometría UV, usando MeOH como solvente	NA	NA	NA	NA	243	Análisis de Tabletas

Legenda: NA: no aplica; NE: no especifica; ACN: acetonitrilo; MeOH: metanol; BuOH: butanol; THF: tetrahidrofurano

Las metodologías analíticas señaladas en la Tabla IV, presentan ensayos de disolución de Tabletas, así como cuantificación de Deflazacort por cromatografía líquida de alta resolución y espectrofotometría UV-Vis.

Se han reportado ensayos de disolución desarrollados para diferentes principios activos y formas farmacéuticas en el postgrado de Aseguramiento de la Calidad de la Facultad de Farmacia de la UCV, utilizando como método para la cuantificación del analito de interés la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) acoplada a detector de arreglo regular de diodos. Adicionalmente se han reportado en la literatura el ensayo de disolución para las tabletas de Deflazacort en dos presentaciones (Ver tabla V).

**Tabla V. Condiciones finales en desarrollos de ensayos de disolución.** La tabla muestra las condiciones de ensayos de disolución de los diferentes fármacos y del deflazacort en tabletas.

Referencia	Aparato	Medio	Volumen (mL)	Velocidad (rpm)	Temperatura ( $^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ )	Método Analítico	Tiempo	Principio activo y forma farmacéutica
<b>Avilán (2004)</b>	5	NaCl 0,1N	500	50	32	RP-HPLC	3, 6, 9 y 12 horas	Nitroglicerina (Parches)
<b>Rodríguez y col (2005)</b>	2	Agua	900	75	37	RP-HPLC	60 min	Tetraciclina (Tabletas)
<b>Cardoso (2008)</b>	1 (Cap) 2 (Tab)	HCl 0,1N	900	50	37	Espectrofotometría UV 242 nm	30 min	Deflazacort 30 mg (Tabletas)
<b>Sperandeo (2009)</b>	2	HCl 0,1N	500	50	37	RP-HPLC	30 min	Deflazacort 6 mg (Tabletas)

Leyenda de Aparato: 1= cesta, 2= paleta, 5= paleta sobre disco.

Este trabajo presenta el desarrollo de un ensayo de disolución de Deflazacort en tabletas y su cuantificación por RP-HPLC con detección de diodos como indicador de calidad lote a lote, controlando el proceso de manufactura.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar el ensayo de disolución de Deflazacort en tabletas.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Adecuar la metodología analítica del fabricante de la materia prima, al ensayo de disolución para la cuantificación del Deflazacort.
2. Validar el método analítico para la determinación de Deflazacort siguiendo los parámetros establecidos por la USP 35 NF 30 y la Guía Q2 de la Conferencia Internacional de Armonización.
3. Determinar las condiciones del ensayo de disolución, para el Deflazacort en tabletas, de acuerdo a la Guía para la Industria Farmacéutica de la FDA y la USP 35 NF 30.
4. Evaluar distintas muestras de Deflazacort en tabletas utilizando el ensayo de disolución desarrollado, siguiendo los criterios de aceptación establecidos la USP 35 NF 30 para formas farmacéuticas sólidas de liberación inmediata.

### **3. Materiales y Métodos**

#### **3.1 Equipos:**

Equipo de cromatografía líquida Marca Waters con bomba 600E con inyector automático modelo 717 y detector de Arreglo de Fotodiodo modelo 996 acoplado a un computador personal con software Millennium 32® (Waters, Cienvar, Caracas-Vzla). Equipo para ensayo de disolución SRP8 plus acoplado a muestrador automático modelo DISSOETTE II (Hanson Research, Cienvar, Caracas-Vzla). Balanza analítica marca Ohaus modelo Adventurer TM (Científica Miranda, Caracas-Vzla). Balanza analítica Mettler Toledo AG245 (Científica Miranda, Caracas-Vzla). Potenciómetro marca Thermo modelo Orion 420 (Científica Miranda, Caracas-Vzla) Ultrasonido FS14H (Fisher Scientific, Científica Miranda, Caracas-Vzla). Equipo de Osmosis reversa cascada RO marca PALL® Ultrapure Water Purification Systems (Cienvar, Caracas-Vzla). Ultrapurificador de agua Nanopure (Barnstead) con filtro final de 0.22µ, Bomba de vacío Gasp (Científica Miranda, Caracas-Vzla).

#### **3.2 Materiales y Reactivos:**

Columna cromatográfica C18 Symmetry® 5µ 150 mm x 3.9 mm DI Lote N° 0224381191 (Marca Waters, Cienvar, Caracas-Vzla). Membranas de filtración tamaño de poro de 0,22 µm de Celulosa y 0.45 µm de Nylon (Advantec, Didacta, Caracas-Vzla.). Agua grado HPLC. Acido Clorhídrico (Riedel de Häen, Didacta, Caracas-Vzla). Fosfato dibásico de sodio trihidratado (Riedel de Häen, Didacta, Caracas-Vzla). Acido fosfórico (Merck, Didacta, Caracas-Vzla). Acetato

de sodio trihidratado (Riedel de Häen, Caracas-Vzla). Acido acético (Merck, Didacta, Caracas-Vzla). Dodecilsulfato de sodio (Merck, Didacta, Caracas-Vzla). Peróxido de Hidrógeno 35% (Riedel de Häen, Caracas-Vzla). Acetonitrilo grado HPLC (Merck, Caracas-Vzla). Bombona de helio (Airgas, Caracas-Vzla).

**Estándar de referencia:** Patrón secundario 99,2 % de pureza en base seca Lote No. 52-20090301 (Seletchemie, Calier, Caracas-Vzla) (Ver anexo certificado de calidad).

**Muestras:** Tabletas de Deflazacort preparadas por el Departamento de Investigación y Desarrollo de un Laboratorio Nacional, Caracas-Vzla.

Fórmula porcentual:

Deflazacort	6%
Diluyente A	45,75%
Diluyente B	45,75%
Desintegrante C	2%
Lubricante D	0,50%

Las especificaciones de las tabletas evaluadas fueron las siguientes:

- ✓ Aspecto: tabletas circulares, lisas, color blanco sin imperfecciones.
- ✓ Rango del Peso promedio: 87,00 mg y 97,00 mg.
- ✓ Peso promedio experimental según USP 35 NF 30: 93,15 mg.
- ✓ Dureza entre 3-5 Kp.
- ✓ Diámetro 0,6 mm +/- 0,05mm.
- ✓ Espesor entre 0,4 mm +/- 0,05mm.
- ✓ Friabilidad menor a 1%.
- ✓ Desintegración menor a 5 minutos, en agua a una temperatura de 37°C.

**Placebo:** Tabletas manufacturadas en el Departamento de Investigación y Desarrollo de un Laboratorio Nacional, Caracas-Vzla, con la siguiente fórmula maestra:

Deflazacort	0%
Diluyente A	48,75%
Diluyente B	48,75%
Desintegrante C	2%
Lubricante D	0,50%

**Muestras con defectos:** Tabletas manufacturadas en el Departamento de Investigación y desarrollo de un Laboratorio Nacional, Caracas-Vzla, con las siguientes fórmulas maestras.

**\*1** Doble del lubricante

Deflazacort	6%
Diluyente A	45,5%
Diluyente B	45,5%
Desintegrante C	2%
Lubricante D	1,0%

**\* 2** Durezas mayores a 5 Kp

Deflazacort	6%
Diluyente A	45,75%
Diluyente B	45,75%
Desintegrante C	2%
Lubricante D	0,50%

**\*3** Cambio del lubricante

Deflazacort	6%
Diluyente A	45,75%
Diluyente B	45,75%
Desintegrante C	2%
Lubricante E	0,50%

### 3.3. Metodología Analítica

#### 3.3.1 Preparación de las Tabletas

La formula maestra utilizada en la fabricación de las muestras fue la siguiente

Deflazacort	6%
Diluyente A	45,75%
Diluyente B	45,75%
Desintegrante C	2%
Lubricante D	0,50%

Se utilizó la técnica de manufactura a continuación, identificando los puntos críticos de control de la misma:

- Se verificó las pesadas de cada uno de los insumos según orden de producción (punto crítico de control).
- Se tamizó por malla N° 20 el 22,88 % del diluyente A y 22,88 % del diluyente B.
- Se mezcló por un lapso de 10 minutos.
- Se añadió el Deflazacort y se mezcló por 10 minutos (punto crítico de control).
- Se mezcló la segunda porción de diluyente B (22,88 %) previamente tamizado por malla N° 20 y la segunda porción de diluyente A (22,88 %) y se mezcló durante 10 minutos.
- Se pre mezcló el lubricante D, con el Desintegrante C.
- Se incorporó al resto de la mezcla y se agitó por 5 minutos.
- Se inició la compresión en punzones de 8 mm (punto crítico de control).

- Se recibió las tabletas en un contenedor adecuado, cerrándolo herméticamente e identificándolo adecuadamente.

Las especificaciones de las tabletas evaluadas fueron:

- Aspecto: tabletas circulares, lisas, color blanco, sin imperfecciones.
- Peso promedio entre 97,00 mg y 87,00mg.
- Peso promedio experimental según USP 35 NF 30 de 93.15 mg
- Dureza entre 3-5 Kp.
- Diámetro entre 0.6 mm +/- 0.05mm.
- Espesor entre 0.4 mm +/- 0.05mm.
- Friabilidad menor a 1%.
- Desintegración menor a 5 minutos, en agua a una temperatura de 37°C.

Adicionalmente fueron preparadas tabletas con especificaciones fuera de control tales como doble añadido del lubricante de la tableta, cambio de un excipiente y tabletas con una dureza superior a 5 Kp ( Ver fórmulas maestras \*1, \*2 y \*3); siguiendo la misma técnica de manufactura.

#### Fórmula Maestra \*1 Doble del lubricante

Deflazacort	6%
Diluyente A	45,5%
Diluyente B	45,5%
Desintegrante C	2%
Lubricante D	1,0%

**Fórmula Maestra \* 2** Durezas mayores a 5 Kp

Deflazacort	6%
Diluyente A	45,75%
Diluyente B	45,75%
Desintegrante C	2%
Lubricante D	0,50%

**Fórmula Maestra \*3** Cambio del lubricante

Deflazacort	6%
Diluyente A	45,75%
Diluyente B	45,75%
Desintegrante C	2%
Lubricante E	0,50%

### **3.3.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución**

#### **3.3.2.1. Preparación de la Fase Móvil**

La fase móvil se preparó mezclando acetonitrilo (ACN) con agua grado HPLC. Esta última se obtuvo a partir de un equipo Nanopure con resinas de intercambio iónico y filtro final de 0,22  $\mu$  alimentado con agua de osmosis reversa. La composición de la fase móvil fue ACN:H<sub>2</sub>O en diferentes proporciones (60:40), (50:50), (45:55), (40:60) y (30:70). La mezcla se filtró utilizando membrana de Nylon de 0,45  $\mu$  y se desgasificó mediante vacío con agitación por 15 minutos, luego ultrasonido por 10 minutos y finalmente burbujeo con helio durante 10 minutos.

#### **3.3.2.2. Preparación del Patrón de Deflazacort**

El patrón de Deflazacort fue suministrado por Selectchemie (Calier C.A, Caracas Venezuela), el cual declara 99,2 % de pureza en base seca. Se pesó una cantidad adecuada y se disolvió en ACN, para obtener una solución madre de una concentración de 1 mg/mL. Para la curva de calibración, se inyectaron diferentes volúmenes de la solución madre (Ver sección de resultados tabla N° VII). Las cantidades de Deflazacort de la curva de calibración son 10  $\mu$ g (10 $\mu$ L), 20  $\mu$ g (20 $\mu$ L), 45  $\mu$ g (45 $\mu$ L), 70  $\mu$ g (70 $\mu$ L), 100  $\mu$ g (100 $\mu$ L).

#### **3.3.2.3. Preparación de las Muestras para validación**

Para la preparación de las muestras se pesó una cantidad de polvo de tabletas equivalente a 10 mg de Deflazacort. Se agitó con ultrasonido por 15 minutos y



se diluyó con ACN hasta obtener una solución de aproximadamente 0,1mg/mL de Deflazacort.

#### **3.3.2.4. Procedimiento**

Las pruebas cromatográficas se iniciaron utilizando una columna Symmetry C18 5 $\mu$  (150mm x 4,6mm DI). Los análisis de Deflazacort por HPLC citados en la literatura (Ver sección de antecedentes tabla IV), reportan la caracterización del fármaco en formas farmacéuticas orales y matrices biológicas con condiciones cromatográficas similares, adicionalmente este principio activo no posee monografía oficial. Es por ello que se elige como referencia el método del proveedor de la materia prima ya que presenta buenos resultados en la identificación y cuantificación del activo con un tiempo de análisis corto. Las condiciones cromatográficas del método son Columna C18 Symmetry<sup>®</sup> 5 $\mu$  (150mm x 4,6mm DI), velocidad de flujo 1,5 ml/min, volumen de inyección 50  $\mu$ L, fase móvil ACN:H<sub>2</sub>O (60:40), longitud de onda de detección 244 nm, y tiempo de corrida de 3 minutos.

Basado en estas condiciones, se modificaron algunos parámetros a fin de mejorar la eficiencia del análisis del Deflazacort iniciando con el cambio de la velocidad de flujo de 1.5 mL/min a 1mL/min (Ver Sección de resultados, Figuras N°3 y N°4). Luego se evaluaron diferentes proporciones de ACN:H<sub>2</sub>O tales como (60:40), (50:50), (45:55), (40:60) y (30:70); con la finalidad de evaluar la fuerza del solvente obteniéndose como proporción final (45:55) (Ver Sección de resultados, Figura N° 5).

Los parámetros cromatográficos utilizados para la evaluación de las diferentes proporciones de fase móvil (FM) fueron factor de cola (T), factor de capacidad ( $k'$ ), platos teóricos (N) y el tiempo de retención ( $T_r$ ) para seleccionar las condiciones cromatográficas óptimas para el estudio del Deflazacort por HPLC (Ver sección de resultados tabla VI).

Se realizó la evaluación del espectro UV de Deflazacort para obtener la longitud de onda de máxima de absorción (Ver Sección de resultados, Figura N° 8) y se evaluó el pico cromatográfico para determinar la pureza espectral, utilizando el detector de arreglo de diodos. (Ver Sección de resultados, Figuras N° 4 y 6).

Las condiciones cromatográficas finales fueron:

- Columna C18 Symmetry® 5  $\mu$  (150mm x 4,6mm DI)
- Velocidad de flujo: 1 ml/min
- Volumen de inyección: 45  $\mu$ L
- Fase móvil: ACN:H<sub>2</sub>O (45:55)
- Longitud de onda de detección: 244 nm
- Tiempo de corrida: 5 minutos.

### 3.3.3. Validación de la Metodología Analítica:

#### 3.3.3.1. Procedimiento

La validación del método se realizó según la USP 35 NF 30 y la Guía Q2 de la Conferencia Internacional de Armonización. Los parámetros contemplados en la validación son los siguientes:

- **Especificidad:** Se preparó un placebo siguiendo la fórmula maestra y técnica de manufactura utilizada para la preparación de las tabletas de Deflazacort. (Ver sección 3.3.2.3. Preparación de las muestras para validación). La solución del placebo se realizó pesando una cantidad equivalente al peso de polvo de tabletas y enrasando con ACN a volumen. Luego se analizaron las soluciones del placebo y del placebo añadido con estándar de Deflazacort (1mg/mL) para evaluar los cromatogramas respectivos, a fin de obtener la longitud de onda de detección y la influencia del placebo sobre el pico cromatográfico (Ver Sección de resultados, Figura N° 9). Adicionalmente se evaluó la pureza espectral del pico cromatográfico de Deflazacort en el placebo con añadido de estándar para determinar diferencias espectrales entre el ápice y las zonas restantes del pico cromatográfico utilizando el detector de arreglo de diodos. (Ver sección de resultados Figura N° 10).

**Linealidad y Rango:** Para la construcción de la curva de calibración se utilizó el método de inyección de volúmenes diferentes de una solución de concentración fija. Este método permite caracterizar el sistema

automatizado ya que evalúa la variabilidad del volumen de inyección del sistema y la respuesta del detector. Adicionalmente, permite eliminar los errores de pesada y dilución en concentraciones muy bajas inherentes al analista que provocan alta variabilidad.

Para cada nivel de la curva de calibración se inyectó un volumen determinado de una solución estándar de Deflazacort de 0,1 mg/mL. La cantidad de Deflazacort en la muestra del ensayo de disolución a evaluar es la correspondiente al nivel intermedio de la curva de calibración. Este nivel se calculó tomando como referencia porcentajes de Q entre el 75 y el 80% del fármaco presente en la tableta, tal como lo establece la USP 35 NF 30 para diferentes glucocorticoides. El rango seleccionado para evaluar la linealidad fue entre 10 - 100 µg

El esquema de inyección para la curva de calibración, fue el siguiente:

- ✓ Nivel 1: Tres réplicas de 10µL (10µg).
- ✓ Nivel 2: Tres réplicas de 20µL (20µg).
- ✓ Nivel 3: Seis réplicas de 45µL (45µg).
- ✓ Nivel 4: Tres réplicas de 70µL (70µg).
- ✓ Nivel 5: Tres réplicas de 100µL (100µg).

Se realizaron dos curvas diarias durante tres días. Las áreas promedio del Deflazacort obtenidas se muestran en la Tabla VII de la sección de

resultados (Ver Anexos, Tabla XIV). Utilizando la dispersión de los datos promedios de las seis curvas de calibración, se obtuvo la ecuación de la línea recta, el coeficiente de regresión, el coeficiente de determinación y la pendiente (Ver Sección de Resultados, Figura N° 11).

- **Precisión del sistema cromatográfico:** Se determinó inyectando 6 replicas de 45µL correspondiente al nivel intermedio de la curva de calibración. Se determinó el promedio, la desviación estándar y la desviación estándar relativa del área de pico de Deflazacort (Ver Tabla VIII y Figura N° 12).
  
- **Exactitud y Precisión del Método:** se evaluó mediante 9 determinaciones de tres niveles de concentración preparados a partir de muestras de Deflazacort, las cuales se inyectaron por triplicado. Se determinó el peso promedio de 20 tabletas de acuerdo a lo establecido en la USP 35 NF30 (2012). Se prepararon según el siguiente esquema:
  - ✓ Se pesaron tres muestras alrededor de 24 mg de polvo de tabletas. En un balón de 10 mL se añadió fase móvil, se mezcló con vórtex por 5 minutos y ultrasonido por 10 minutos, se enrasó a volumen. Se filtró por membrana 0,45 µ descartando los primeros mL del filtrado. Se inyectó un volumen de 10 µL.
  
