

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



**DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA POR HPLC PARA LA DETERMINACIÓN
DE CLORHIDRATO DE PROPAFENONA EN TABLETAS RECUBIERTAS**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO presentado
ante la ilustre Universidad Central de Venezuela
por la Br. Yennifer Zulay Martínez Agro, para
optar por el título de Licenciado en Química,
opción Básica.

Tutor:

Dr. Luis Gómez.

Esp. Marisabel Bor

Caracas, mayo de 2014.

Yo: **Luis Gómez**, Profesor e Investigador del Centro de Investigación de química analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela y la Profesora **Marisabel Bor** Investigadora del Laboratorio de análisis de medicamentos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela. Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

“DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA POR HPLC PARA LA DETERMINACIÓN DE CLORHIDRATO DE PROPAFENONA EN TABLETAS RECUBIERTAS”

Que presenta la Br. **Yennifer Zulay Martínez Agro**, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Laboratorio de análisis de medicamentos de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2013 y 2014 y con esta fecha autorizamos su presentación.

Tutor

Tutor

Caracas, mayo de 2014

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares comprenden diferentes patologías que afectan desde sistema circulatorio hasta el corazón. Estas enfermedades se pueden presentar con diversas manifestaciones clínicas y en algunos casos el primer indicio son las arritmias. Uno de los fármacos empleados en nuestro país es el Clorhidrato de Propafenona, que es expendido en forma de tabletas recubiertas, su método de análisis no aparece reportado en ninguna de las monografías oficiales, por lo tanto, en este trabajo de investigación se propuso desarrollar un método analítico empleando la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.

Las condiciones cromatográficas del método fueron las siguientes: se empleó una columna μ Bondapak, de fase inversa octadecilsilano, de 3,9 mm de diámetro interno y 300 mm de longitud, un tamaño de partícula irregular de 10 μ m. La fase móvil estaba compuesta por un buffer fosfato dibásico de potasio: acetonitrilo en una proporción (45:55), el flujo de la fase móvil de 1,5 mL/min, el volumen de inyección de 10 μ L y la longitud de onda de 248 nm. Al validar el método bajo el protocolo establecido por el apartado <1225> USP 35-NF30 se consiguió que los procedimientos empleados proporcionaron resultados con aceptable confiabilidad.

Además, se desarrolló y se validó un método para el ensayo de disolución. Esta es una prueba que permite evaluar la correcta liberación del principio activo. Para el ensayo de disolución las condiciones del análisis fueron las siguientes: se empleó como medio de disolución 900 mL de ácido clorhídrico 0,1 N, a una temperatura de 37°C. El ensayo de disolución se realizó en 45 minutos y se analizaron las muestras obtenidas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 251 nm.

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: **“DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA POR HPLC PARA LA DETERMINACIÓN DE CLORHIDRATO DE PROPAFENONA EN TABLETAS RECUBIERTAS”** presentado por la Br. Yennifer Zulay Martínez Agro, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.

Dr. Luis Gómez
(Tutor)

Esp. Marisabel Bor
(Tutor)

Lic. Gustavo Pérez
(Jurado)

Dra. María Rodríguez
(Jurado)

Agradecimientos

Gracias a Dios por darme vida y salud para cumplir mi meta. A mis padres porque desde pequeña me ofrecieron la mejor educación. Por todos los sacrificios que hicieron para que hoy en día cumpliera uno de mis sueños, ser una profesional. No hay palabras para definir el amor que les tengo. Decir que los amo, se queda corto. Simplemente, son los mejores padres del mundo. Gracias abuela, sé que desde el cielo estás muy orgullosa de mí. Haber compartido todos estos años contigo fue el mejor regalo que me pudo dar Dios. Tus consejos siempre los tengo presente, no hay día que no mire tu jardín deseando que estuvieras ahí, regando tus flores.

Al resto de mi familia, porque siempre se han sentido muy orgullosos de mí, sus palabras de aliento me dieron mucho ánimo para cumplir este gran sueño.

Mi lista de amigos es larga, no quisiera que ninguno quedara por fuera. Por eso, le agradezco a todos por haber compartido conmigo este largo camino, por brindarme su apoyo en los buenos y malos momentos. Por esas conversaciones que quedaron en mi memoria y corazón. Los quiero y nunca los olvidaré.