  - ✓ Se pesaron tres muestras alrededor de 55 mg de tabletas, y se procedió según técnica anteriormente descrita.

- ✓ Se pesaron tres muestras alrededor de 106 mg de tabletas, y se procedió según técnica anteriormente descrita.

Se calculó el promedio del porcentaje de recuperación del Deflazacort y se determinó la desviación estándar relativa (DER) para obtener la precisión del método (Ver Sección de Resultados, Tabla IX y Sección de Anexos Tabla XV).

▪ **Límite de Detección y Cuantificación:** Se obtuvieron de manera estadística y experimental. Para el cálculo estadístico se utilizaron las fórmulas descritas en la Guía Q2 de la Conferencia Internacional de Armonización (1994).

$$LC = y + \frac{10S}{b\sqrt{N}} \qquad LD = y + \frac{3S}{b\sqrt{N}}$$

Donde: **LC** y **LD** corresponden a los límites de cuantificación y detección respectivamente; **y**, es el promedio del intercepto de las 6 curvas de calibración; **S**, es la desviación promedio del intercepto; **b**, promedio de las pendientes y **N** el número de curvas.

Adicionalmente se obtuvieron ambos límites de manera experimental (Ver Sección de Resultados, Tabla X, Figuras N° 13 y 14), inyectando por triplicado las siguientes cantidades: 1µg; 0,5µg y 0,125µg; hasta obtener la señal/ruido correspondientes a los límites de detección y cuantificación.

- **Robustez:** La robustez del método analítico se evaluó realizando cambios en la velocidad de flujo y en la composición de la fase móvil. Los cambios realizados fueron +/- 0,2 mL/min en la velocidad de flujo y +/-2 % en la fase orgánica respectivamente (Ver Sección de resultados, Tabla XI).
  
- **Estabilidad:** Se prepararon seis muestras a partir de una solución madre de 1 mg/ml de estándar de Deflazacort con una concentración final de 0,0067 mg/ml. Se analizaron al tiempo cero y durante 48 horas posteriores a su preparación. Cada muestra fue tratada de la siguiente manera:
  - ✓ Muestra # 1: Se añadió 1mL de ácido clorhídrico al 37%, con la finalidad de evaluar hidrólisis ácida del Deflazacort, así como la inyección de ácido acético para verificar la desacetilación de la molécula por comparación de espectros (Ver Sección de resultados, Figuras N° 15 y 16).
  - ✓ Muestra # 2: Se añadió 1mL de hidróxido de sodio al 40%, con la finalidad de evaluar hidrólisis básica del Deflazacort (Ver Sección de resultados, Figura N° 17).
  - ✓ Muestra # 3: Se añadió 1mL de peróxido de hidrogeno al 35%, con la finalidad de evaluar oxidación del Deflazacort (Ver Sección de resultados, Figura N° 18).
  - ✓ Muestra # 4: Se sometió a 48 horas de luz Ultravioleta, con la finalidad de evaluar fotólisis del Deflazacort (Ver Sección de resultados, Figura N° 19).

- ✓ Muestra #5: Se sometió a tres ciclos de congelación y descongelación, con la finalidad de evaluar degradación de la muestra en condiciones extremas de frío (Ver Sección de resultados, Figura N° 20).
- ✓ Muestra # 6: Se colocó en el mesón de trabajo a temperatura ambiente por 5 días (Ver Sección de resultados, Tabla XII).
  
- **Adecuación del Sistema:** Se inyectaron 6 replicas consecutivas de 45 µL (45µg) correspondiente al nivel intermedio de la curva estándar de Deflazacort. Utilizando el programa Millenium<sup>®</sup> 32 de Waters se obtuvieron los valores de número de platos teóricos (N), Factor de Capacidad (K'), Factor de cola (T) y tiempo de retención (Tr) del Deflazacort (Ver sección de resultados, Tabla XIII y Figura N° 21). La adecuación del sistema se realizó y los parámetros cromatográficos se verificaron durante el análisis de las muestras de disolución.



### **3.3.4. Desarrollo del ensayo de disolución**

#### **3.3.4.1. Procedimiento**

El desarrollo del ensayo de disolución se realizó según la Sección <1088> de la USP 35 NF 30 (2012) y de acuerdo a la Guía para la Industria Farmacéutica de la FDA (1997) en un equipo SR 8 plus de ocho vasos de 1L de capacidad acoplado a equipo de muestreo automático modelo DISSOETTE II, ambos Hanson Research. Se configuró el sistema con el aparato N° 2 (paletas) y un volumen de medio 900 mL.

Se evaluaron distintas condiciones del ensayo de disolución tales como:

- 1) Velocidades de 50, 75 y 100 revoluciones por minuto (rpm).
- 2) Medios de disolución: ácido clorhídrico 0.1N, agua, buffer fosfato de sodio pH 6.8 y buffer acetato de sodio pH 4.6.
- 3) Medios de disolución con añadido de surfactante en diferentes concentraciones: ácido clorhídrico 0.1N con 0,3% de dodecilsulfato de sodio (SDS), agua con 0,3% SDS, agua con 0,2% SDS, agua con 0,1% SDS.

Los medios de disolución se prepararon y se desgasificaron mediante vacío por 15 minutos, ultrasonido durante 10 minutos y se mantuvieron a  $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Para los medios con surfactante se utilizó el procedimiento anterior sin agitación para evitar la formación de espuma. El volumen de muestra fue de 10 mL utilizando el automuestreador a los 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 y 60 minutos, sin

reposición de medio. El tiempo de toma de muestra, enrase y dispensación fue el mínimo necesario con la finalidad de disminuir la formación de espuma.

Las muestras fueron llevadas al equipo de cromatografía, y analizadas con las condiciones cromatográficas desarrolladas y validadas previamente en este trabajo (Ver Sección de Metodología N° 3.3.2.4. Procedimiento y de Resultados N° 4.1).

Para tabletas de liberación inmediata, el 80% del fármaco debe estar disuelto entre 15 y 30 minutos. Se consideró construir el perfil de disolución con mas 5 puntos de muestreo, para la buena caracterización del fármaco. Para cada ensayo se calculó el porcentaje de fármaco disuelto en cada punto de muestreo y se graficaron contra los tiempos para caracterizar adecuadamente el perfil de disolución.

La fórmula para calcular de porcentaje disuelto de Deflazacort (Q) fue la siguiente:

$$Q = \left( \frac{Am}{Ap} \right) \times Cp \times Vx \frac{100}{d}$$

En donde Am, es área promedio del Deflazacort en la muestra; Ap, es área promedio en el patrón; Cp es la concentración del patrón en mg/mL; V, es el volumen del medio de disolución y d, la cantidad declarada en mg del principio activo en la tableta. Se realizó la corrección de volumen para cada punto debido

a la toma de 10 mL de muestra sin reposición de medio. Para cada tiempo de muestreo, se determinó el valor promedio del área del pico de Deflazacort de dos inyecciones de cada muestra. La cantidad de principio disuelto se determinó extrapolando en la curva de calibración los valores promedio de área de la muestra (Ver Sección de Anexos, Tablas XVI, XVII, XVIII, XIX, XX, XXI y XXII).

Se realizaron 19 perfiles en diferentes medios y se compararon para obtener las condiciones del ensayo de disolución adecuado para la evaluación de la calidad del Deflazacort tabletas (Ver Sección de Resultados Figuras N° 22, 24, 25 y 26).

Luego de obtener las condiciones finales del ensayo de disolución, con la finalidad de retar el ensayo de disolución previamente desarrollado, se realizaron 3 ensayos en tabletas previamente preparadas con distintos defectos (Ver Sección Metodología Analítica 3.3.1 Preparación de las tabletas) conjuntamente con tabletas con proceso de manufactura controlado (Ver Sección de resultados, Figura N° 27).

Esta prueba se realizó con la finalidad de verificar que el medio de disolución y velocidad de agitación escogidas como condiciones finales serían capaces de discriminar entre tabletas fabricadas de forma distinta a las descritas en la fórmula maestra y técnica de manufactura.

Las condiciones finales del ensayo de disolución fueron:

- Aparato: 2 (paletas).
- Velocidad: 50 rpm (+/-4 rpm).
- Medio de disolución: Agua 0.1% de SDS.
- Temperatura 37°C(+/-0,5 °C).
- Volumen: 900 mL.
- Tiempo: 30 minutos.
- Tolerancia (Q): mayor al 75%.

### **3.5 Ensayo de disolución de diferentes tabletas de Deflazacort**

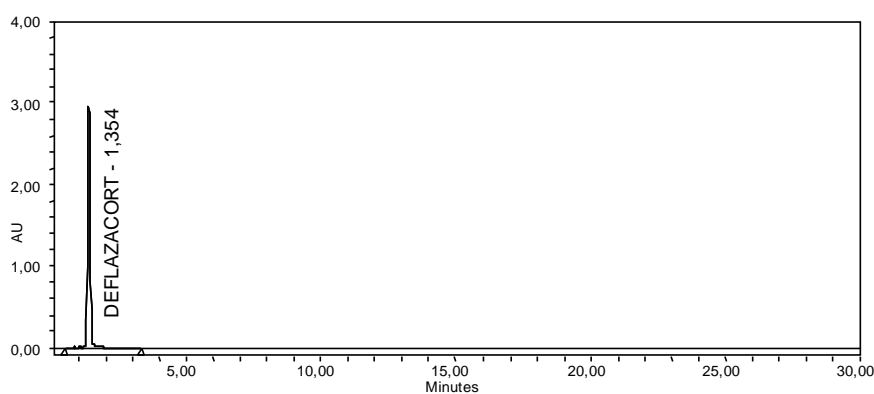
Siguiendo los criterios de aceptación establecidos la USP 35 NF30 para formas farmacéuticas sólidas de liberación inmediata (Ver Sección de Antecedentes Tabla II), se evaluaron 24 tabletas de Deflazacort 6 mg preparadas en el Departamento de Investigación y Desarrollo de un Laboratorio Nacional dentro de las especificaciones previamente descritas y 6 tabletas de Calcort<sup>®</sup> 6mg (innovador) comercializada en Venezuela bajo las condiciones finales del ensayo de disolución desarrollado.

Las muestras fueron filtradas y analizadas bajo las condiciones cromatográficas desarrolladas y validadas previamente en este trabajo (Ver Sección de Resultados, Figuras N°27 y 28 y Sección de Anexos, Tablas XXIV y XXV).

## 4. Resultados y Discusión.

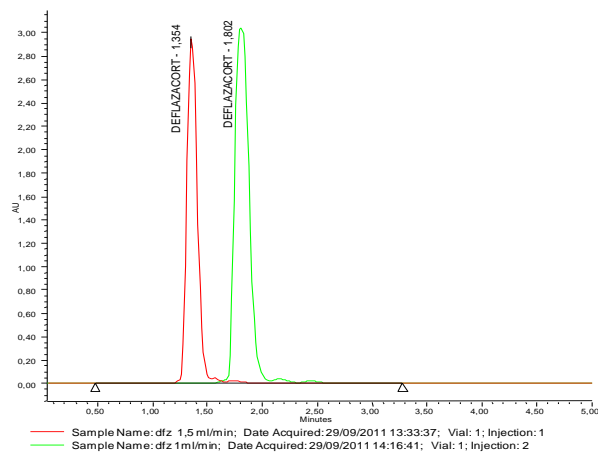
### 4.1. Método Cromatográfico

En la Figura N° 2 se muestra el cromatograma obtenido utilizando el método suministrado por el proveedor para la determinación del contenido de Deflazacort en la materia prima, el cual utiliza como fase móvil ACN:H<sub>2</sub>O (60:40) con flujo de 1,5 mL/min, Columna C<sub>18</sub>, volumen de inyección de 20 µl, a una longitud de onda de 254 nm, con un tiempo de corrida de 30 minutos y un tiempo de retención de 1,3 minutos.



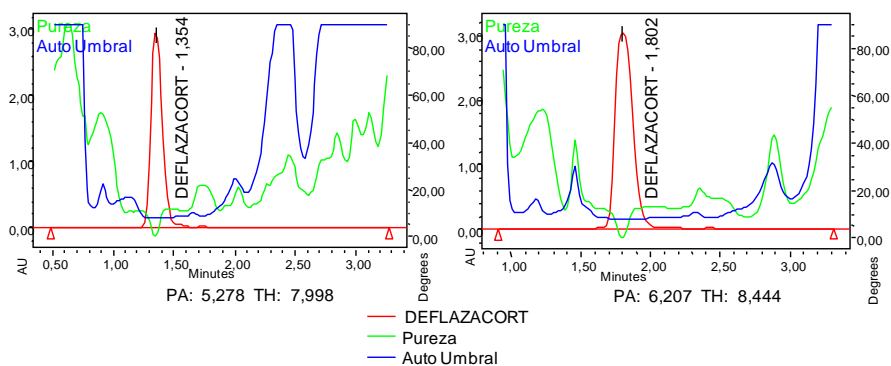
**Figura N° 2 Cromatograma obtenido utilizando el método descrito por el fabricante para el análisis de Deflazacort.** El cromatograma se obtuvo utilizando como fase móvil ACN:H<sub>2</sub>O (60:40) con flujo de 1,5 mL/min, volumen de inyección de 20µl, en una columna Symmetry® C18 de 5 µ, a una longitud de onda de 254 nm.

Los valores para la adecuación del sistema obtenidos fueron, un N = 1000; T de 1,29; un K' de 1,7 y Tr de 1,3 minutos. La velocidad de flujo se disminuyó de 1,5 mL/min a 1,0 mL/min con la finalidad de alejar el pico cromatográfico de Deflazacort del frente del solvente y se evaluó la pureza espectral del mismo (Ver Figura N° 3).



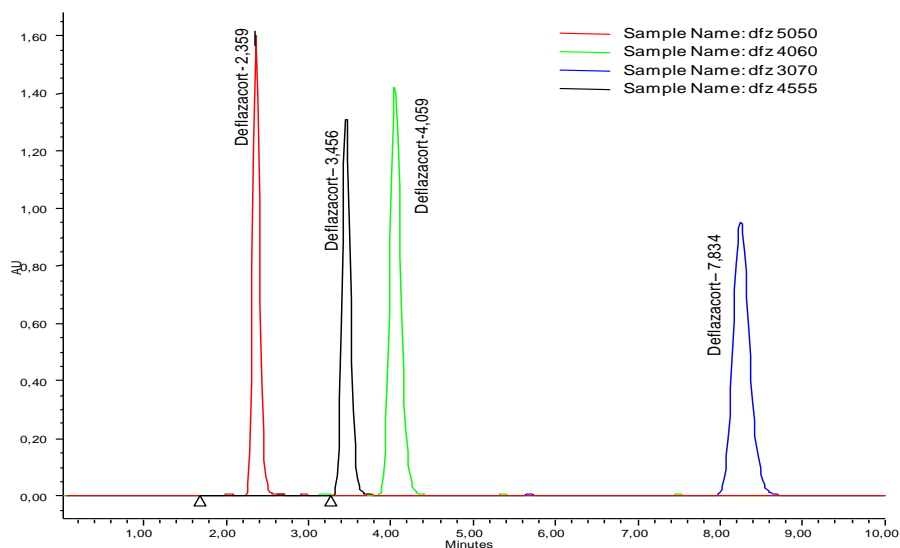
**Figura N°. 3 Cromatograma obtenido utilizando un flujo de 1,5 y 1,0 mL/min con condiciones cromatográficas sugeridas por el fabricante.** Se muestra en la figura el cromatograma obtenido con el proveedor a diferentes flujos de fase móvil 1,5 mL/min (rojo) a 1,0 mL/min (verde) alejando el pico cromatográfico de Deflazacort del frente del solvente.

Se logró mejorar la eficiencia del proceso cromatográfico obteniendo un  $N = 2600$ ;  $T = 1,22$ ;  $K' = 2,6$  y  $T_r$  de 1,8 minutos. Los gráficos de pureza obtenidos demuestran un ángulo de pureza menor al umbral solo en el ápice del pico donde la concentración del Deflazacort es mayor. En el resto del área se observa la línea del umbral por encima de la pureza, lo que sugiere interferencia debida al frente de solvente (Ver Figura N° 4).



**Figura N°. 4 Gráficos de Pureza obtenidos para el Deflazacort a flujos de 1,5 y 1,0 mL/min con condiciones cromatográficas del fabricante de la materia prima.** Se muestran los valores del ángulo de pureza (PA) y del umbral (TH) para ambos cromatogramas.

Con la finalidad de seguir mejorando la cromatografía, se evaluaron diferentes proporciones de la fase móvil (Ver Figuras N° 5, 6 y Tabla VI).



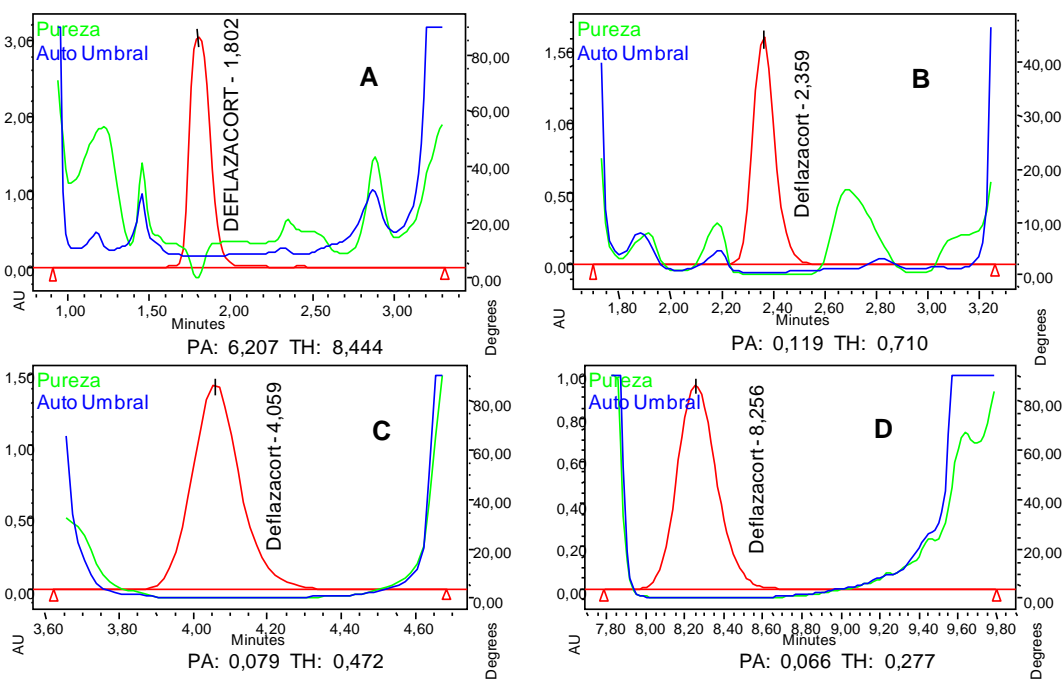
**Figura N° 5** Cromatogramas de Deflazacort obtenidos de la evaluación de la fuerza del solvente con flujo de 1,0 mL/min. Se muestran los cromatogramas obtenidos con variaciones en la proporción de Acetonitrilo al 50 %,40 %,30 % y 45%, de la fase móvil (ACN:H<sub>2</sub>O) a flujo de 1mL/min.

Para lograr una evaluación completa de la fuerza de solvente para el análisis de Deflazacort, se compararon los parámetros cromatográficos de los cuatro sistemas planteados obteniendo los valores para Tr, T, K' y N (Ver Tabla VI).

**Tabla VI.** Comparación de parámetros cromatográficos evaluando la fuerza del solvente con las diferentes mezclas de ACN y H<sub>2</sub>O en Deflazacort. Se muestran los valores de los parámetros cromatográficos para cada fase móvil evaluada.

FM (ACN:H <sub>2</sub> O)	Tr (min)	T	K'	N
<b>30:70</b>	8,2	1,13	6,83	6540
<b>40:60</b>	4,0	1,14	7,11	4720
<b>45:55</b>	3,4	1,12	5,91	5000
<b>50:50</b>	2,3	1,14	3,71	3430

Adicionalmente se realizó la comparación de los ángulos de pureza obtenidos para las fases móviles evaluadas (Figura N° 6).



**Figura N°. 6 Gráficos de Pureza de Cromatogramas de Deflazacort obtenidos de la evaluación de la fuerza del solvente.** Se muestra los cromatogramas obtenidos con variaciones en la fase orgánica de la fase móvil (ACN:H<sub>2</sub>O). Siendo **A** (60:40), **B**: (50:50), **C** (45:55) y **D** (30:70).

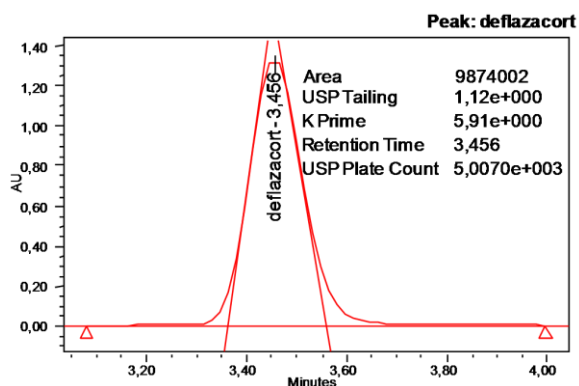
Luego de realizar la comparación de los parámetros cromatográficos de los sistemas evaluados y la pureza espectral de cada uno, se encontró que en la fase móvil sugerida por el proveedor ACN:H<sub>2</sub>O (60:40), presentó un ángulo de pureza (PA) de 6,207 (Umbral 8,444) valores muy altos que indican falta de pureza espectral y sugieren posible interferencia de solvente o coelución de otra sustancia; al disminuir en un 10% la fase orgánica de la fase móvil ACN:H<sub>2</sub>O (50:50), se obtiene un ángulo de pureza de 0,119 (Umbral 0,710) dentro del área cromatográfica. Luego se disminuyó la proporción de la fase orgánica



ACN:H<sub>2</sub>O (45:55), obteniéndose un ángulo de pureza de 0,079 (Umbral 0,472) y en la última proporción evaluada ACN:H<sub>2</sub>O (30:70) se mantuvo la pureza espectral con PA 0,066 (Umbral 0,277).

Se observó que a menor proporción de fase orgánica en la fase móvil, el ángulo de pureza es menor que el ángulo del umbral a lo largo del toda el área del pico cromatográfico lo que sugiere pureza espectral y permite descartar la coelución de algún interferente.

Se seleccionó la proporción de fase móvil de 45:55 de ACN:H<sub>2</sub>O, ya que permitió obtener un cromatograma que cumple con todos los parámetros cromatográficos para la adecuación del sistema y la pureza del pico proporcionando un buen ensayo cromatográfico para la cuantificación del Deflazacort (Ver Figura N° 7) (Regnault, 2005).

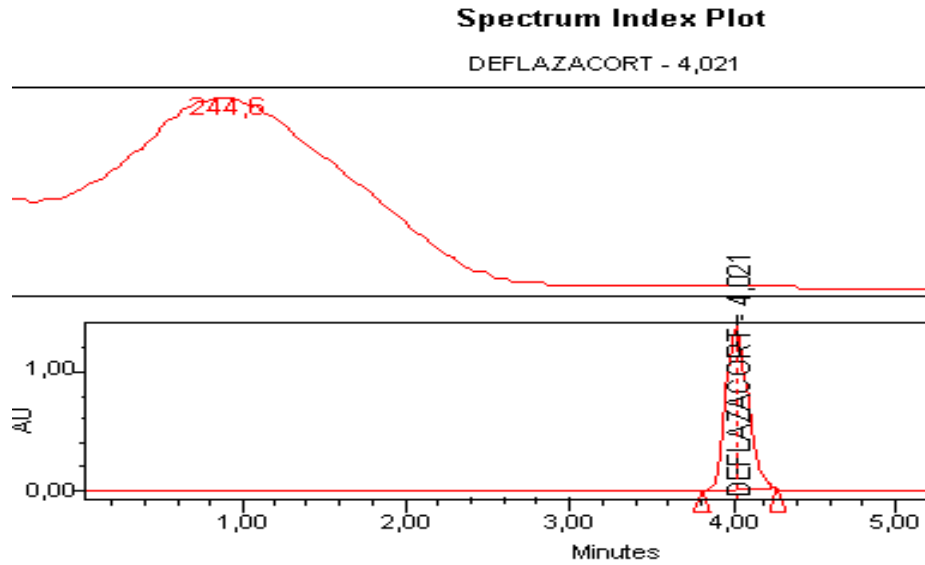


**Figura N° 7 Integración del pico de Deflazacort y parámetros de la adecuación del sistema para las condiciones cromatográficas seleccionadas.** Se muestra la integración del cromatograma obtenido y la adecuación del sistema con las condiciones finales del ensayo de Deflazacort: Columna C18 Symmetry® 5 µ (3,9 nm D.I. x 150 nm), Velocidad de flujo 1 ml/min, Volumen de inyección: 15 µL, Fase móvil ACN:H<sub>2</sub>O (45:55) y una longitud de onda de detección: 244 nm

Lo antes expuesto queda corroborado por los siguientes hechos:

- ✓  $T_r = 3,4$  minutos, ideal para la cuantificación de un solo principio activo y un análisis rápido a bajas concentraciones.  $T_r$  menores a 2 minutos no permite evaluar el analito de interés debido a la interferencia del frente de solvente demostrado en el análisis de pureza espectral.
- ✓  $T = 1,12$  este valor demuestra que existe un buen equilibrio del analito entre las fases estacionaria y móvil, permitiendo obtener un pico cromatográfico simétrico, logrando una excelente integración para obtener la mayor área del mismo contribuyendo con una cuantificación exacta.
- ✓  $K' = 5,91$  es un valor adecuado que indica la interacción entre analito y fase estacionaria, ya que valores muy altos de  $K'$  elevan el tiempo de corrida y produce bandas más anchas las cuales interfieren en la cuantificación y en la exactitud del método.
- ✓  $N = 5000$ , lo cual demuestra la eficiencia de la columna relacionándose directamente a las condiciones experimentales y parámetros de operación adecuados para el propósito del método propuesto (Ver Figura N° 7).

Adicionalmente se evaluó el espectro del Deflazacort obtenido por el detector de arreglo de diodo con la finalidad de verificar la longitud de onda de máxima absorción, obteniéndose un valor de 244,6 nm; seleccionando una de  $\lambda = 244$  nm como longitud de detección. (Ver Figura N° 8).



**Figura No. 8 Cromatograma y espectro obtenido con las condiciones seleccionadas.** Se muestra en la figura el cromatograma y el espectro de Deflazacort obtenido en el ápice del pico bajo las condiciones finales.

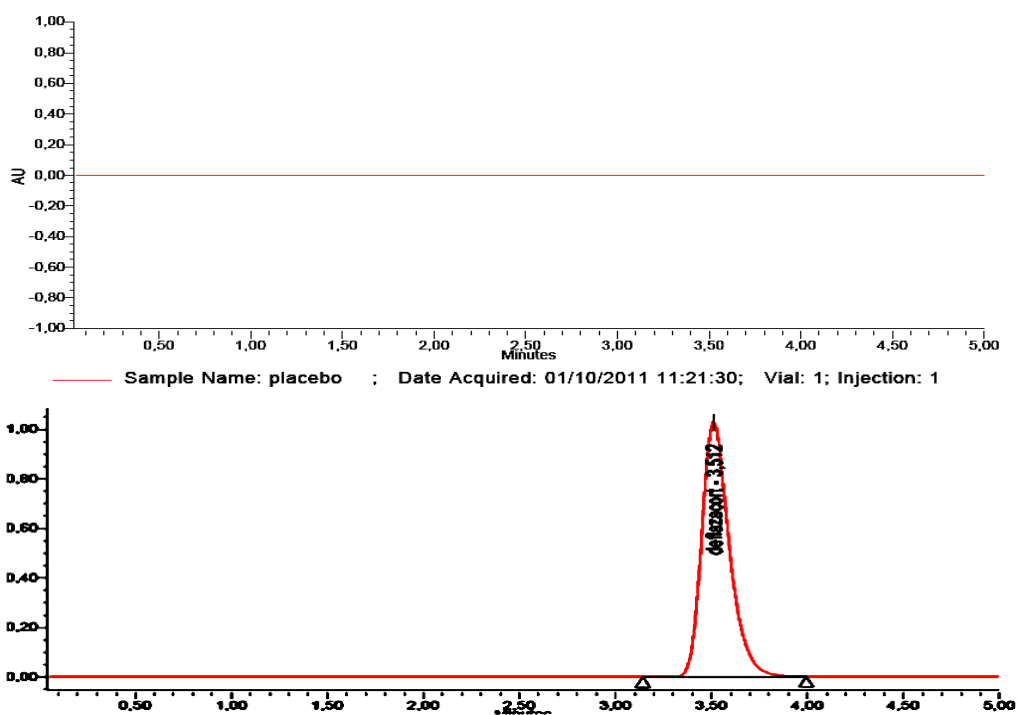
Las condiciones cromatográficas finales para la cuantificación de Deflazacort fueron las siguientes:

- ✓ Columna C18 Symmetry<sup>®</sup> 5  $\mu$  (3,9 nm D.I. x 150 nm),
- ✓ Velocidad de flujo: 1 ml/min,
- ✓ Volumen de inyección: 45  $\mu$ L,
- ✓ Fase móvil ACN:H<sub>2</sub>O (45:55)
- ✓ Longitud de onda de detección: 244 nm,
- ✓ Tiempo de corrida de 5 minutos.

## 4.2. Validación del Método Cromatográfico

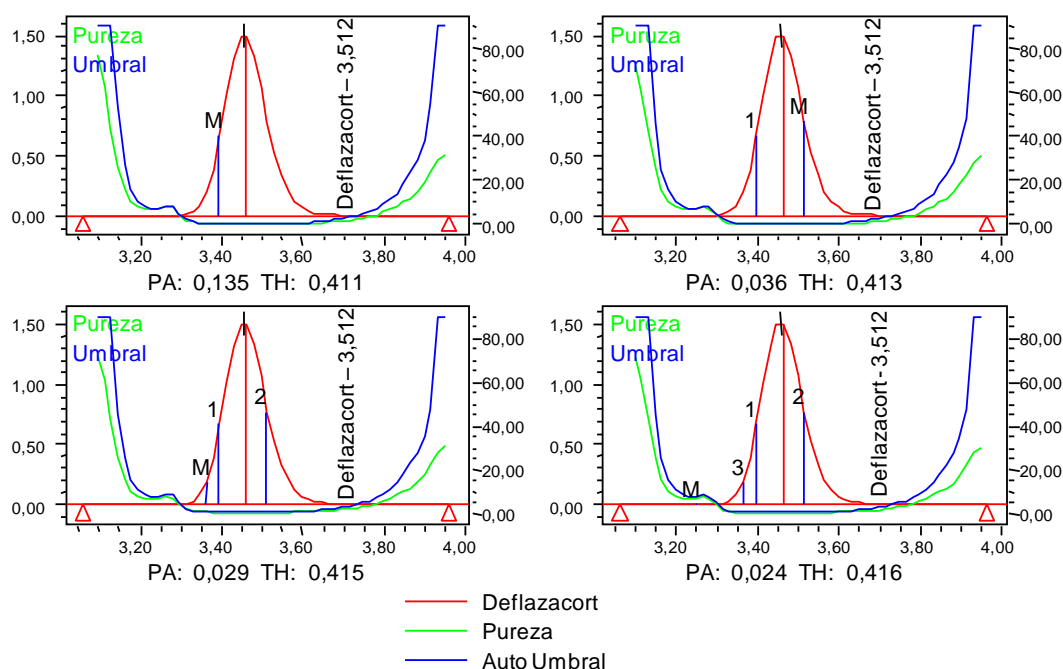
Una vez desarrollado el método, se procedió a la validación del mismo conforme a la metodología descrita anteriormente (Ver Sección de Materiales y Métodos, 3.3.2.3. Procedimiento).

- **Especificidad:** Se evaluó el placebo y placebo con añadido de estándar de Deflazacort para determinar si el placebo no produce interferencia detectable al Tr del analito de interés y de existir alguna señal sólo se deba a la presencia del Deflazacort (Ver Figura N° 9). Se demostró que no existe interferencia de la matriz de la muestra logrando un método cromatográfico selectivo, ya que los excipientes de la formulación no interfieren en la determinación del Deflazacort.



**Figura N° 9** Cromatogramas del placebo y del placebo añadido con estándar de Deflazacort. Se muestra en la figura el cromatograma obtenido del placebo y luego del añadido de Deflazacort.

Luego se evaluó la pureza espectral del placebo con añadido de estándar de Deflazacort (1mg/ml), con la finalidad de determinar si existía interferencia por parte del placebo sobre la señal del Deflazacort. Se realizaron cuatro evaluaciones para comprobar si existían diferencias espectrales a lo largo del pico cromatográfico. (Ver Figura N° 10).



**Figura No. 10. Grafico de pureza del pico cromatográfico de Deflazacort.** Muestra los ángulos de pureza del pico obtenido por el detector de diodos, con las condiciones finales.

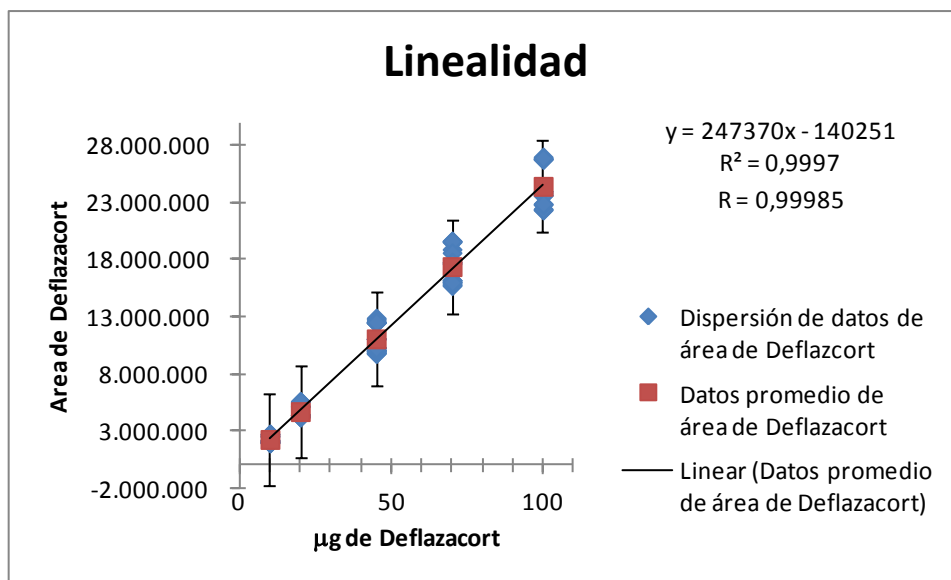
Los ángulos de pureza (PA) obtenidos para las 4 evaluaciones fueron 0,135 (Umbral 0,411); 0,036 (Umbral 0,413); 0,029 (Umbral 0,415) y 0,024 (Umbral 0,416) respectivamente. Se observa que en todas las evaluaciones, el ángulo de pureza es menor que el ángulo del umbral indicando que no existe diferencia espectral en el pico cromatográfico. Adicionalmente, se revisó el “*cutoff*” declarado por el fabricante del ACN utilizado en el análisis, el cual reportó entre

0,005 UA ( $\lambda_{254}$ ) y 0,009 UA ( $\lambda_{230}$ ), valores que no afectan significativamente la lectura del analito de interés. Esto permite afirmar que el pico cromatográfico de Deflazacort es puro y que el método es específico para su cuantificación.

**Linealidad y Rango:** Se obtuvieron seis curvas de calibración (dos diarias durante tres días) para evaluar la linealidad y rango. Se inyectaron 3 replicas de 4 niveles de la curva y 6 réplicas del nivel intermedio de concentración. La ecuación de la línea recta obtenida fue  $y = 247370x - 140251$  con un valor de pendiente de 247370, intercepto de 140251, coeficiente de correlación (r) de 0,99985 y un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0,9997 (Ver Tabla VII y Figura N° 11).