Y por último, pero no menos importante. Les agradezco a mis tutores Marisabel Bor y Luis Gómez, por guiarme en esta última etapa de la carrera, por enseñarme que además de ser unos excelentes profesores, son unos grandes seres humanos. Que Dios los bendiga.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	14
II.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	15
II.1.	Aspectos Generales de las enfermedades cardiovasculares.....	15
II.1.1.	Enfermedades Cardiovasculares.....	15
II.1.2.	Enfermedades cardiovasculares en Venezuela.....	18
II.2.	Generalidades de las arritmias cardíacas	19
II.2.1.	Arritmias	19
II.2.2.	Fármacos cardiovasculares.....	20
II.2.3.	Fármacos antiarrítmicos	21
II.3.	Clorhidrato de Propafenona	23
II.3.1.	Generalidades	23
II.3.2.	Propiedades farmacocinéticas.....	25
II.3.3.	Contraindicaciones	25
II.3.4.	Advertencias y precauciones especiales de empleo	26
II.3.5.	Método analíticos para la determinación de Clorhidrato de Propafenona	27
II.4.	Métodos Cromatográficos	28
II.4.1.	Cromatografía líquida	29
II.4.2.	Modos de separación por HPLC.....	31
II.4.3.	Cromatografía de reparto en fase inversa	35
II.5	Validación de métodos analíticos	38
II.5.1	Parámetros de validación	41

II.5.1.1. Exactitud.....	41
II.5.1.2. Precisión.....	42
II.5.1.3. Especificidad	43
II.5.1.4. Límite de detección	44
II.5.1.5. Límite de Cuantificación	45
II.5.1.6. Linealidad	45
II.5.1.7. Rango	46
II.5.1.8. Robustez	46
II.6. Perfiles de disolución <i>in vitro</i> y su importancia	49
II.6.1. Estudios de disolución <i>in vitro</i> en Venezuela	51
II.6.2. Metodología estadística utilizada para la comparación de perfiles de disolución	52
II.6.2.1 Método del modelo independiente.....	52
III. ANTECEDENTES.....	55
IV. JUSTIFICACIÓN.....	70
V. OBJETIVOS.....	71
VI. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	72
VI.1. REACTIVOS	72
VI.2. INSTRUMENTACIÓN	73
VI.3. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO DE MEDIDA	76
VI.3.1 Condiciones Cromatográficas Preliminares	76
VI.3.2 Optimización de las Condiciones Cromatográficas Preliminares.....	80
VI.3.3 Procedimiento de tratamiento de muestra	82

VI.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE MEDIDA.....	84
VI.4.1 Validación del Método Analítico para la determinación del Clorhidrato de propafenona en tabletas recubiertas	84
VI.4.1.1 Evaluación de las figuras de mérito del sistema cromatográfico.....	84
VI.4.1.2. Linealidad	86
VI.4.1.3 Límites de detección y cuantificación	88
VI.4.1.4. Precisión	89
VI.4.1.4.1 Precisión del sistema	89
VI.4.1.4.2. Repetibilidad	90
VI.4.1.4.3. Precisión intermedia.....	91
VI.4.1.5 Robustez.....	93
VI.4.1.6. Especificidad	95
VI.4.1.7. Exactitud.....	108
VI.6 ENSAYO DE DISOLUCIÓN.....	111
VI.6.1. Selección de la longitud de onda	112
VI.6.2. Procedimiento del ensayo de disolución	113
 VI.7. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA EL ENSAYO DE DISOLUCION DE CLORHIDRATO DE PROPAFENONA EN TABLETAS RECUBIERTAS	114
VI.7.1 Linealidad y Rango	114
VI.7.2. Precisión.....	116
VI.7.2.1. Repetibilidad	116
 VI.8. PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVOS	118
 VI.9. APLICACIÓN DE LA METODOLOGIA ANALITICA VALIDADA EN EL ANÁLISIS DE TABLETAS DE CLORHIDRATO DE PROPAFENONA EN OTROS MEDICAMENTOS.....	122
VI.9.1 Determinación Cuantitativa de Clorhidrato de Propafenona en tabletas recubiertas	122

VII.	CONCLUSIONES	124
VIII.	RECOMENDACIONES	127
IX.	ANEXOS	128
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I. Estructura química de Propafenona	23
Figura II. Sílice hidrolizada	36
Figura III. Siloxanos.....	36
Figura IV: Cromatogramas. A- Extracto de Suero humano con estándar interno. B- Extracto de suero humano con propafenona, 5-OH propafenona y estándar interno. C- Extracto de Suero de pacientes con estándar interno.....	64
Figura V. Sistema HPLC.	74
Figura VI. Equipo Disolutor.....	74
Figura VII. Espectrofotómetro UV-Visible.	75
Figura VIII. Espectro de absorción UV del patrón de clorhidrato de propafenona	77
Figura IX. Cromatograma del estándar de clorhidrato de propafenona con las condiciones preliminares.....	78
Figura X. Cromatograma de la muestra con las condiciones cromatográficas preliminares.....	77
Figura XI. Fase móvil (45:55) con un volumen de inyección de 10 µL.	78
Figura XII. Curva de calibración día I	87
Figura XIII. Curva de calibración día II	87
Figura XIV. Curva de calibración día III	88
Figura XV. Gráfico de pureza del pico del patrón de clorhidrato de propafenona	97
Figura XVI. Cromatograma y gráfico de pureza del pico de clorhidrato de propafenona correspondiente al patrón control	98

Figura XVII. Cromatograma y gráfico de pureza del pico de clorhidrato de propafenona correspondiente a la muestra control	99
Figura XVIII. Cromatograma y gráfico de pureza del pico de clorhidrato de propafenona en la muestra de referencia sometida a termólisis	100
Figura XIX. Cromatograma y gráfico de pureza del pico de clorhidrato de propafenona en la muestra de referencia sometida a hidrólisis ácida	102
Figura XX. Cromatograma y gráfico de pureza del pico de clorhidrato de propafenona en la muestra de referencia sometida a hidrólisis básica	103
Figura XXI. Cromatograma y gráfico de pureza del pico de clorhidrato de propafenona en la muestra de referencia sometida a oxidación con peróxido de hidrógeno durante 7 días	105
Figura XXII. Cromatograma y gráfico de pureza del pico de clorhidrato de propafenona en la muestra de referencia sometida a radiación UV	106
Figura XXIII. Cromatograma y gráfico de pureza del pico de clorhidrato de propafenona en la muestra de referencia 7 días después de su preparación.	107
Figura XXIV. Espectro de absorción UV del patrón de clorhidrato de propafenona	112
Figura XXV. Curva de calibración I.....	115
Figura XXVI. Curva de calibración II.....	115
Figura XXVII. Curva de calibración III.....	116
Figura XXVIII. Gráfico de los perfiles de disolución de los medicamentos Rytmonorm y Normorytmin.....	120

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Modelo de la transición epidemiológica	16
Tabla II. Características analíticas típicas utilizadas para la validación de métodos.....	39
Tabla III. Datos requeridos para la validación	41
Tabla IV. Diseño de la matriz Plackett y Burman	48
Tabla V. Cálculo de la diferencia de respuesta para cada parámetro.....	48
Tabla VI. Gradiente de eluente	56
Tabla VII. Gradiente de eluentes	59
Tabla VIII. Estabilidad de una formulación extemporánea de propafenona sometida a condiciones de temperatura ambiente y de refrigeración	66
Tabla IX. Cantidad de clorhidrato de propafenona obtenida en los dos métodos del tratamiento de muestra	83
Tabla X. Evaluación de las figuras de mérito del sistema cromatográfico	85
Tabla XI. Concentraciones de clorhidrato de propafenona para la curva de calibración	86
Tabla XII. Precisión del sistema (patrón)	89
Tabla XIII. Repetibilidad del método analítico para el clorhidrato de propafenona presente en la muestras	90
Tabla XIV. Precisión intermedia con diferentes analistas	92
Tabla XV. Factores seleccionados para la evaluación de la robustez	93

Tabla XVI. Diseño de la matriz según el modelo de Plackett-Burman	94
Tabla XVII. Áreas obtenidas en los 8 experimentos (Patrón)	128
Tabla XVIII. Áreas obtenidas en los 8 experimentos (Muestra)	129
Tabla XIX. Interpretación de los resultados para el estudio de la robustez.	95
Tabla XX. Áreas de las muestras sin fortificar y fortificadas.	130
Tabla XXI. Concentraciones de clorhidrato de propafenona en la muestra de referencia sin fortificar y fortificadas.....	109
Tabla XXII. Porcentaje de recuperación	109
Tabla XXIII. Condiciones del ensayo de disolución propuesto por la FDA	111
Tabla XXIV. Concentraciones de clorhidrato de propafenona para la curva de calibración	114
Tabla XXV. Repetibilidad.	117
Tabla XXVI. Perfil de disolución de tabletas recubiertas de clorhidrato de propafenona 150mg. (Rytmonorm)	118
Tabla XXVII. Perfil de disolución de tabletas recubiertas de clorhidrato de propafenona 150mg. (Normorytmin)	119
Tabla XXVIII. Cálculo del factor de diferencia y factor de similitud.	120
Tabla XXIX. Cantidad de clorhidrato de propafenona en Normorytmin	122

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares comprenden diferentes patologías que afectan desde sistema circulatorio hasta el corazón mismo. Según los datos suministrados por la Organización Mundial de la Salud, estas enfermedades constituyen hoy en día la principal causa de muerte en el mundo y se prevé que lo siga siendo, debido al aumento de su incidencia en los países con menos recursos, así como, el aumento en la expectativa de vida de la población. Estas enfermedades pueden presentarse con diversas manifestaciones clínicas, y en algunos casos el primer indicio son las arritmias.