**Tabla VII. Datos de la curva de calibración.** Los datos presentados se refieren a las áreas del pico de Deflazacort obtenido en las 6 curvas de calibración.

ug/mL	día 1 am	día 1 pm	día 2 am	día 2 pm	día 3 am	día 3 pm
10	2.564.858,00	2.741.100,66	2.217.606,00	1.994.196,00	2.102.984,67	2.071.312,67
20	5.184.134,67	5.603.527,66	4.437.134,67	4.252.024,67	4.409.201,67	4.417.223,67
45	12.659.083,67	12.522.347,33	11.085.710,00	9.857.671,70	10.066.634,33	10.296.895,00
70	19.602.552,00	19.042.507,00	17.725.493,00	16.200.846,70	15.799.023,33	16.029.765,67
100	26.879.464,00	26.828.102,00	23.926.077,67	23.642.773,00	22.398.398,33	22.858.434,33



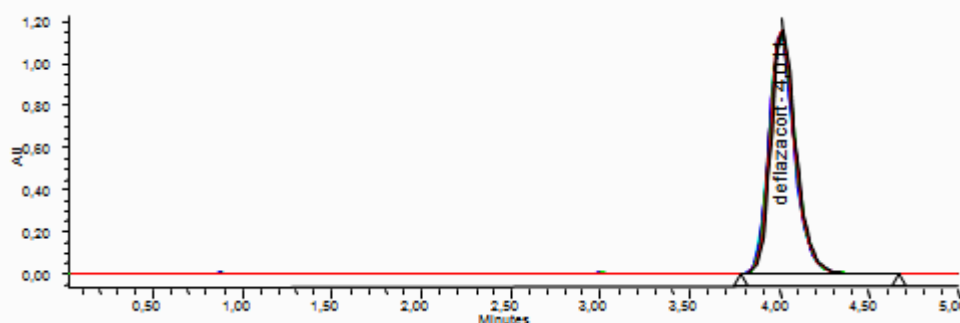
**Figura No. 11 Curva de calibración promedio de Deflazacort.** Se muestra en la figura la pendiente obtenida con los datos promedios de las 6 curvas de calibración.

El sistema cromatográfico propuesto es lineal para la determinación de Deflazacort en un rango entre 10 – 100 µg, cumpliendo con los límites establecidos por la USP 35 NF 30 y de la Guía Q2 de la Conferencia Internacional de Armonización que señalan para los coeficientes de correlación ( $r = 0,99 - 0,9999$ ) y determinación ( $r^2 = 0.98 - 1.00$ ).

- **Precisión del sistema cromatográfico:** se evaluaron seis replicas del nivel intermedio (45µg) de las seis curvas de calibración de una solución estándar de Deflazacort de 1 mg/mL. Se calculó la desviación estándar relativa de las áreas del pico cromatográfico para el conjunto de valores obtenidos para las seis curvas. En todos los casos se obtuvo un valor menor al 2% en desviación estándar relativa para la repetitividad, cumpliendo con el límite establecido por la USP. (Ver tabla VIII y Figura N° 12).

**Tabla VIII. Datos de la precisión del sistema cromatográfico.** Los datos contenidos se refieren a las áreas del pico de Deflazacort.

45 µg	Día 1 am	Día 1 pm	Día 2 am	Día 2 pm	Día 3 am	Día 3 pm
Nivel intermedio de la curva de calibración	12.902.948	11.098.312	10.050.627	12.525.784	9.911.018	10.222.913
	12.818.325	11.070.498	10.082.696	12.525.827	9.813.958	10.321.972
	12.681.422	11.091.003	10.070.889	12.491.079	9.820.599	10.316.348
	12.534.944	11.075.421	10.048.131	12.535.895	9.910.020	10.342.963
	12.525.784	11.083.479	10.068.774	12.524.775	9.815.847	10.288.587
	12.491.079	11.095.547	10.078.689	12.530.784	9.870.961	10.288.587
<b>Promedio</b>	12.659.084	11.085.710	10.066.634	12.522.357	9.857.067	10.296.895
<b>Desv Std</b>	156381,82	10213,0525	13067,648	14504,23507	42416,9053	38168,3067
<b>DSR</b>	<b>1,23533286</b>	<b>0,09212809</b>	<b>0,12981149</b>	<b>0,115826714</b>	<b>0,43031974</b>	<b>0,37067783</b>



**Figura N° 12. Cromatogramas superpuestos demostrando la precisión del sistema cromatográfico.** Se muestran los cromatogramas superpuestos del nivel intermedio de la curva de calibración.

- **Exactitud del método:** La exactitud del método se determinó calculando el porcentaje de recuperación de 9 muestras de 3 niveles de concentración (80%, 100% y 120%) inyectadas por triplicado durante tres días (Ver Tabla IX).

Los porcentajes de recuperación diarios fueron 99,93 ; 101,38 y 102,48 % con DSR de 0,93; 2,77 y 2,40% respectivamente. La USP 35 establece que el contenido de esteroides en tabletas no debe ser menor al 90,00% y no mayor al 110,00%. Los resultados muestran un promedio del porcentaje de



recuperación de 101,27 % de Deflazacort con una desviación estándar relativa de 2,48 % lo que demuestra que el método es exacto, preciso y reproducible.

**Tabla IX. Exactitud del método analítico.** Se muestran los resultados del porcentaje de recuperación del Deflazacort realizada en tres días diferentes.

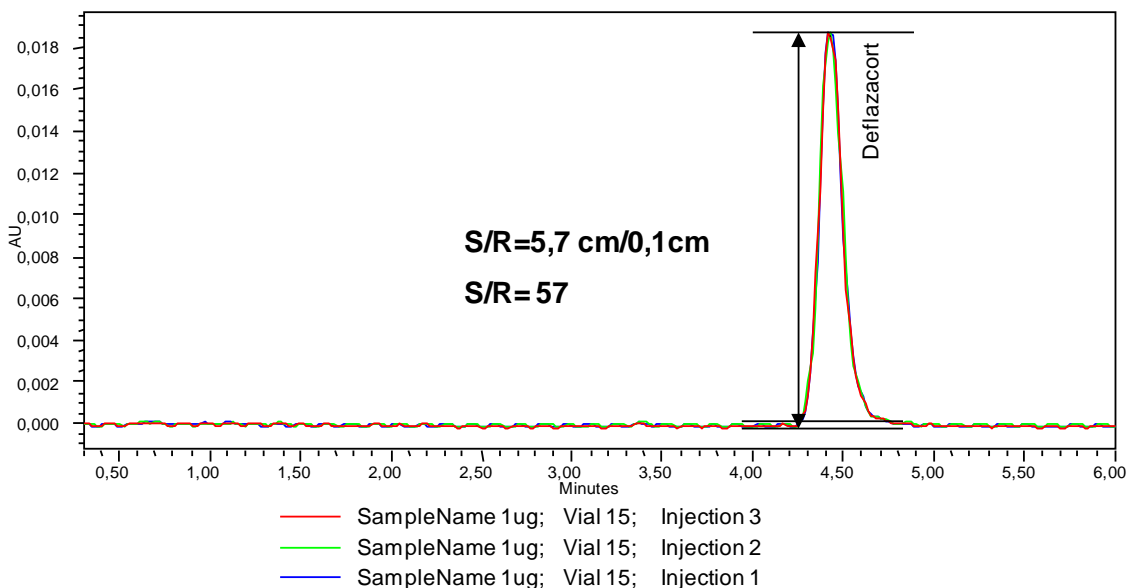
Porcentaje de Recuperación	Día 1	Día 2	Día 3
	99,14	99,17	102,98
	99,53	100,49	103,93
	99,91	100,14	103,08
	99,12	102,08	105,71
	99,26	100,10	103,70
	99,57	107,40	103,30
	100,07	102,77	96,96
	100,83	97,66	101,47
	101,95	102,63	101,21
<b>Promedio</b>	99,93	101,38	102,48
<b>Desv Std</b>	0,93	2,81	2,46
<b>DSR</b>	0,93	2,77	2,40
<b>Exactitud y Precisión del Método</b>	<b>Promedio</b>	<b>101,27</b>	
	<b>Desv Std</b>	<b>2,51</b>	
	<b>DSR</b>	<b>2,48</b>	

- **Límite de Detección y Cuantificación:** se determinaron mediante dos métodos distintos, en primer término se utilizó el método estadístico determinando la desviación estándar de los valores de intercepto de 6 curvas de calibración aplicando las fórmulas descritas en la sección 3.3.3.1 de Materiales y Métodos, obteniéndose como resultados un LD calculado de 0,22 µg y LC 2,23 µg.

Posteriormente de manera experimental se determinaron ambos valores realizando inyecciones consecutivas por triplicado de diluciones del nivel más bajo de la curva de calibración. El LC tiene como requisito un valor de relación

señal/ruido (S/R) igual o mayor a 10 con exactitud y precisión según lo establecido por la USP 35 NF 30, y el LD debe cumplir con una S/R = 3.

El valor experimental obtenido para LC = 1 µg (S/R = 57, DSR = 0,3 % y 109% de Deflazacort recuperado) (Ver Figura N° 13 y Tabla X).

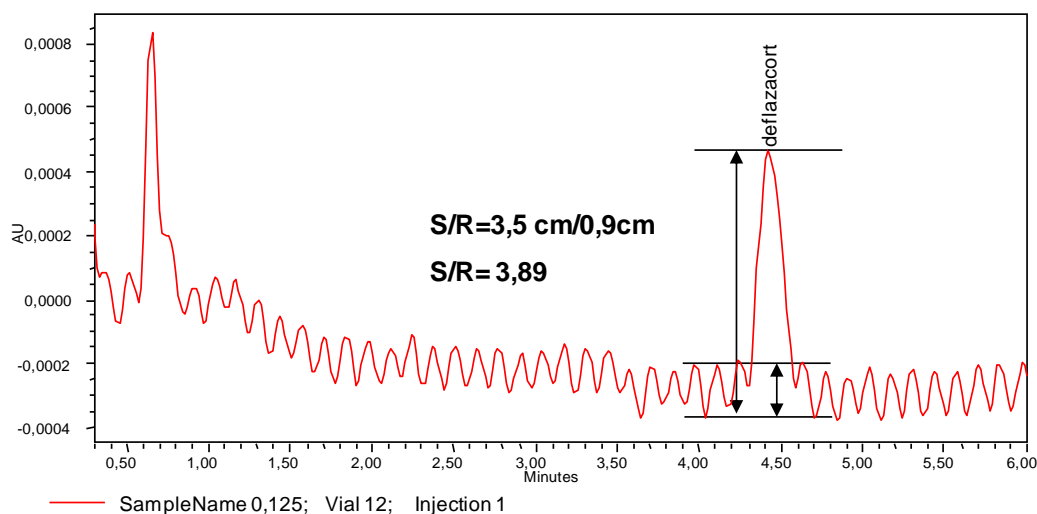


**Figura N° 13. Limite de cuantificación concentración de 1 µg/mL.** Se muestra en figura las tres inyecciones realizadas en el límite de cuantificación.

**Tabla X. Resultados obtenidos experimentalmente en tres replicas de una dilución de una muestra que en el límite de cuantificación.** Se muestra en la tabla las tres inyecciones realizadas en el límite de cuantificación.

Component Summary For Area				
	SampleName	Vial	Inj	deflazacort (µV*sec)
1	1ug	15	1	176583
2	1ug	15	2	175797
3	1ug	15	3	176732
Mean				176370,6
Std. Dev.				502,2
% RSD				0,3

El valor obtenido experimentalmente para el LD fue 0,125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $S/R = 3,89$ ) (Ver Figura N° 14), cumpliendo así con las exigencias establecidas por la USP 35.



**Figura N° 14. Limite de detección concentración de 0,125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .** Se muestra en figura las tres inyecciones realizadas en el límite de detección.

Se observó que los resultados obtenidos por ambos métodos fueron muy similares, los valores obtenidos experimentalmente fueron menores que los obtenidos de forma estadística lo que confirma los límites seleccionados para la cuantificación del Deflazacort.

- **Robustez:** Se evaluaron pequeñas variaciones en proporción y velocidad de flujo. Al realizar variaciones de  $\pm 0,2$  ml/min en la velocidad de flujo y  $\pm 2\%$  en la proporción de solvente orgánico de la fase móvil, no se observaron cambios significativos en los resultados, demostrando así que los pequeños

cambios en estos parámetros no afecta el análisis, demostrando robustez ante cambios de orden rutinario en el análisis. Los resultados obtenidos se indican en la Tabla XI.

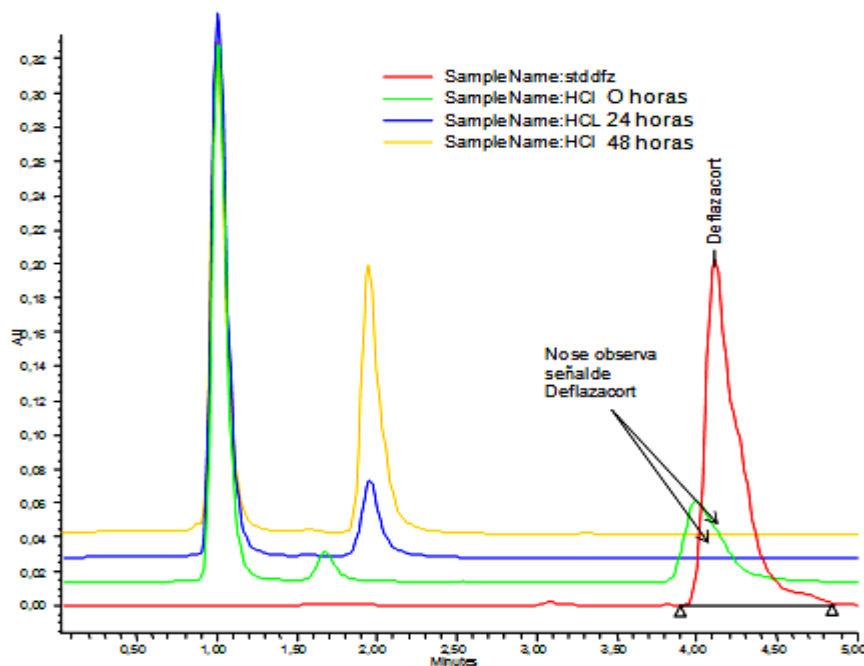
**Tabla XI. Robustez del método cromatográfico.** Se muestran los porcentajes de Deflazacort obtenidos con variaciones en su flujo y fase móvil.

Cambio	Areas	Promedio	% Deflazacort
ACN:H <sub>2</sub> O (65:35)	5.514.374	5.515.703	100,05
ACN:H <sub>2</sub> O (65:35)	5.512.856		
ACN:H <sub>2</sub> O (65:35)	5.519.879		
ACN:H <sub>2</sub> O (35:65)	5.519.593	5.518.238	99,95
ACN:H <sub>2</sub> O (35:65)	5.517.137		
ACN:H <sub>2</sub> O (35:65)	5.517.983		
Flujo 1,2mL/min	5.517.598	5.521.002	100,10
Flujo 1,2mL/min	5.528.728		
Flujo 1,2mL/min	5.516.681		
Flujo 0,8 mL/min	5.514.789	5.503.957	99,74
Flujo 0,8 mL/min	5.499.594		
Flujo 0,8 mL/min	5.497.487		

- **Estabilidad:** Las muestras fueron preparadas a la concentración final asumiendo que la disolución total del contenido declarado 0,0067 mg/ml. Se trataron según lo descrito en la Sección de Metodología 3.3.3.2 Procedimiento, obteniendo los siguientes resultados:
- ✓ **Hidrólisis ácida:** Al agregar ácido clorhídrico, el Deflazacort reacciona con este degradándose.

En la Figura N° 15, se observan dos picos a Tr 1 y 1,7 min. La formación de estos degradados se observó a partir de las 24 horas y sus señales

se incrementan progresivamente paralelamente con la desaparición del pico cromatográfico de Deflazacort a las 48 horas.



**Figura N°. 15 Degradación del Deflazacort por hidrólisis ácida.** Se muestra figura las dos replicas de las inyecciones de las muestras sometidas a hidrólisis acida.

Se realizó la comparación de los espectros obtenidos en los Tr y se compararon con el espectro del Deflazacort (Ver Figura N° 16).

El degradado 1 posee un espectro característico que no se corresponde ni con el Deflazacort ni con el ácido acético. Sin embargo, el degradado 2 posee un espectro que se solapa en un 80 % al espectro del Deflazacort, solo mostrando una disminución de la banda en el rango entre 210-230 nm. Evaluando el espectro presentado para el Ácido Acético y su rango de longitudes de onda puede inferirse que el degradado 2 podría corresponder al desacetildeflazacort, ya que la zona del espectro donde

difiere del Deflazacort es el rango de banda correspondiente al del ácido acético.

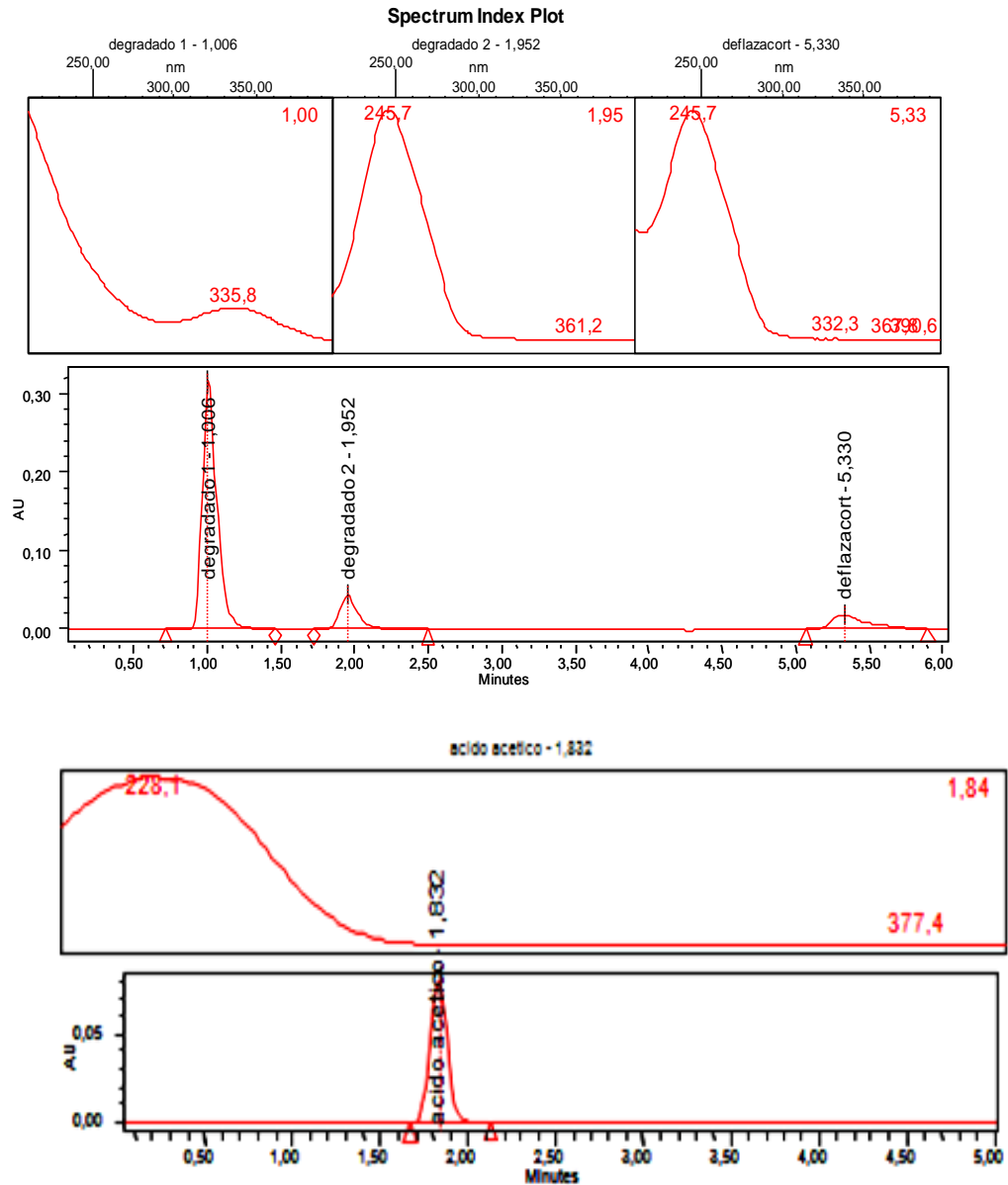


Figura Nº 16 Comparación de espectros de los degradados de Deflazacort. Se muestra en la figura las inyecciones de las muestras sometidas a hidrólisis acida, con el espectro de acido acético.