El tratamiento para las arritmias ha cambiado radicalmente en los últimos 15 años. Se han empleado una serie de fármacos antiarrítmicos en pacientes cardiopatas con historias de arritmias graves o en riesgo de sufrirlas. Por consiguiente, se hace necesario garantizar que los medicamentos antiarrítmicos cumplirán con los parámetros de calidad establecidos por los entes reguladores de medicamentos, todo ello con la finalidad de certificar que los mismos surtirán el efecto terapéutico esperado.

Uno de los fármacos empleados en nuestro país es el Clorhidrato de Propafenona, que es expendido en forma de tabletas recubiertas, su método de análisis no aparece reportado en ninguna de las monografías oficiales, por lo tanto, en este trabajo de investigación se propone desarrollar un método analítico empleando la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia para la determinación de la cantidad de Clorhidrato de Propafenona en tabletas recubiertas.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. Aspectos Generales de las enfermedades cardiovasculares

II.1.1. Enfermedades Cardiovasculares

La enfermedad cardiovascular comprende diferentes patologías que afectan al corazón y al sistema circulatorio. ^[1] Los ataques al corazón ocurren cuando los vasos sanguíneos que lo inervan quedan obstruidos. ^[2]

La Organización Mundial de la Salud (OMS), señala que las enfermedades cardiovasculares (ECV) más frecuentes son:

- **La cardiopatía coronaria:** enfermedad de los vasos sanguíneos que irrigan el músculo cardíaco (miocardio);
- **Las enfermedades cerebrovasculares:** enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro;
- **Las arteriopatías periféricas:** enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan los miembros superiores e inferiores;
- **La cardiopatía reumática:** lesiones del miocardio y de las válvulas cardíacas debidas a la fiebre reumática, una enfermedad causada por bacterias denominadas estreptococos;
- **Las cardiopatías congénitas:** malformaciones del corazón presentes desde el nacimiento;

- **Las trombosis venosas profundas y embolias pulmonares:** coágulos de sangre (trombos) en las venas de las piernas, que pueden desprenderse (émbolos) y alojarse en los vasos del corazón y los pulmones.

Según los datos suministrados por la OMS, estas enfermedades constituyen hoy en día la principal causa de muerte en el mundo. En 2002 fallecieron 16,7 millones de personas por ECV, el 30 % de todas las defunciones. El primer lugar lo ocupó la enfermedad isquémica del corazón 87,2 millones de defunciones, seguida por las cerebro vasculares, aunque con algunas variaciones según los países.

Los ataques al corazón y los accidentes cerebro vasculares (ACV) suelen ser fenómenos agudos que se deben sobre todo a obstrucciones que impiden que la sangre fluya hacia el corazón o el cerebro. La causa más frecuente es la formación de depósitos de grasa en las paredes de los vasos sanguíneos que irrigan el corazón o el cerebro. Los ACV también pueden ser ocasionados por hemorragias de los vasos cerebrales o coágulos de sangre. ^[3]

Con el propósito de comprender la situación de estas enfermedades en diferentes países del mundo, Omran propuso en 1971 el siguiente modelo de transición epidemiológico ^[4] (ver tabla I).

Tabla I. Modelo de la transición epidemiológica

Primera fase	Las enfermedades cardiovasculares se deben a infecciones y defectos de la nutrición.
Segunda fase	El desarrollo socioeconómico modifica la composición de la dieta y aumenta el contenido de sal de los alimentos. Origina hipertensión y accidentes cerebrovasculares.

Tercera Fase	Una dieta rica en calorías y grasas saturadas, la introducción del hábito de fumar cigarrillos, la reducción de la actividad física y el aumento del estrés mental preceden a la aparición de la cardiopatía coronaria.
Cuarta fase	La reducción de los factores de riesgo y otras medidas retrasan la edad de aparición de la clínica de las enfermedades cardiovasculares degenerativas.

La mayoría de las ECV pueden prevenirse actuando sobre los factores de riesgo mencionados en la tabla I, ya que estas enfermedades constituyen la primera causa de defunción en el mundo y se prevé que lo sigan siendo, debido al aumento de su prevalencia en los países con menos recursos y al envejecimiento de la población. [5]

Las enfermedades cardiovasculares pueden presentarse con diversas manifestaciones clínicas. En algunos casos, el primer indicio es una complicación cardiovascular grave, como un infarto agudo de miocardio; una arritmia. Lo más habitual es que los pacientes empiecen a sentir algún síntoma leve, que indica que el organismo ya no es capaz de compensar el mal funcionamiento del sistema cardiovascular [6]. Entre estos síntomas leves se encuentran ciertos tipos de dolor, disnea (sensación de falta de aire), palpitaciones (la sensación de un latido lento, rápido o irregular), fatiga, sensación de mareo y desmayos. Sin embargo, el dolor torácico puede indicar una enfermedad del corazón, pero también un puede ser debido a un trastorno gastrointestinal, un dolor mecánico o un síntoma de ansiedad. [7]

Dado que las ECV guardan una estrecha relación con los factores socioeconómicos, su prevalencia varía según el momento histórico y el país. En la actualidad, más del 80% de las defunciones por ECV se producen en los países de ingresos económicos bajos y medios; en los países más desarrollados, en cambio la mortalidad por dichas enfermedades está descendiendo debido a la mejora en la asistencia sanitaria. [5]

La OMS ha identificado intervenciones muy costosas y eficaces para prevenir y controlar las ECV, cuya aplicación es factible incluso en entornos con escasos recursos. Es posible reducir el riesgo de ECV realizando actividades físicas de forma regular; evitando la inhalación activa o pasiva de humo de tabaco; consumiendo una dieta rica en frutas y verduras; evitando los alimentos con muchas grasas, azúcares y sal, manteniendo un peso corporal saludable y evitando el consumo nocivo de alcohol. [3]

II.1.2. Enfermedades cardiovasculares en Venezuela

Desde 1959, las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de muerte de la población venezolana, observándose un ascenso progresivo en la tasa de morbi-mortalidad. Para el año 2000, de acuerdo al reporte realizado por el Ministerio de Salud y Desarrollo Social, la tasa de mortalidad por ECV disminuyó a 91,4 por cada 100.000 habitantes, aunque todavía continua siendo la primera causa de mortalidad de la población venezolana. Dentro de este tipo de enfermedades, el infarto al miocardio tiene la mayor incidencia con 12,87 %, según datos del Ministerio del Poder Popular para la Salud. Las enfermedades cardiovasculares no sólo cobran millones de vidas en todo el mundo sino que también son causantes de incapacidad, situación que genera sufrimiento entre los familiares del paciente; además de disminuir su calidad de vida, pues este tipo de tratamiento suele ser muy costoso. Por tal razón, es primordial tomar consciencia y comprender que la prevención cardiovascular es un tema de atención primaria. [8]

Actualmente, en el mercado venezolano existe un gran número de fármacos destinados a ayudar al paciente en la prevención de eventos cardiovasculares. [8]

II.2. Generalidades de las arritmias cardíacas

II.2.1. Arritmias

Las arritmias cardíacas se definen como trastornos del ritmo cardíaco y pueden atribuirse a un aumento (taquiarritmia) o a una disminución (bradiarritmia) anormal de la frecuencia cardíaca, acompañados o no de irregularidad del ritmo. En ausencia de cardiopatía estructural, las arritmias pueden producir graves alteraciones funcionales, como taquicardias paroxísticas e incluso muerte súbita. Ciertas arritmias, especialmente aquellas que duran lo suficiente como para afectar el funcionamiento del corazón, pueden ser serias o fatales. ^[9]

La mayoría de las personas adultas, en algún momento, experimenta cambios breves e inofensivos del ritmo del corazón. El envejecimiento de la población y alta prevalencia de cardiopatía isquémica y de insuficiencia cardíaca aumenta el riesgo de muerte súbita por arritmias ventriculares. ^[9]

El tratamiento de las arritmias ha cambiado de forma radical en los últimos 15 años con el desarrollo de:

a) La ablación con catéter, capaz de eliminar el sustrato de taquicardias nodales, vías accesorias, arritmias auriculares focales y algunas taquicardias ventriculares.

b) La implantación de desfibradores que reducen el riesgo de muerte arrítmica en pacientes con cardiopatía estructural grave. [9]

Sin embargo, el uso de fármacos antiarrítmicos sigue aumentando, fundamentalmente, por el incremento en la prevalencia de la fibrilación auricular, las arritmias más frecuentes y la que mayores costes sanitarios ocasiona. [9]

II.2.2. Fármacos cardiovasculares

Para cada indicación existen distintos tipos de fármacos que pueden ser eficaces y dentro de cada clase hay muchas opciones. Los factores que llevan a la selección de un fármaco específico para un paciente dado son muchos e implican tanto la ciencia como el arte de la medicina. Incluidos en el proceso de toma de decisiones están la experiencia del médico, la respuesta terapéutica deseada, la administración, los efectos secundarios, el coste y las interacciones potenciales con otros fármacos. Además, la industria farmacéutica puede tener influencias sutiles y no sutiles en la selección de fármacos específicos mediante el empleo de anuncios inteligentes, vendedores convincentes, y exposiciones en reuniones científicas. [10]