Sperandeo (2009) y Cardozo (2008) señalaron la desacetilación de la molécula de Deflazacort debido a un proceso de hidrólisis ácida con la

demostración de la presencia del 21-desacetildeflazacort obtenido luego de la exposición del Deflazacort a una solución de HCl 0,087M. Sperandeo indicó la presencia de degradados a partir de las 6 horas de análisis.

En los resultados de estabilidad en medio ácido (Ver Sección de Resultados, Figura No. 16) y en el ensayo de disolución de las tabletas de Deflazacort en medio ácido (Ver Sección de Resultados, Figura No. 23) obtenidos en el presente trabajo, se observa presencia de los degradados desde el inicio de la prueba lo que permite discrepar de los resultados de Sperandeo (2009) quien estudia el Deflazacort en medio de disolución de HCl 0,1N y en cuya cuantificación utilizó un método HPLC-RP con una proporción de MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20).

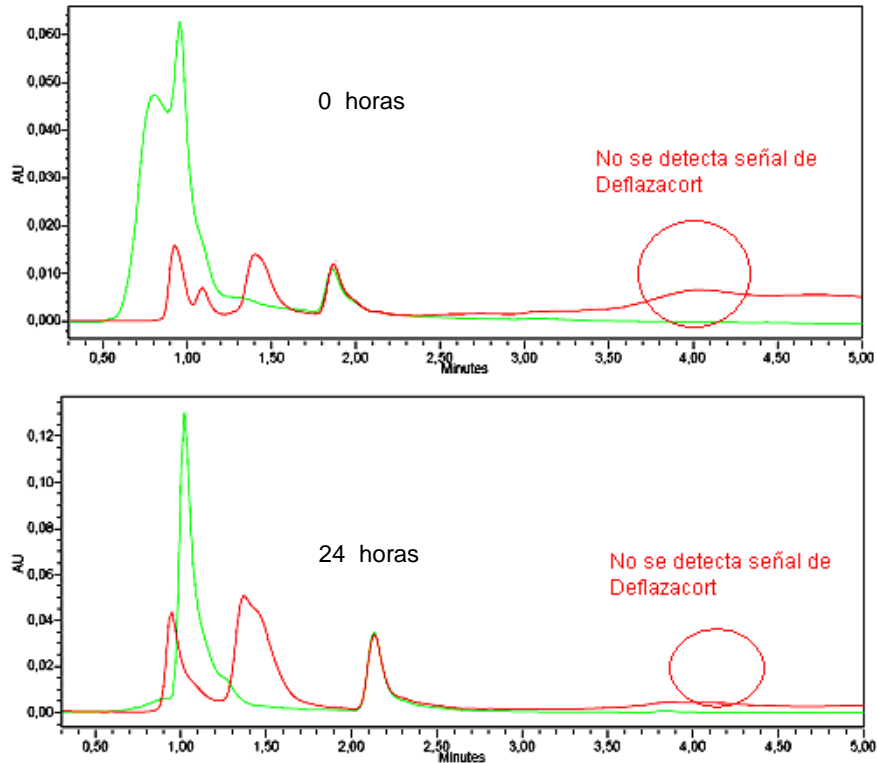
La presencia de un degradado con un espectro muy similar al Deflazacort y un método con una alta proporción de fase orgánica sugiere la coelución del analito de interés y sus degradados, justificando los resultados satisfactorios obtenidos por Sperandeo (2009), sin tomar en cuenta que dicho autor indicó la presencia del degradado desacetilado del Deflazacort en una solución de menor concentración al medio de disolución utilizado.

Sperandeo (2009) reportó una fase móvil con una proporción MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20) con una velocidad de flujo de 0,8 mL/min. La fuerza de solvente y

la velocidad de flujo utilizada por este autor, permite inferir la no resolución del pico de interés y sus degradados en medio ácido. En el estudio de la fuerza de solvente del presente trabajo se evaluó una fase móvil con una fuerza de solvente similar a la reportada por Sperandeo (ACN:H<sub>2</sub>O 60:40, flujo 1 mL/min), donde se obtuvieron Tr de 1,8 min y gráfico de pureza espectral de pico no satisfactorio (Ver Figura 3 y 4). Adicionalmente, el Degradado 2 no muestra diferencias espectrales con el Deflazacort ya que presentan el mismo cromóforo, lo cual no facilitaría su identificación a través de un PDA si los picos coeluyen. Estos resultados pudieran explicar los elevados porcentajes de disolución de Deflazacort obtenidos por Sperandeo (2009).

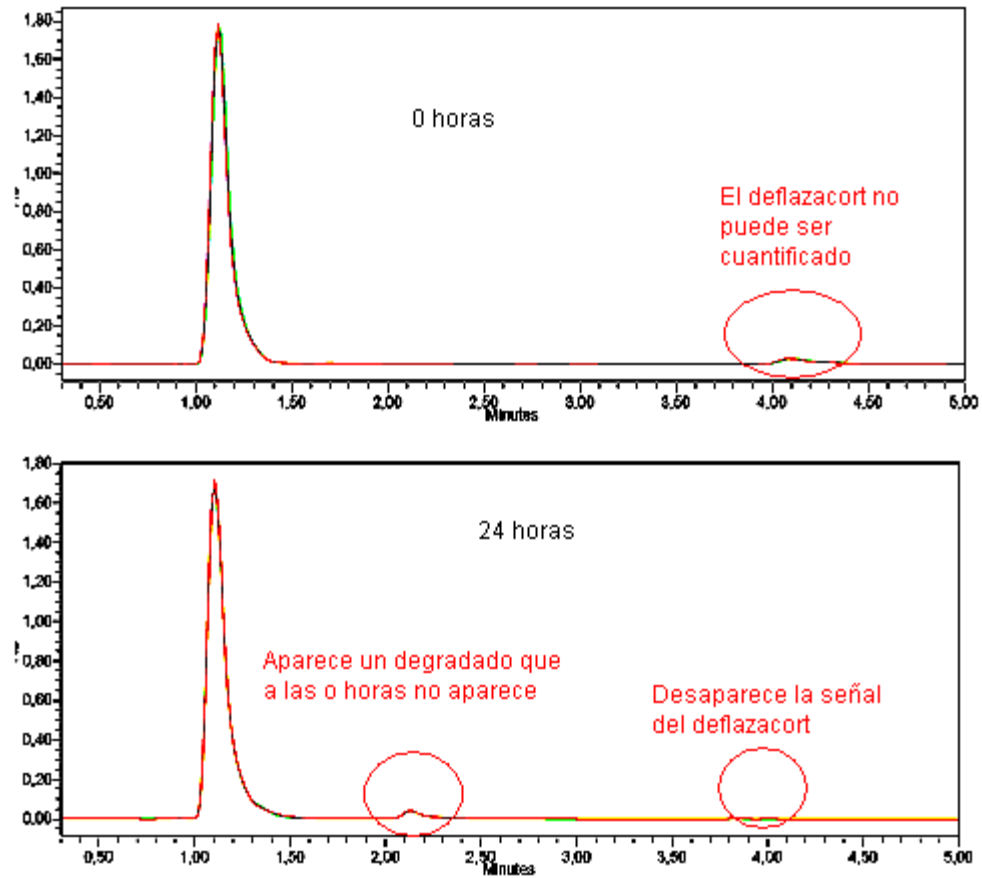
- ✓ **Hidrólisis alcalina:** Se observó degradación total de Deflazacort con el agregado de hidróxido de sodio evidenciado en la pérdida de la señal en los cromatogramas. Los resultados de las inyecciones replicas no mostraron reproducibilidad ni a las 24 horas ni a 48 horas. El Deflazacort, por ser un esteroide se descompone completamente en presencia de una base fuerte, dando lugar a degradados que no presentan repetitividad ni de una inyección a otra ni un día a otro. (Ver Figura N° 17).





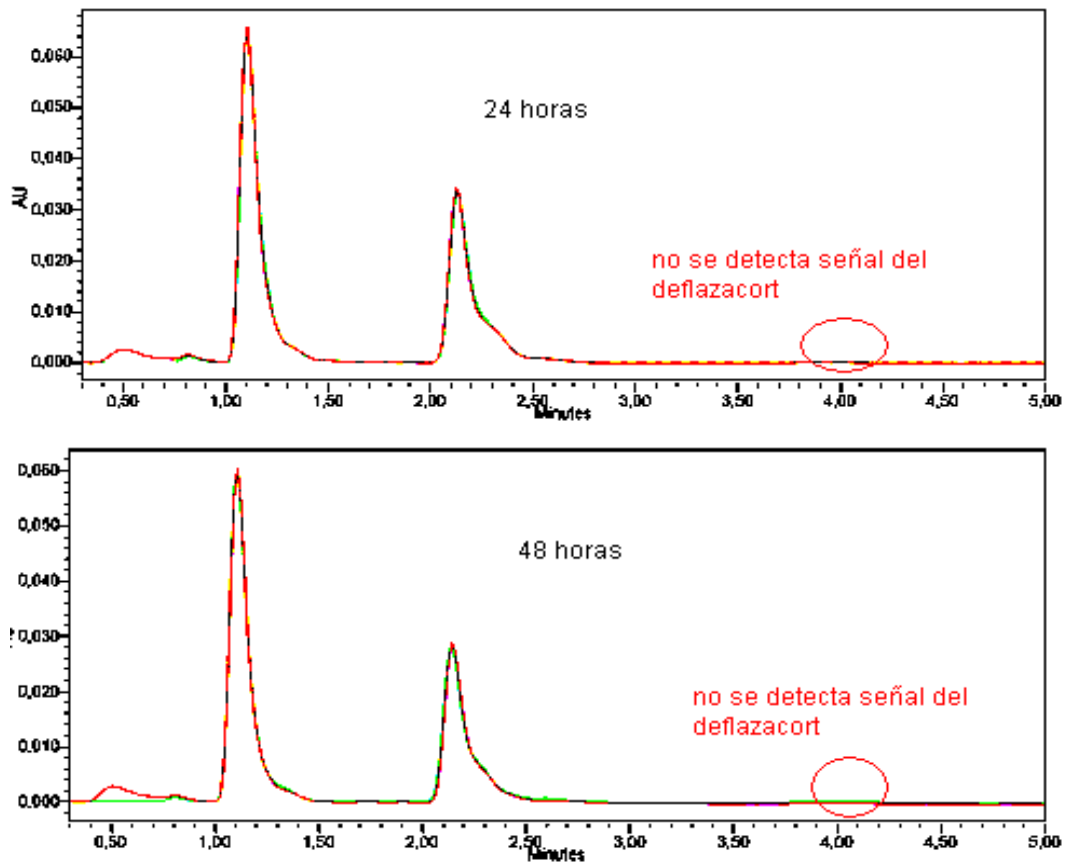
**Figura N°. 17 Degradación del Deflazacort por hidrólisis alcalina.** Se muestra figura las dos replicas de las inyecciones de las muestras sometidas a hidrólisis alcalina.

- ✓ **Oxidación:** Se evaluó la oxidación del Deflazacort agregando peróxido de hidrógeno, provocando degradación evidenciada por la pérdida total de la señal del Deflazacort. Se presume la transformación aún solo degradado a un Tr de 1 min con absorbancia similar a la obtenida por el Deflazacort en la validación. Luego de transcurridas 24 horas se evidencia la aparición de otro degradado a un Tr de 2 min. Se observó reproducibilidad en los resultados, lo que demuestra que la reacción del Deflazacort es inmediata frente al oxígeno y permanente (Ver Figura N° 18).



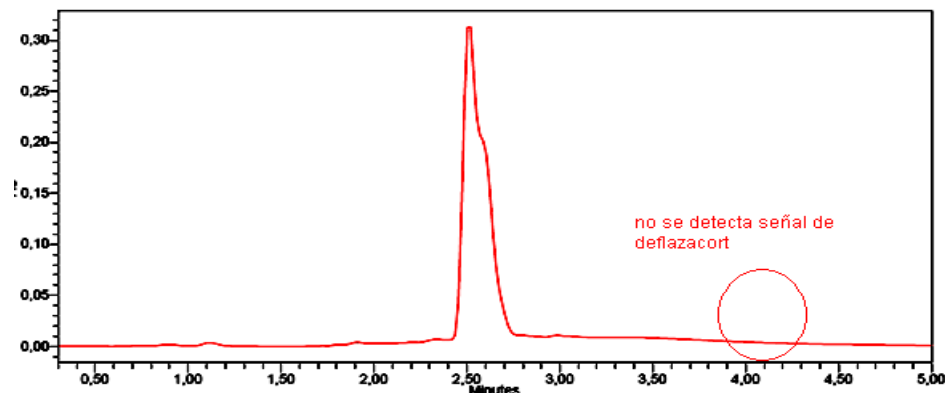
**Figura N°. 18. Degradación del Deflazacort por oxidación.** Se muestra figura las dos replicas de las inyecciones de las muestras sometidas a oxidación.

- ✓ **Fotólisis:** Se sometió a radiación ultravioleta una muestra de Deflazacort durante 24 y 48 horas. El Deflazacort se degrada completamente, obteniéndose dos picos claramente definidos a Tr de 1,3 y 2,4 minutos respectivamente. Estos resultados indican que las soluciones de muestras durante el ensayo de disolución y el análisis cuantitativo deben protegerse de la luz, ya que la fotólisis se evidenció a las 24 horas y no muestra diferencia significativa con el del realizado a las 48 horas (Ver Sección de resultados, Figura N° 19).



**Figura N°. 19. Degradación del Deflazacort por fotólisis.** Se muestra figura las dos replicas de las inyecciones de las muestras sometidas a fotólisis.

- ✓ **Congelación-Descongelación:** Luego de someter a tres ciclos de congelación y descongelación las muestras de Deflazacort, se evidenció la degradación en condiciones extremas de frío. El Deflazacort no puede ser almacenado por períodos de 24 horas a temperatura inferiores a 18 °C (Ver figura N° 20). Las soluciones estándar de Deflazacort deben ser preparadas a diario y las muestras provenientes del ensayo de disolución deben ser analizadas inmediatamente de su obtención.



**Figura Nº. 20. Degradación del Deflazacort por descongelación.** Se muestra figura las dos replicas de las inyecciones de las muestras sometidas a periodos de congelación y descongelación.

- ✓ **Almacenamiento a temperatura ambiente:** Se evaluó la solución de Deflazacort dejada en el mesón del laboratorio, protegida de la luz, durante 5 días consecutivos. Los resultados mostraron degradación después de este tiempo (Ver Tabla XII).

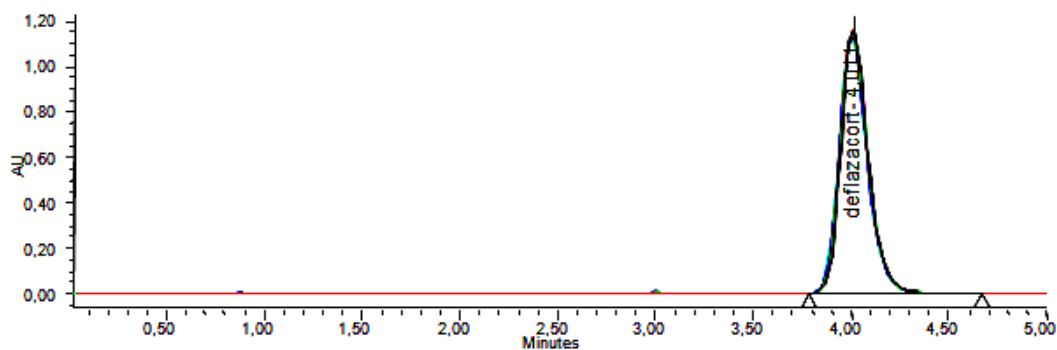
**Tabla XII. Resultados de la estabilidad de la muestra sometida a diferentes condiciones.** Se muestran los porcentajes de Deflazacort obtenido del análisis durante 5 días de muestras sin protección de luz y temperatura.

Dia	Area	X del Area	% de Deflazacort
1	5.319.593	5.318.238	96,42
	5.317.137		
	5.317.983		
2	4.504.374	4.493.343	81,46
	4.492.856		
	4.482.798		
3	2.259.351	2.265.064	41,07
	2.261.860		
	2.273.982		
4	1.237.183	1.239.319	22,47
	1.243.702		
	1.237.072		
5	181.056	182.241	3,30
	183.098		
	182.569		

- **Adecuación del Sistema:** Luego de inyectar 6 replicas consecutivas del punto medio de la curva estándar de Deflazacort (45 µg), se obtuvieron los siguientes valores promedios para los parámetros cromatográficos (Ver sección de resultados tabla XIII y Figura N° 21).