Las distintas indicaciones clínicas para iniciar la farmacoterapia en ECV son las siguientes:

- Alivio de la angina de pecho.
- Tratamiento de una insuficiencia cardíaca.
- Tratamiento de la hipertensión. ^[10]

Entre todas las indicaciones anteriores, las arritmias cardíacas son motivo de consulta frecuente, tanto en las urgencias como en la práctica clínica diaria, y continúan siendo un reto para el diagnóstico y manejo apropiado. ^[11]

II.2.3. Fármacos antiarrítmicos

Los fármacos antiarrítmicos forman un grupo heterogéneo de sustancias, tanto en su estructura química como en su mecanismo de acción ^[9]. Han sido desarrollados con la esperanza de mejorar el pronóstico de los pacientes cardiopatas con historia de arritmias graves o en riesgo de sufrirlas; sin embargo, estos fármacos no están exentos de un efecto proarrítmico y poseen una toxicidad no desdeñable. En los estudios sobre mortalidad no se han demostrado beneficios claros e incluso con diversos fármacos se ha observado empeoramiento de las tasas de mortalidad. ^[11]

La clasificación de los fármacos antiarrítmicos, propuesto en 1984 por Vaughan William, es la siguiente:

Grupo I. Bloqueantes de los canales de sodio dependientes de voltaje.

Clase IA: quinidina, procainamida, disopiramida.

Clase IB: lidocaína, mexiletina, fenitoína.

Clase IC: flecainida, encainida, propafenona.

Grupo II. Antagonistas de receptores β -adrenérgicos.

Grupo III. Fármacos que prolongan la duración del potencial de acción y el período refractario cardíaco.

Grupo IV. Fármacos bloqueantes de los canales de calcio tipo L dependientes de voltaje.

Una de las reacciones adversas más peligrosas de los antiarrítmicos es el agravamiento de la arritmia original o la inducción de nuevas arritmias que pueden ser incluso mortales (efectos proarrítmicos). La depresión de la excitabilidad constituye, simultáneamente, el origen de los efectos antiarrítmicos y proarrítmicos de los antiarrítmicos del grupo I, y cuanto más deprimen la excitabilidad más potentes son sus efectos antiarrítmicos, mayor riesgo entrañan. [9]

Las acciones proarrítmias de los antiarrítmicos del grupo I son más acusadas en los individuos con cardiopatía isquémica, que han sufrido previamente un infarto o que tienen insuficiencia cardíaca; por todo ello, los antiarrítmicos más potentes del grupo I, propafenona y flecainida, sólo se utilizan en pacientes sin cardiopatía asociada. [9]

Todos los antiarrítmicos del grupo I son bases débiles. Estos presentan importantes diferencias farmacológicas entre sí, que no se limitan al tipo de bloqueo del canal de sodio que producen. Exceptuando la lidocaína, todos ellos bloquean en mayor o menor medida algunos de los canales de potasio y/o calcio. Utilizando como criterio el tiempo que prolongan la reactivación del canal de sodio, estos se han subclasificado en tres grupos mencionados anteriormente: IA, IB, y IC. Los agentes más eficaces del grupo I, son los agentes IC, la flecainida y la propafenona. Aunque ninguno de estos 2 fármacos

deben ser utilizados en pacientes con cardiopatía sobre todo si han tenido un infarto previo. Estos son los que más retrasan la reactivación del canal, llegando hasta aproximadamente 12 segundos. Por ello deprimen la velocidad de conducción intracardíaca y prolongan el intervalo QRS (representación gráfica de la activación de los ventrículos del corazón formando una estructura picuda en el electrocardiograma) cuando el paciente está en ritmo sinusal. [9]

La propafenona es efectiva para tratar una amplia variedad de arritmias supraventriculares y ventriculares.

II.3. Clorhidrato de Propafenona

II.3.1 Generalidades

El clorhidrato de propafenona o Clorhidrato de 1-[2-[(2RS)-2-Hidroxi-3-(propilamino) propoxi] fenil] -3-fenilpropan-1-ona y de fórmula condensada: $C_{21}H_{27}NO_3 \cdot HCl$, fue sintetizada en 1970. [12] Es soluble en agua caliente, alcohol y ligeramente soluble en agua fría. La estructura química del clorhidrato se muestra en la figura I. [13]

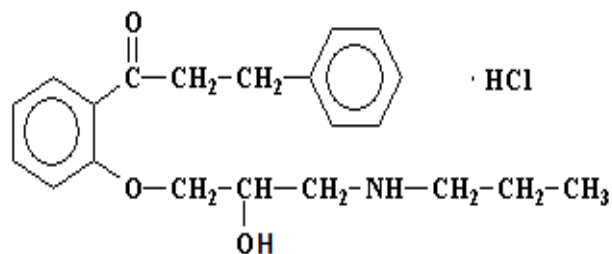


Figura I. Estructura química de Propafenona.

El clorhidrato de propafenona es un fármaco antiarrítmico clase I, con acción anestésica local. ^[14] Es un bloqueador de los canales de sodio con una constante de tiempo relativamente lenta para la recuperación luego del bloqueo. Al igual que la flecainida, este también bloquea los canales de potasio, en menor grado disminuye también la corriente de entrada de calcio y presenta propiedades β -bloqueantes. ^[15]

En cardiología, los fármacos β -bloqueantes se utilizan como antihipertensivos en la cardiopatía isquémica, en la insuficiencia cardiaca y como antiarrítmicos. Como antiarrítmicos, sus principales usos son:

- 1- Tratamiento de la taquicardia sinusal inapropiada.
- 2- Tratamiento de la extrasistolia supraventricular y ventricular.
- 3- Tratamiento de taquicardias auriculares (sobre todo si son desencadenadas por esfuerzo, emoción o ansiedad). ^[12]

El medicamento se prescribe como un racemato; en tanto a los enantiómeros no difieren en cuanto a sus propiedades bloqueadoras de los canales de sodio, pero la actividad β -bloqueante de (+)-S-propafenona es 50-100 veces mayor que la (-)-R-propafenona ^[16]. Reduce la velocidad de incremento del potencial de acción y por eso disminuye la conducción de los impulsos. Prolonga los periodos refractarios en la aurícula, en el nódulo auriculoventricular y en los ventrículos. ^[17]

Se puede administrar por vía oral e intravenosa. Por vía oral se absorbe más del 95 %. Se metaboliza rápidamente y menos de un 1 % se excreta sin metabolizar por el riñón. La vida media del fármaco es de 7 horas, pero existe una gran variabilidad individual.

Por vía oral se suministra dosis de 150-300 mg cada 8 horas; y por vía intravenosa, la dosis es de 1- 2 mg/kg. ^[12]

II.3.2 Propiedades farmacocinéticas

La propafenona se elimina por biotransformación oxidativa en el hígado, a través de la isoenzima CYP2D6 del citocromo P-450, con producción de 5-hidroxi propafenona, que es más potente como bloqueador de los canales de sodio pero menos antagonista de los receptores α -adrenérgicos que la propafenona. Otras rutas oxidativas hepáticas dan lugar a N-desalquilpropafenona, menos activa que la propafenona.

El fármaco es metabolizado de forma rápida y extensa en más del 90 % de los pacientes, con una semivida de eliminación de 2 a 10 horas. Estos pacientes metabolizan el clorhidrato de propafenona en dos metabolitos activos: 5-hidroxi propafenona (formado por la isozima CYP2D6) y N-depropilpropafenona o norpropafenona (formado por las isozimas CYP3A4 y CYP1A2). Menos del 10 % de los pacientes experimenta un metabolismo más lento, esto puede atribuirse al hecho de que no se forma el 5-hidroxi propafenona o se produce en mínima cantidad, este posee un efecto antiarrítmico comparable al de la sustancia intacta. ^[17]

II.3.3 Contraindicaciones

Se han reportado una serie de contraindicaciones producto de la administración de propafenona, estas son:

- Hipersensibilidad a cualquiera de los excipientes.
- Enfermedad pulmonar obstructiva grave.
- Hipersensibilidad al Clorhidrato de propafenona.
- Enfermedad cardíaca estructural significativa como:
 - Incidente de infarto de miocardio dentro de los últimos 3 meses.
 - Insuficiencia cardíaca congestiva no controlada donde la fracción de eyección del ventrículo izquierdo es menor del 35 %.
 - Bracardia sintomática grave.
 - Hipotensión severa. ^[17]

II.3.4. Advertencias y precauciones especiales de empleo

Es esencial que cada paciente sea evaluado clínicamente con un electrocardiograma, antes y durante la terapia para determinar si la respuesta a la propafenona justifica el tratamiento continuado. Debido al efecto β -bloqueante, debe tenerse precaución con pacientes que presenten obstrucción de las vías aéreas, por ejemplo, personas con asma. ^[17]

Como sucede con otros antiarrítmicos de clase IC, los pacientes con enfermedad cardíaca estructural significativa pueden estar predispuestos a acontecimientos adversos graves, por lo tanto está contraindicada en estos pacientes. El tratamiento puede afectar los umbrales de estimulación y detección de los marcapasos artificiales. En consecuencia, los marcapasos deben monitorizarse y programarse durante el tratamiento. ^[17]