**Tabla XIII Adecuación del sistema cromatográfico según parámetros establecidos por la USP 35 NF 29.** Se muestran los resultados de la adecuación del sistema en el nivel intermedio de la curva de calibración

	Sample Name	Vial	Inj	Channel	Name	RT	Area	USP Tailing	K Prima	USP Plate Count
1	nivel3	3	1	998	deflazacort	4,011	11512859	1,224584	3,010831	3,916041e+003
2	nivel3	3	2	998	deflazacort	4,009	11466495	1,224168	3,009295	3,799089e+003
3	nivel3	3	3	998	deflazacort	4,006	11428562	1,212428	3,005893	3,726316e+003
4	nivel3	3	4	998	deflazacort	4,009	11471096	1,209040	3,006533	3,701945e+003
5	nivel3	3	5	998	deflazacort	4,008	11490536	1,206765	3,006065	3,899992e+003
6	nivel3	3	6	998	deflazacort	4,006	11424368	1,197053	3,005776	3,654866e+003
Mean						4,008	11465652,845	1,212	3,008	3,7e+003
Std. Dev.						0,002	34519,920	0,011	0,002	9,4e+001
% RSD						0,1	0,3	0,9	0,1	2,5e+000



**Figura N° 21 Adecuación del Sistema cromatográfico según los parámetros establecidos por la USP 35 NF 30.** Se muestran los cromatogramas solapados del nivel intermedio de la curva de calibración.

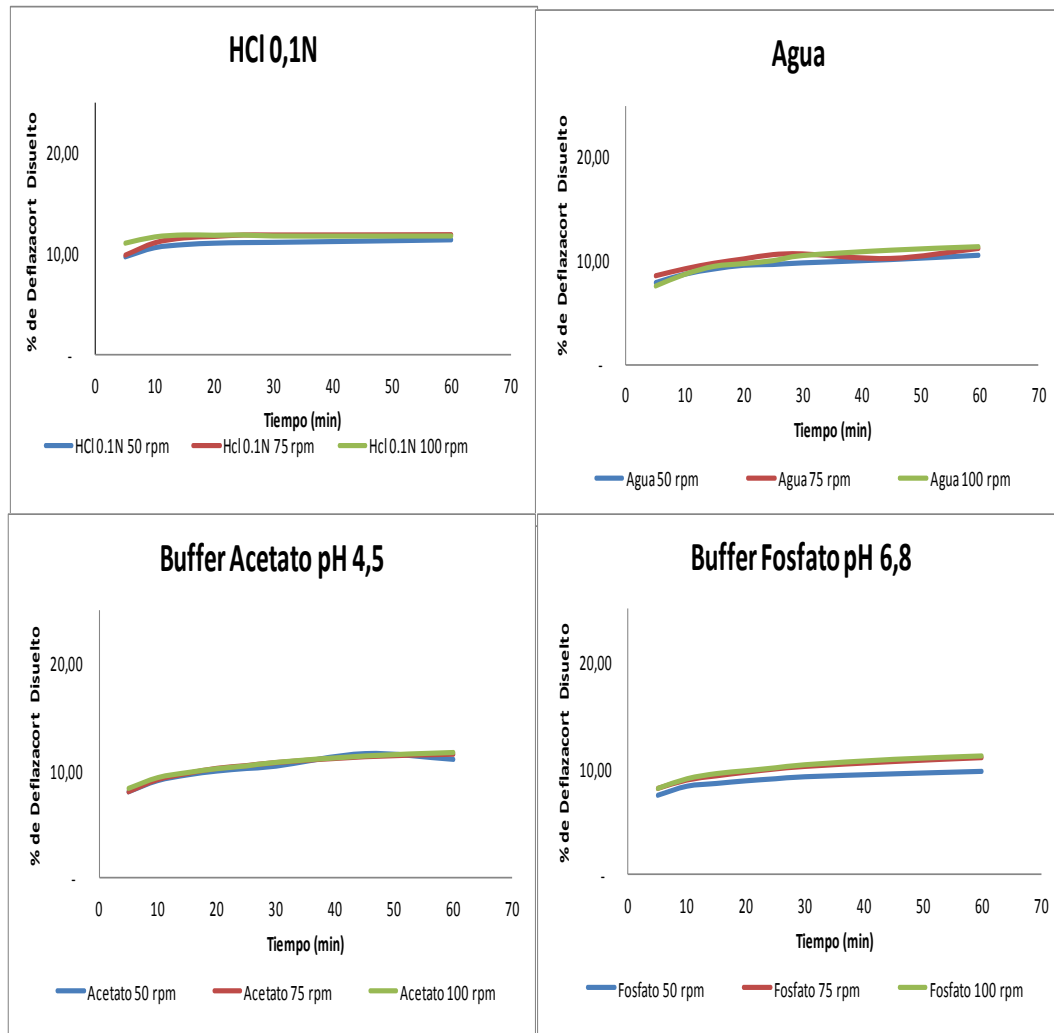
De acuerdo a los criterios establecidos por la USP 35 NF 30 los parámetros evaluados cumplen con los límites establecidos demostrando que el método es adecuado para la determinación de Deflazacort, debido a que se obtienen picos bien definidos, buena simetría del pico y alto número de platos teóricos demostrando así la eficiencia del método analítico.

### **4.3 Desarrollo del ensayo de disolución**

Los resultados obtenidos para los perfiles de disolución, con diferentes condiciones del ensayo son mostrados en la Figura N° 22 (Ver Anexos, Tablas XVI, XVII, XVIII y XIX).

Los perfiles se obtuvieron graficando el porcentaje de Deflazacort disuelto (Q) contra el tiempo. Se realizaron determinaciones en agua, buffer fosfato pH 6.8, buffer acetato pH 4.5 y HCl 0.1N. Adicionalmente se evaluaron 3 velocidades de agitación (50, 75 y 100 rpm) para todos los medios sugeridos por la USP 35 NF30, encontrando que ninguno de los perfiles supera el  $Q = 15\%$  de Deflazacort. No se observaron diferencias significativas entre los diferentes medios y velocidades de agitación.

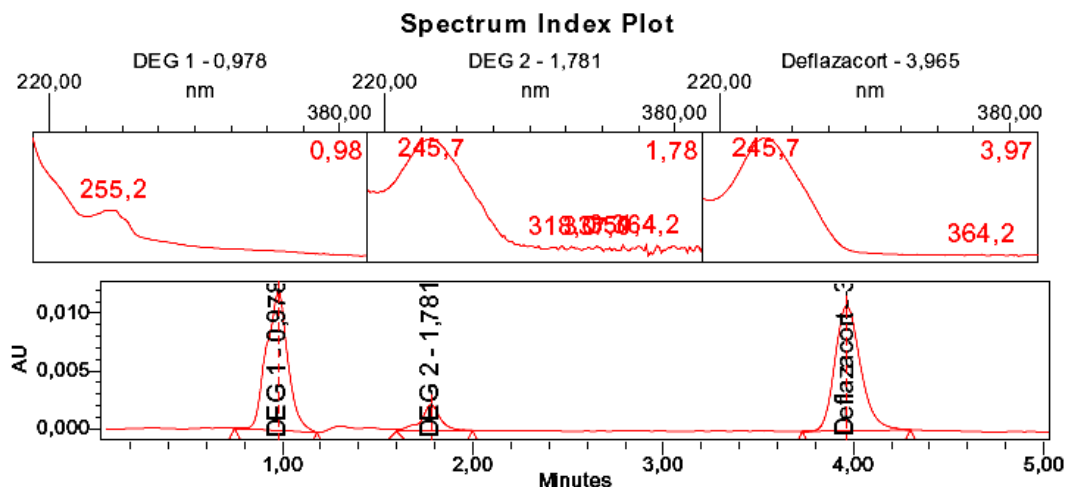
Wang y colaboradores (2011) sugieren que la solubilidad del Deflazacort es el factor determinante en la velocidad de disolución. La disolución del deflazacort depende de su disolución intrínseca y no del medio de disolución ni la velocidad de agitación utilizada.



**Figura Nº 22. Perfiles comparativos obtenidos en diferentes condiciones del ensayo de disolución, recomendados por la USP 35 NF 30.** Se muestran las graficas obtenidas con los diferentes medios de disolución

Sperandeo (2007) sugiere que la estructura cristalina del Deflazacort es estabilizada por interacciones intra e intermoleculares, evitando que interactúe con el agua para dar formas hidratadas solubles, reforzando lo expuesto por Wang y col (2011). Esto lleva a la decisión de promover la disolución del Deflazacort en medio acuoso utilizando el añadido de agente surfactante en el medio de disolución.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad en la validación de la metodología analítica (Ver Figura No. 15), se evaluó la presencia de productos de degradación en medio de disolución de HCl 0.1N, demostrando la presencia de los mismos en la muestra de disolución (Ver Figura N° 23), explicando el bajo valor de Q para este medio. La presencia de degradados a los 30 minutos de análisis, permitió refutar lo publicado por Cardoso (2008) que realizó ensayos de disolución en tabletas de Deflazacort de 30 mg estableciendo como medio de disolución HCl 0.1N con altos valores de %Q. Los resultados obtenidos permiten refutar lo altos porcentajes de disolución obtenidos por Cardoso (2008).



**Figura N° 23. Cromatograma y espectros de tabletas de Deflazacort en medio HCl 0.1N.** Se muestra en la figura las señales cromatográficas obtenidas con sus respectivos espectros, de una muestra de tabletas de 6 mg en medio ácido a 50 rpm.

La cuantificación por espectrofotometría ultravioleta a 245nm, realizada por Cardoso, no permite diferenciar la presencia de la mezcla de Deflazacort y sus degradados debido a que estos presentan el mismo cromóforo responsable del



espectro ultravioleta, haciendo casi imposible su identificación y diferenciación. Los valores de absorbancia obtenidos por Cardoso fueron el resultado de la absorción de la mezcla de los productos de degradación por hidrólisis ácida del Deflazacort, obteniendo resultados de disolución altos, hecho que se demuestra en las absorbancias obtenidas por los degradados del Deflazacort en la evaluación de estabilidad en medio ácido mostrada en este trabajo (Ver sección de resultados figura N° 15).

Sperandeo (2009) utilizó como método para la cuantificación de Deflazacort en ensayo de disolución la cromatografía líquida de alta resolución con detección UV. La metodología por HPLC utilizada por Sperandeo tampoco permite diferenciar los degradados del Deflazacort en medio ácido, este hecho pasa desapercibido porque la fase móvil utilizada posee un alto porcentaje de solvente orgánico (80% metanol) provocando la coelución de analito y degradados a un tiempo de retención de 2.5 minutos. Adicionalmente, no puede evidenciarse espectralmente ya que ambos degradados poseen los mismos cromóforos responsables del espectro UV.

Todo lo expuesto anteriormente permite establecer la importancia de la cromatografía líquida de alta resolución con indicadores de estabilidad para la obtención de un método específico y selectivo para la cuantificación de este fármaco.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la solubilidad del Deflazacort en medios acuosos es independientemente del pH y presenta evidencias de reacciones con el medio de disolución produciendo degradados en todas las condiciones evaluadas dando como resultado porcentajes de Deflazacort disueltos muy bajos. Esto permitió demostrar que la solubilidad del Deflazacort en medios acuosos es un parámetro crítico para el ensayo de disolución. Esto justificó el añadido de un agente surfactante como el dodecilsulfato de sodio (SDS) en diferentes porcentajes para promover la solubilidad del fármaco y evaluar los parámetros tecnológicos de la formulación como objetivo del trabajo propuesto, tal como lo indica la USP en aquellos casos de fármacos poco solubles (USP 35 NF 30, 2012).

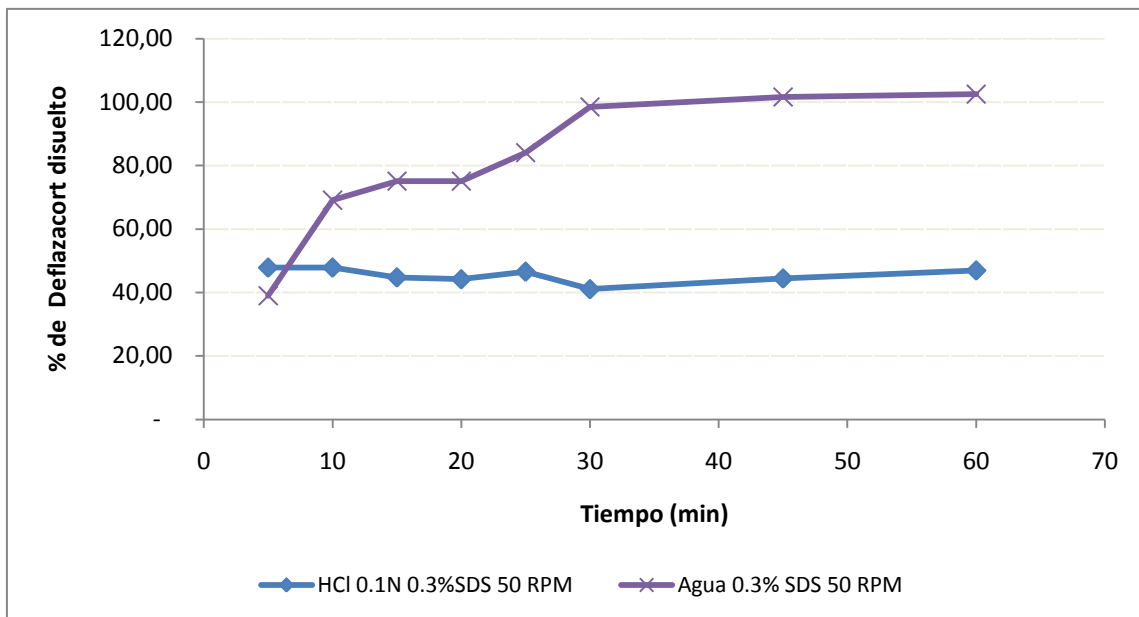
Según Goodman y Gilman (1991) el Deflazacort alcanza concentraciones plasmáticas máximas en 60 minutos, su vida media plasmática es de 1,1 a 1,9 horas. La eliminación tiene lugar principalmente por el riñón, siendo excretado en las primeras 8 horas de su administración más de un 70%, tal como lo demostró Santos y col (1994) en sus estudios del fármaco en orina. Santos (1994) evaluó inicialmente los medios de HCl 0.1N y agua con agregado de un agente surfactante como el SDS, debido a que la farmacocinética del Deflazacort demuestra que es absorbido en la parte superior del tracto gastrointestinal (TGI), descartando así el uso de buffer pH 6,8.

La USP 35 NF 30 (2012) utiliza como medio de disolución agua con SDS al 0.5% en cortisona (corticoesteroide de estructura química similar al

Deflazacort). Basado en este ensayo, se decidió agregar dodecilsulfato de sodio (SDS) como agente surfactante pero a una concentración menor a la reportada debido a que las tabletas de cortisona tiene una presentación de 25 mg en tabletas de 100 mg, lo que evidencia una mayor cantidad de fármaco a disolver que en las tabletas de Deflazacort desarrolladas que declaran 6 mg de principio activo. Adicionalmente este medicamento debe ser consumido con alimentos lo que promueve la presencia de enzimas digestivas y sales biliares que favorecen la disolución en el tracto gastrointestinal superior.

Se evaluó el agregado de SDS 0.3% en medio acuoso a 50 y 75 rpm, descartando las pruebas a 100 rpm debido a que la tableta flota y gira sobre sí misma en el fondo del vaso de disolución, afectando el patrón de flujo laminar que en la disolución es una variable intrínseca del proceso de disolución (Ver Figuras N° 24, 25, 26 y Anexos Tablas XX, XXI y XXII).

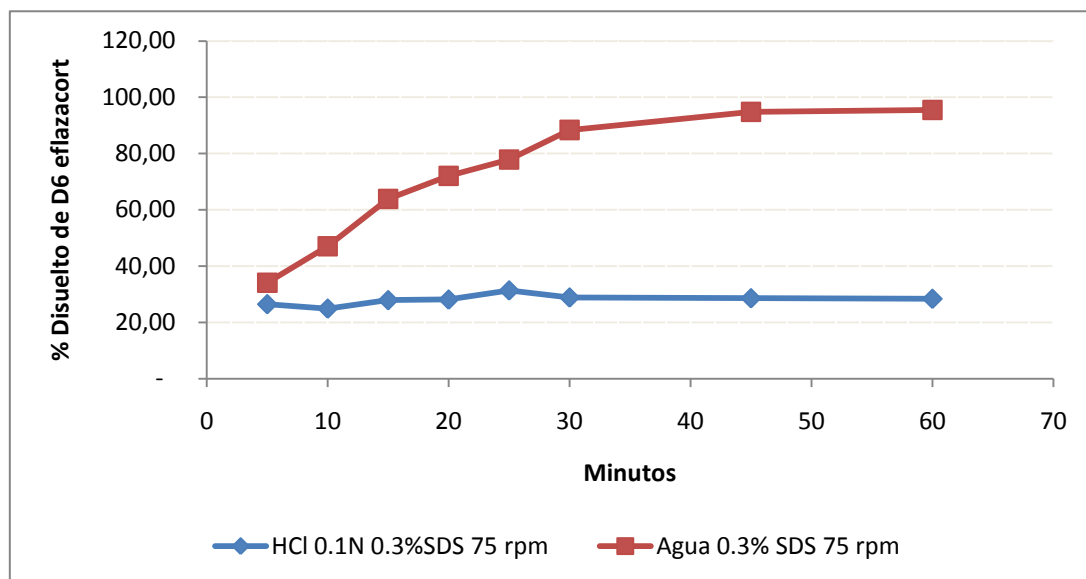
Se observó que en medio acuoso y medio ácido con 0,3% de añadido de SDS, la cantidad de Deflazacort disuelta a los 30 minutos fue de 98% a 50 rpm y 88% a 75 rpm, lo que demuestra que el aumento de las revoluciones no favorece la disolución del fármaco. En medio ácido, se evidenció la degradación que fué promovida por el aumento en la velocidad de agitación es por ello que la cantidad disuelta de Deflazacort muestra una meseta durante el perfil de disolución (Ver Figuras N° 24 y 25).



**Figura N° 24. Perfiles comparativos obtenidos con el agregado de 0.3 % de SDS a los medios de HCl 0.1N y Agua a 50 rpm.** Se muestran las graficas obtenidas con los diferentes medios de disolución.

Se seleccionó como medio de disolución Agua con añadido de SDS debido a que no promueve la formación de degradados y permitió obtener resultados satisfactorios.

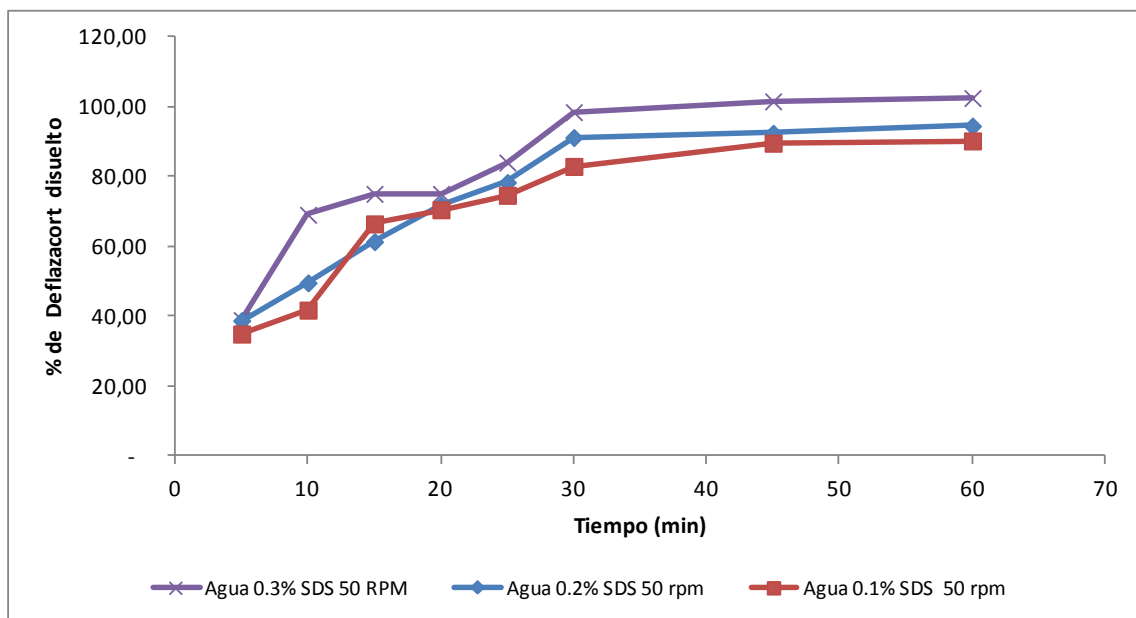
Se evaluó entonces 0,2% y 0,1% de SDS a 50 rpm con la finalidad de determinar la concentración adecuada de surfactante que permita alcanzar un  $Q \geq$  al 75% en 30 minutos promoviendo la solubilidad del Deflazacort, pero que a su vez garantice la discriminación de fallas en el proceso de fabricación, ya que no se favorece su disolución total en el medio (Ver Figura N° 26).



**Figura N° 25. Perfiles comparativos obtenidos con el agregado de 0.3 % de SDS a los medios de HCl 0.1N y Agua a 75 rpm.** Se muestran las graficas obtenidas con los diferentes medios de disolución.

Luego del agregado del agente surfactante se obtuvo para el ensayo de disolución con SDS al 0.3% un Q = 101 % de fármaco disuelto a los 30 minutos, lo que demuestra que el agente surfactante favoreció significativamente la disolución del Deflazacort.

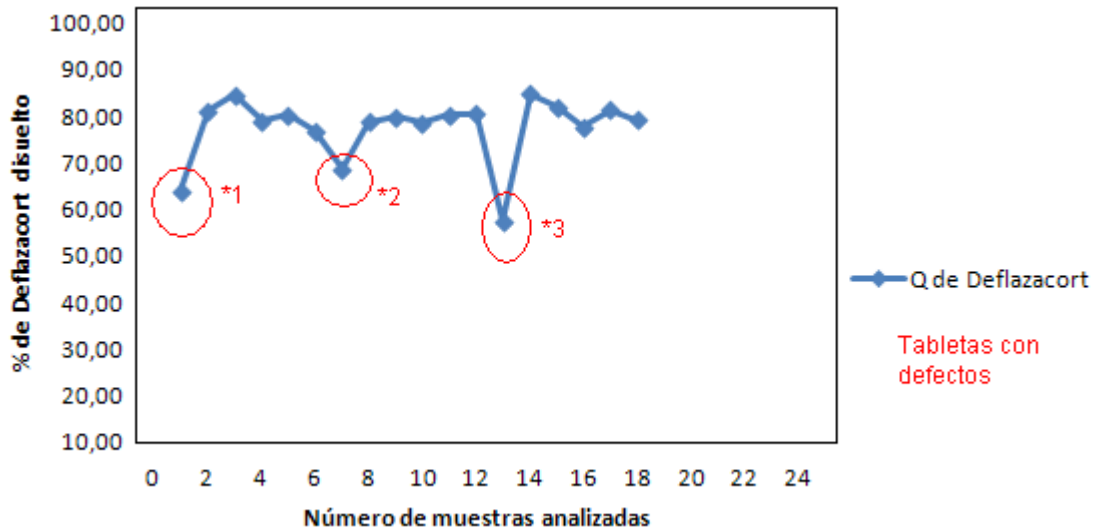
Para la evaluación con 0.2% de SDS a los 30 minutos se obtuvo un 91% de principio activo disuelto, y finalmente con 0.1% de SDS el porcentaje disuelto fue 84.54%, siendo este medio el más favorable para el estudio de disolución. Utilizando esta condición se procedió a retar el ensayo de disolución, evaluando tabletas de Deflazacort 6 mg fabricadas bajo distintos requerimientos en fórmula maestra y técnica de manufactura con la finalidad de determinar si el ensayo de disolución era capaz de detectar cambios en la formulación y/o proceso de manufactura (Ver Figura N° 26).



**Figura Nº 26. Perfiles comparativos obtenidos con el agregado de 0.3, 0.2 y 0.1 % de SDS en Agua a 50 rpm.** Se muestran las graficas obtenida con los diferentes medios de disolución.

Con la finalidad de corroborar lo anteriormente expuesto, se realizaron ensayos con 18 tabletas de deflazacort de 6 mg, bajo las condiciones establecidas anteriormente (agua con SDS al 0.1% a 50 rpm).

Dentro de estas tabletas se incluyeron tabletas control (cumplen con las especificaciones descritas en la sección 3.3.1 preparación de las muestras) y tabletas fabricadas con defectos o cambios en la formulación (Ver Figura Nº 27 y sección de anexos tabla XXIII),



**Figura Nº 27. Grafico de control de % disuelto de deflazacort vs numero de muestras bajo las condiciones finales.** Se muestran las graficas obtenidas las condiciones finales del ensayo de disolución.

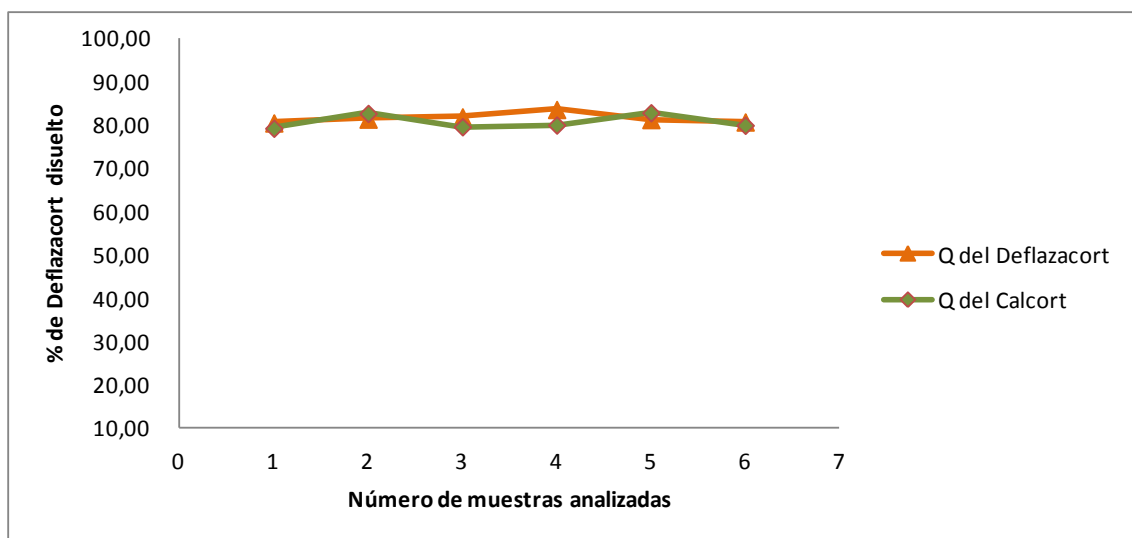
Se demostró que el ensayo de disolución es capaz de discriminar entre tabletas que no se hayan fabricado de acuerdo a la formula maestra y técnica de manufactura, siendo el porcentaje de deflazacort disuelto en **\*1** 63.84, en **\*2** 68.73% y **\*3** 57.50%, mientras que el resto de las tabletas presentan una cantidad de Deflazacort disuelta que se encuentra entre 77.58% y 84.68% con un promedio de 79.28% y una desviación estándar de 0,03%.

Esto permitió establecer como condiciones finales del ensayo de disolución:

- Aparato: 2 (paletas).
- Velocidad: 50 rpm (+/-4 rpm).
- Medio de disolución: Agua 0.1% de SDS.
- Temperatura 37°C(+/-0,5°C).
- Volumen: 900 mL.
- Tiempo: 30 minutos.
- *Tolerancia (Q):* mayor al 75%.

#### 4.4 Ensayos de Disolución comparativo con tabletas de Deflazacort

Se analizaron 18 tabletas de Deflazacort 6 mg preparadas en el Departamento de Investigación y Desarrollo de un Laboratorio Nacional y 6 tabletas de Calcort® 6mg (innovador), se obtuvieron los siguientes resultados (Ver figura N° 28).



**Figura N° 28. Ensayos de disolución de tabletas de Deflazacort 6 mg y Calcort® 6 mg.** Se muestran las graficas obtenidas con las condiciones finales medios de disolución.

El producto innovador Calcort® 6 mg presentó un promedio de porcentaje disuelto de 80.82% con una DSR de 0.02% y las tabletas de Deflazacort de 6 mg presentaron un promedio de porcentaje disuelto de 81.65% con una DSR de 0.01% (Ver Anexos, Tablas XXIV y XXV). Los resultados obtenidos permiten establecer que el ensayo de disolución puede ser aplicado en tabletas fabricadas por diferentes laboratorios ya en ambos casos cumplió con los criterios de aceptación establecidos en la USP 35 NF 30 (2012), para el Nivel



S1 con un número de muestras igual a seis y con el siguiente criterio de aceptación “*Cada unidad no deberá ser menor que  $Q + 5\%$* ”, sin obtener diferencias significativas entre los porcentajes de principio activo obtenidos entre ambos productos.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

Se estableció como condiciones analíticas del método una Columna C<sub>18</sub> Symmetry ® 5 µ (150mm x 4,6mm DI), fase móvil ACN:H<sub>2</sub>O (45:55), longitud de onda de detección 244 nm, volumen de inyección 45 µL, una velocidad de flujo 1 mL/min y tiempo de corrida 5 min. Esto permite obtener resultados confiables en la identificación y cuantificación de deflazacort en tabletas.

El método fue validado obteniendo una ecuación de la recta  $y = 247370x - 140251$ , un coeficiente de correlación de 0,99985 y un coeficiente de determinación de 0,9997 demostrando linealidad en un rango de 10ug a 100ug, con una precisión de sistema de 0,14%, una exactitud de 101,27% con una desviación estándar relativa de 2,48%, el límite de cuantificación fue de 1ug y el límite de detección de 0,125ug. El método analítico obtenido para la cuantificación de Deflazacort por RP-HPLC con detección de diodos demostró ser lineal, exacto, preciso, reproducible, sensible, específico y robusto.

El estudio de indicadores estabilidad analítica demostraron que el estándar y las muestras de Deflazacort deben ser preparadas y analizadas el mismo día.

Los resultados obtenidos por el método analítico por RP-HPLC propuesto para la cuantificación del Deflazacort permiten proponerlo como análisis de rutina para la uniformidad de contenido, ensayo de disolución, análisis de trazas en aguas de lavado

y estudio de estabilidad de producto, ya que permite determinar el principio activo y sus productos de degradación con una excelente resolución de los mismos. Por lo tanto se recomienda este método analítico como método rutinario para el control de calidad de Deflazacort en tabletas.

Las condiciones finales del ensayo de disolución desarrollado fueron las siguientes: Aparato 2 (paleta), 50 rpm (+/- 4 rpm), Medio de disolución Agua con adición del 0,1% de SDS, a 37°C +/- 0,5°C, volumen de 900 mL, tiempo de muestreo de 30 minutos y con un Q  $\geq$  75%.

Los resultados obtenidos luego de analizar diferentes tabletas de deflazacort, incluyendo en los ensayos de tabletas con defectos permitieron demostrar que el ensayo de disolución propuesto puede discriminar tabletas fuera de especificaciones, demostrando la fortaleza del mismo como análisis crítico en el control de calidad del producto terminado. De igual manera, no se mostraron diferencias significativas en los resultados entre el producto evaluado y el producto innovador en el mercado venezolano, lo que evidencia que la metodología propuesta podría ser considerada como método para la evaluación de la equivalencia farmacéutica entre productos de liberación inmediata ya que es capaz de discriminar entre tabletas con límites fuera de las especificaciones, cambios en la técnica de manufactura, fórmula maestra o laboratorios fabricantes.

## **5.2 Recomendaciones**

Se recomienda profundizar en la identificación y cuantificación de los diferentes productos de degradación y/o compuestos relacionados del Deflazacort, a fin de establecer límites en materia prima, producto en proceso y producto terminado.

Llevar el producto a escala industrial para evaluar los puntos críticos de control y realizar pruebas en el proceso de mezclado estableciendo tiempo y equipo adecuado para garantizar la incorporación homogénea del Deflazacort en la formulación.

Continuar con las pruebas en lotes de comercialización que permita realizar perfiles de disolución comparativos entre el producto innovador y el nuevo producto desarrollado para establecer la equivalencia farmacéutica y cumplir con los requisitos de registro del INHRR.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avilán M. Estudio de la disolución de parches transdérmicos comerciales. [Trabajo Especial de Grado]. Postgrado de Aseguramiento de la Calidad. Facultad de Farmacia UCV, Caracas: Venezuela; 2004.
- Bergum JS. Constructing acceptance limits for multiple stage tests. Drug Develop. Industrial Pharmacy 16: 2153-2166, 1990.
- Bernareggi P, Poletti G, Zanolo F y Zerilli H. Journal of Pharmaceutical and Biomedical. Analysis, 1997, 5(2): 177-181.
- Cardoso S, Correa G y Belle L. Latin American Journal of Pharmacy. Desenvolvimento e Validacao de Métodos de dissolucao para Deflazacorte em Comprimidos e capsulas Magitralis. 2008, 27(5); 734-9.
- FDA, Guidance for industry. Dissolution testing for IR. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration [Publicación en línea] 1997 [consulta 14 de julio de 2012]. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070237.pdf>
- FDA, Guidance for industry. Scale-up and postapproval. [Publicación en línea] 1995 [consulta 14 de julio de 2012]. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070636.pdf>
- FDA, Process Validation: General principles and Practices. [Publicación en línea] 2011 [consulta 14 de julio de 2012]. Disponible en:

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070336.pdf>

- FDA, Guía para la industria Farmacéutica. Pruebas de disolución de formas de dosificación oral sólidas de liberación inmediata [Publicación en línea] 1997 [consulta 14 de julio de 2012]. Disponible en: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm200707.htm>
- Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8ª Edición. México D.F.: Editorial Médica Panamericana; 1991.p.1551-1578.
- Guía Q2 de la Conferencia Internacional de Armonización. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1); 1994.
- Hanson. Handbook of Dissolution Testing. 2ª Edición. Estados Unidos de América.1990.
- Harrison. Principios de la medicina interna.15ª Edición. México D.F: Editorial Mc Graw Hill Interamericana; 2002.
- Marques, M.R.C. & W. Brow Analytica. Multiple stage tests. Drug Develop. Industrial Pharmacy. (2002) 1: 48-51
- Normas Venezolanas de Biodisponibilidad y Bioequivalencia de Productos Farmacéuticos. Gaceta Oficial Número 38.070. 22 de noviembre de 2004. Caracas.
- Patel S, Patel N. Validated Spectrophotometric Methods for Determination of Deflazacort in Tablet Dosage Form. Asian Journal of Pharmacy and life Science, 2011, Vol I (3) July- Sept,

- Piazzon M. Spectrophotometric and HPLC determination of deflazacort in pharmaceutical dosage forms. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2010. Vol.46, n2.
- Regnault M. Desarrollo de un método analítico por HPLC. Facultad de Farmacia UCV, Caracas: Venezuela; 2005.
- Remington. Farmacia. Volumen 2. México: Editorial Médica Panamericana; 1987. p.892-911.
- Rockville MD. Fundamentos de la USP sobre Disolución 2000 - Manual de Instrucción. 2008.
- Rodríguez D y Perdomo E. Desarrollo y validación de un método analítico por HPLC para la determinación del ensayo de disolución del clorhidrato de tetraciclina en cápsulas. [trabajo especial de grado]. Facultad de Farmacia UCV, Caracas: Venezuela; 2005.
- Santos M e Izquierdo H. Optimization of separation of a complex mixture of natural and synthetic corticoids by micellar liquid chromatography using sodium dodecyl sulphate: Application to urine samples. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1999; 724: 53-63.
- Santos M, Gonzalo L, Muniz V e Izquierdo H. Journal of Chromatography A. Liquid chromatographic method development for steroids. 2007; 1156: 321–330.
- Santos M, Gonzalo L, Muniz V e Izquierdo H. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. 1994; 657: 248-253.

- Selectchemie , Zurich. (Proveedor de Materia Prima) [Acceso propio del Proveedor] Calier, Avenida Río Caura, Prados del Este. Centro Empresarial Torre Humbolt. Piso 17, Oficina 17-01. Caracas - Venezuela.
- Sperandeo N, Cuffinia S, Ellenab J, y colaboradores. *Journal el Servier steroids*. Physicochemical characterization of deflazacort: Thermal analysis, crystallographic and spectroscopic study. 2007; 7 2: 261–269
- Sperandeo N y kassuha D. *Scientia Pharmaceutica. Devenlopment and validation of a Dissolution test for deflazacort tablets*. 2009; 680–693
- Skoog D.A. Principios de Análisis Instrumental. (2000). McGraw Hill (5ª edición).
- The Index Merck. 13ª. Edición. USA; 2001.P.2915.
- The Official Compendia of Standards USP 35 NF 30. The United States Pharmacopoeia. The National Formulary. Convention Inc. 2012.
- Wang P, Wang J, Gong J y Zhang M. *Journal ElServier Fluid Phase Equilibria*. Determination of the solubility, dissolution enthalpy and entropy of Deflazacort in different solvents. 2011; 306: 171–174



## **Anexos**

Tabla XIV. Datos crudos de las seis curvas de calibración.

10	2.537.727	20	5.152.271	45	12.902.948	9.911.018	70	19.551.324	100	26.787.691
10	2.593.794	20	5.201.987	45	12.818.325	9.813.958	70	19.609.423	100	26.858.433
10	2.563.053	20	5.198.146	45	12.681.422	9.820.599	70	19.646.909	100	26.992.268
10	2.730.267	20	5.601.748	45	12.534.944	9.910.020	70	18.907.447	100	26.791.051
10	2.720.740	20	5.601.668	45	12.525.784	9.815.847	70	19.609.874	100	26.795.845
10	2.772.295	20	5.607.167	45	12.491.079	9.870.961	70	18.610.200	100	26.897.410
10	2.222.960	20	4.442.558	45	12.525.784	10.050.627	70	17.633.479	100	23.986.727
10	2.214.823	20	4.447.164	45	12.525.827	10.082.696	70	17.772.841	100	23.811.447
10	2.245.035	20	4.421.682	45	12.491.079	10.070.889	70	17.770.159	100	23.980.059
10	1.985.572	20	4.250.449	45	12.535.895	10.048.131	70	16.198.893	100	23.677.210
10	1.976.946	20	4.259.915	45	12.524.775	10.068.774	70	16.201.487	100	23.622.351
10	2.020.070	20	4.245.710	45	12.530.784	10.078.689	70	16.199.874	100	23.628.758
10	2.070.540	20	4.402.353	45	11.098.312	10.222.913	70	15.737.175	100	22.350.482
10	2.110.710	20	4.414.698	45	11.070.498	10.321.972	70	15.788.789	100	22.394.584
10	2.127.704	20	4.410.554	45	11.091.003	10.316.348	70	15.871.106	100	22.450.129
10	2.106.446	20	4.421.905	45	11.075.421	10.342.963	70	16.046.490	100	22.835.382
10	2.093.566	20	4.414.144	45	11.083.479	10.288.587	70	16.014.836	100	22.839.775
10	2.013.926	20	4.415.622	45	11.095.547	10.288.587	70	16.027.971	100	22.900.146
<b>Promedio</b>	2.283.676	<b>Promedio</b>	4.717.208	<b>Promedio</b>		11.081.291	<b>Promedio</b>	17.399.904	<b>Promedio</b>	24.422.208
<b>Desv Std</b>	275915,6565	<b>Desv Std</b>	497324,5646	<b>Desv Std</b>		1151732,66	<b>Desv Std</b>	1512180,908	<b>Desv Std</b>	1790744,984
<b>DSR</b>	12,08208241	<b>DSR</b>	10,54277408	<b>DSR</b>		10,39348785	<b>DSR</b>	8,690742682	<b>DSR</b>	7,332444992

Tabla XV. Datos crudos de los tres días de análisis de exactitud.

Muestra	DIA 1			DIA 2			DIA 3		
	Area	Areas Promedio	% Recuperado de deflazacort	Area	Promedio	% Recuperado de deflazacort	Area	Promedio	% Recuperado de deflazacort
1	4.424.336	4.416.576	99,14	4.887.551	4.884.296	99,17	6.909.042	6.847.187	102,98
	4.422.664			4.911.304			6.813.896		
	4.402.729			4.844.032			6.818.624		
2	4.400.489	4.433.676	99,53	4.853.242	4.865.657	100,49	7.032.116	6.909.875	103,93
	4.462.699			4.855.239			6.928.490		
	4.437.839			4.888.489			6.769.018		
3	4.440.696	4.428.581	99,91	4.808.398	4.824.830	100,14	6.803.170	6.853.731	103,08
	4.419.321			4.817.169			6.954.854		
	4.425.727			4.848.923			6.803.170		
4	10.743.703	10.740.241	99,12	12.280.861	12.295.991	102,08	11.714.635	11.713.768	105,71
	10.743.703			12.276.807			11.697.582		
	10.733.317			12.330.305			11.729.086		
5	10.771.708	10.754.481	99,26	12.063.746	12.056.594	100,10	11.230.672	11.490.877	103,70
	10.745.831			12.056.858			11.496.444		
	10.745.904			12.049.177			11.745.516		
6	11.010.869	11.033.934	99,57	13.215.124	13.223.852	107,40	11.820.118	11.446.960	103,30
	11.035.713			13.188.642			11.447.009		
	11.055.220			13.267.789			11.073.752		
7	16.187.229	16.172.200	100,07	17.775.998	17.715.488	102,77	16.714.635	16.713.768	96,96
	16.186.408			17.763.367			16.697.582		
	16.142.962			17.607.100			16.729.086		
8	15.931.008	15.961.891	100,83	16.633.280	16.833.645	97,66	17.230.672	17.490.877	101,47
	15.962.382			16.933.656			17.496.444		
	15.992.282			16.933.999			17.745.516		
9	16.136.642	16.139.921	101,95	17.561.919	17.691.208	102,63	17.820.118	17.446.960	101,21
	16.211.602			17.592.244			17.447.009		
	16.071.519			17.919.462			17.073.752		

**Tabla XVI. Resultados obtenidos de perfiles de disolución con tabletas de Deflazacort de 6 mg en HCl 0.1N en diferentes revoluciones por minuto.** La tabla muestra los promedios de las dos inyecciones realizadas de los diferentes puntos de muestreo del perfil de disolución.

Medio:	HCl 0,1N		Medio:	HCl 0,1N		Medio:	HCl 0,1N	
Velocidad:	50 rpm		Velocidad:	75 rpm		Velocidad:	100 rpm	
Tiempo (min)	Area	% Dfz	Tiempo (min)	Area	% Dfz	Tiempo (min)	Area	% Dfz
5	79.607,80	9,65	5	85.517,30	9,91	5	113.187,40	11,11
10	100.084,70	10,54	10	112.480,00	11,08	10	127.294,80	11,73
15	107.050,40	10,85	15	123.230,20	11,55	15	131.811,80	11,93
20	110.148,40	10,98	20	126.384,30	11,69	20	131.135,20	11,90
25	111.487,30	11,04	25	129.566,20	11,83	25	131.779,20	11,93
30	112.034,10	11,06	30	129.559,50	11,83	30	129.498,90	11,83
45	114.697,20	11,18	45	129.741,50	11,84	45	129.279,90	11,82
60	117.691,70	11,31	60	130.213,10	11,86	60	129.479,50	11,83

**Tabla XVII. Resultados obtenidos de perfiles de disolución con tabletas de Deflazacort de 6 mg en Agua en diferentes revoluciones por minuto.** La tabla muestra los promedios de las dos inyecciones realizadas de los diferentes puntos de muestreo del perfil de disolución.

Medio:	Agua		Medio:	Agua		Medio:	Agua	
Velocidad:	50 rpm		Velocidad:	75 rpm		Velocidad:	100 rpm	
Tiempo (min)	Area	% Dfz	Tiempo (min)	Area	% Dfz	Tiempo (min)	Area	% Dfz
5	37.709,60	7,95	5	51.287,50	8,55	5	30.752,60	7,64
10	55.195,60	8,72	10	66.689,30	9,23	10	55.563,90	8,74
15	66.163,60	9,21	15	79.192,50	9,79	15	72.594,10	9,49
20	73.722,20	9,54	20	88.628,00	10,21	20	78.361,30	9,75
25	75.415,30	9,62	25	98.165,30	10,63	25	84.548,70	10,03
30	78.723,00	9,77	30	99.837,40	10,70	30	95.346,10	10,51
45	85.599,90	10,07	45	89.718,20	10,26	45	106.717,50	11,01
60	94.558,00	10,47	60	112.032,40	11,25	60	114.199,50	11,34

**Tabla XVIII. Resultados obtenidos de perfiles de disolución con tabletas de Deflazacort de 6 mg en Buffer acetato pH 4.5 en diferentes revoluciones por minuto.** La tabla muestra los promedios de las dos inyecciones realizadas de los diferentes puntos de muestreo del perfil de disolución.

Medio:	Buffer Acetato pH 4,5		Medio:	Buffer Acetato pH 4,5		Medio:	Buffer Acetato pH 4,5	
Velocidad:	50 rpm		Velocidad:	75 rpm		Velocidad:	100 rpm	
Tiempo (min)	Area	% Dfz	Tiempo (min)	Area	% Dfz	Tiempo (min)	Area	% Dfz
5	38.060,00	7,96	5	39.605,40	8,03	5	46.785,60	8,35
10	61.871,20	9,02	10	64.911,40	9,15	10	69.251,40	9,35
15	73.981,80	9,56	15	77.682,90	9,72	15	79.646,10	9,81
20	82.154,10	9,92	20	88.259,80	10,19	20	87.725,20	10,17
25	87.625,40	10,16	25	93.869,40	10,44	25	93.420,60	10,42
30	92.483,50	10,38	30	100.076,50	10,72	30	100.701,00	10,74
45	118.963,00	11,55	45	112.137,50	11,25	45	114.015,10	11,33
60	106.770,60	11,01	60	117.363,30	11,48	60	121.198,40	11,65

**Tabla XIX. Resultados obtenidos de perfiles de disolución con tabletas de deflazacort de 6 mg en Buffer fosfato pH 6.8 en diferentes revoluciones por minuto.** La tabla muestra los promedios de las dos inyecciones realizadas de los diferentes puntos de muestreo del perfil de disolución.

Medio:	Buffer fosfato pH 6,8		Medio:	Buffer fosfato pH 6,8		Medio:	Buffer fosfato pH 6,8	
Velocidad:	50 rpm		Velocidad:	75 rpm		Velocidad:	100 rpm	
Tiempo (min)	Area	% Dfz	Tiempo (min)	Area	% Dfz	Tiempo (min)	Area	% Dfz
5	25.235,80	7,39	5	40.665,70	8,08	5	42.484,30	8,16
10	44.683,80	8,25	10	58.290,10	8,86	10	63.001,10	9,07
15	50.616,00	8,52	15	67.033,40	9,25	15	73.895,10	9,55
20	56.199,10	8,77	20	74.626,60	9,58	20	79.890,80	9,82
25	60.611,30	8,96	25	81.403,00	9,89	25	86.055,20	10,09
30	64.859,80	9,15	30	86.654,10	10,12	30	92.510,30	10,38
45	71.018,70	9,42	45	96.834,90	10,57	45	103.886,30	10,88
60	76.406,70	9,66	60	104.966,70	10,93	60	111.153,40	11,21

**Tabla XX. Resultados obtenidos de perfiles de disolución con tabletas de deflazacort de 6 mg en HCl 0.1N con agregado de 0.3% de SDS en diferentes revoluciones por minuto.** La tabla muestra los promedios de las dos inyecciones realizadas de los diferentes puntos de muestreo del perfil de disolución.

Medio:	HCl 0,1N 0,3% SDS		Medio:	HCl 0,1N 0,3% SDS	
Velocidad:	50 rpm		Velocidad:	75 rpm	
Tiempo (min)	Promedio de areas	% Deflazacort	Tiempo (min)	Promedio de areas	% Deflazacort
5	5.005.656,80	47,85	5	2.708.513,60	26,49
10	5.006.776,80	47,86	10	2.539.114,50	24,92
15	4.674.242,70	44,77	15	2.861.535,80	27,92
20	4.611.839,90	44,19	20	2.884.715,10	28,13
25	4.868.406,40	46,58	25	3.235.528,00	31,39
30	4.275.283,50	41,06	30	2.963.628,00	28,87
45	4.638.523,40	44,44	45	2.936.287,10	28,61
60	4.908.896,00	46,95	60	2.915.102,10	28,42

**Tabla XXI. Resultados obtenidos de perfiles de disolución con tabletas de deflazacort de 6 mg en Agua con agregado de 0.3% de SDS en diferentes revoluciones por minuto.**

La tabla muestra los promedios de las dos inyecciones realizadas de los diferentes puntos de muestreo del perfil de disolución.

Medio: Agua 0,3%SDS			Medio: Agua 0,3%SDS		
Velocidad: 50 rpm			Velocidad: 75 rpm		
Tiempo (min)	Promedio de areas	% Deflazacort	Tiempo (min)	Promedio de areas	% Deflazacort
5	4.048.368,00	38,95	5	3.528.308,50	34,12
10	7.290.683,50	69,10	10	4.922.070,80	47,07
15	7.936.116,80	75,10	15	6.733.798,50	63,92
20	7.936.116,80	75,10	20	7.613.828,80	72,10
25	8.899.739,70	84,06	25	8.236.856,30	77,89
30	10.452.683,90	98,49	30	9.364.416,70	88,38
45	10.786.150,10	101,60	45	10.056.275,30	94,81
60	10.886.706,80	102,53	60	10.133.212,30	95,52

**Tabla XXII. Resultados obtenidos de perfiles de disolución con tabletas de deflazacort de 6 mg en Agua con agregado de SDS en diferentes porcentajes.** La tabla muestra los promedios de las dos inyecciones realizadas de los diferentes puntos de muestreo del perfil de disolución.

<b>Medio:</b>	Agua 0,3%SDS	
<b>Velocidad:</b>	50 rpm	
<b>Tiempo (min)</b>	<b>Promedio de areas</b>	<b>% Deflazacort</b>
5	4.048.368,00	38,95
10	7.290.683,50	69,10
15	7.936.116,80	75,10
20	7.936.116,80	75,10
25	8.899.739,70	84,06
30	10.452.683,90	98,49
45	10.786.150,10	101,60
60	10.886.706,80	102,53
<b>Medio:</b>	Agua 0,2%SDS	
<b>Velocidad:</b>	50 rpm	
<b>Tiempo (min)</b>	<b>Promedio de areas</b>	<b>% Deflazacort</b>
5	4.030.304,00	38,78
10	5.191.897,50	49,58
15	6.461.597,20	61,39
20	7.595.676,20	71,93
25	8.286.762,60	78,36
30	9.670.305,20	91,22
45	9.801.241,50	92,44
60	10.023.607,70	94,51
<b>Medio:</b>	Agua 0,1%SDS	
<b>Velocidad:</b>	50 rpm	
<b>Tiempo (min)</b>	<b>Promedio de areas</b>	<b>% Deflazacort</b>
5	2.040.307,40	20,92
10	3.056.681,00	31,96
15	4.268.222,40	44,63
20	5.851.511,10	61,18
25	6.614.054,40	72,48
30	7.714.054,70	84,54
45	8.015.698,90	89,45
60	10.711.785,50	96,93

Tabla XXIII. Resultados obtenidos del análisis de tabletas de deflazacort de 6 mg controladas y no controladas con las condiciones finales del ensayo de disolución. La tabla muestra los promedios de las tres inyecciones realizadas por cada vaso del disolutor con las condiciones finales.

Equipo:	2 (Paletas)	
Temperatura:	37°C +/-0,5°C	
Medio:	Agua 0,1%SDS	
Velocidad:	50 rpm	
Tiempo (min)	Area	% Deflazacort
<b>v1*1</b>	<b>6.725.727</b>	<b>63,84</b>
v2	8.213.609	81,05
v3	8.965.231	84,67
v4	8.348.758	78,93
v5	8.484.785	80,20
v6	8.119.875	76,81
X (tab sin defectos)		77,58
S (tab sin defectos)		2,90
DRS (tab sin defectos)		0,04
Tiempo (min)	Area	% Deflazacort
<b>v1*2</b>	<b>7.251.563</b>	<b>68,73</b>
v2	8.340.855	78,86
v3	8.449.802	79,87
v4	8.302.035	78,50
v5	8.491.627	80,26
v6	8.504.542	80,38
X (tab sin defectos)		77,77
S (tab sin defectos)		0,85
DRS (tab sin defectos)		0,01
Tiempo (min)	Area	% Deflazacort
<b>v1*3</b>	<b>6.043.613</b>	<b>57,50</b>
v2	8.966.719	84,68
v3	8.686.350	82,07
v4	8.224.791	77,78
v5	8.614.585	81,41
v6	8.386.358	79,28
X (tab sin defectos)		77,12
S (tab sin defectos)		2,65
DRS (tab sin defectos)		0,03
Leyenda:		
<b>*1:</b> doble cantidad de lubricante en la formulación		
<b>*2:</b> mayor dureza de la especificada en la técnica de manufactura		
<b>*3:</b> cambio de un excipiente		



**Tabla XXIV. Resultados obtenidos del análisis de tabletas de deflazacort de 6 mg con las condiciones finales del ensayo de disolución.** La tabla muestra los promedios de las tres inyecciones realizadas por cada vaso del disolutor con las condiciones finales

<b>Equipo:</b>	2 (Paletas)	
<b>Temperatura:</b>	37°C +/-0,5°C	
<b>Medio:</b>	Agua 0,1%SDS	DFZ
<b>Velocidad:</b>	50 rpm	
<b>Muestra</b>	<b>Area</b>	<b>% Deflazacort</b>
1	8.516.861,00	80,50
2	9.021.451,00	85,19
3	8.526.669,00	80,59
4	8.622.232,00	81,48
5	8.677.580,00	81,99
6	8.861.386,00	83,70
7	8.610.426,00	81,37
8	8.550.385,00	80,81
9	8.841.521,00	83,52
10	8.542.818,00	80,74
11	8.613.122,00	81,39
12	8.619.507,00	81,45
13	8.404.211,00	79,45
14	8.793.995,00	83,07
15	8.834.566,00	83,45
16	8.487.237,00	80,22
17	8.961.901,00	84,63
18	8.235.465,00	77,88
19	9.360.727,00	88,34
20	7.989.722,00	75,60
21	8.577.541,00	81,06
22	8.361.301,00	79,05
23	8.480.143,00	80,16
24	8.613.100,00	81,39
X		81,54
S		2,56
DSR		0,03

**Tabla XXV. Resultados obtenidos del análisis de Calcort<sup>®</sup> 6 mg con las condiciones finales del ensayo de disolución.**

<b>Equipo:</b>	2 (Paletas)	
<b>Temperatura:</b>	37°C +/-0,5°C	
<b>Medio:</b>	Agua 0,2%SDS	CALCORT
<b>Velocidad:</b>	50 rpm	
<b>Vaso</b>	<b>Area</b>	<b>% Deflazacort</b>
<b>1</b>	8.394.076,00	79,36
<b>2</b>	8.763.234,00	82,79
<b>3</b>	8.074.050,00	76,38
<b>4</b>	8.474.366,00	80,10
<b>5</b>	8.780.254,00	82,95
<b>6</b>	8.467.660,00	80,04
	X	80,27
	S	2,43
	DSR	0,03