Las reacciones adversas más graves no son las digestivas (sabor metálico, anorexia) ni las neurológicas (mareos, temblor, parestesias, visión borrosa), sino las cardiovasculares. La propafenona puede producir hipotensión, depresión de la contractilidad, bradicardia, bloqueo de la conducción intraventricular, así como arritmias cardíacas. Sus acciones proarrítmicas se manifiestan en el 5 - 15 % de los enfermos y son mucho más frecuentes en los pacientes que más necesitan el tratamiento antiarrítmico (los que presentan trastornos de la conducción intracardíaca, isquemia, insuficiencia cardíaca).^[17]

II.3.5. Método analíticos para la determinación de Clorhidrato de Propafenona

El análisis de Clorhidrato de Propafenona en tabletas recubiertas no aparece reportado en ninguna de las monografías oficiales. Sin embargo, se han descrito varias metodologías analíticas para la determinación del mismo en una variedad de matrices, entre las técnicas analíticas reportadas se encuentran: espectroscopia molecular UV y el HPLC.

La técnica de HPLC es una de las adecuadas debido a su capacidad de separación, gran aplicabilidad a diferentes tipos de sustancias, y su capacidad para realizar determinaciones cuantitativas exactas.^[18] De hecho, es la técnica reportada en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) y la Farmacopea Británica (BP) para la estudio de las sustancias relacionadas del clorhidrato de propafenona en materia prima.

[33, 34]

Del párrafo anterior se puede inferir que si HPLC es la técnica más conveniente para la determinación de las sustancias relacionadas del clorhidrato de propafenona en materia prima, más aún, para el análisis del mismo en fármacos, ya que pueden existir

compuestos que pudiesen interferir con una medida directa por espectroscopía molecular UV.

II.4. Métodos Cromatográficos

Según la definición establecida por la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) “La cromatografía es un método, usado principalmente para la separación de los constituyentes de una muestra, en la cual los componentes de la muestra se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra es móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido, o un líquido retenido sobre un soporte sólido o gel. La fase estacionaria puede estar extendida como una capa o distribuida como una película. [19]

La muestra es introducida y transportada por la fase móvil a través de la fase estacionaria, y al estar en contacto con ambas fases la muestra va a experimentar repetidas interacciones de orden físico-químico. Aquellas componentes de la muestra que interacciones más con la fase estacionaria serán más retenidos, con respecto a los que interaccionaron menos, produciendo la consiguiente separación.

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar de distintas formas. Una disposición básica, es por la forma del contenedor donde es colocada la fase estacionaria, distinguiéndose la cromatografía en columna y la cromatografía en un plano o también conocida como “planar”. En la primera de ellas, por un tubo que contiene la fase estacionaria se hace pasar la fase móvil ejerciendo presión o no, según sea por gravedad o por empuje mediante dispositivos para tal fin. Mientras que, en la

cromatografía “planar” la fase estacionaria se fija sobre una placa altamente plana o un papel y la fase móvil se desplaza por capilaridad.

Una clasificación más idónea puede realizarse en función al tipo de fase móvil utilizada, distinguiéndose la cromatografía de gases, líquidos y de fluidos supercríticos, de ellas, las dos primeras son las más empleadas.^[18] Nuestro interés particular está dirigido a la cromatografía de líquidos, debido a la naturaleza de baja volatilidad del analito en estudio, que imposibilita analizar el compuesto de interés por cromatografía de gases.

II.4.1 Cromatografía líquida

Como mencionamos anteriormente, la cromatografía líquida en columna (CLC) es una variedad de la cromatografía en la que la fase móvil es líquida y pasa a través de la fase estacionaria, sólida o líquida, que está sostenida en un recinto cilíndrico. Con frecuencia también es llamada “cromatografía en columna” (CC) o “cromatografía líquida” (CL).^[20]

La CLC consiste en hacer pasar por gravedad la fase líquida sobre el soporte sólido (de diámetro de partículas grande) retenido en una columna recta, generalmente de vidrio, de dimensiones considerables (varios centímetros de diámetro y una altura de 5 a 10 veces el diámetro). La muestra es arrastrada por la fase móvil a través de la fase estacionaria ocurriendo la separación, para finalmente recoger las fracciones de los componentes separados.^[20]

Desde el principio del desarrollo de la cromatografía de líquidos se constató, que se conseguirían importantes aumentos en la eficacia de la separación disminuyendo el tamaño de partícula de los empaques. Esto fue posible a finales de los años 1960, cuando se desarrolló una tecnología capaz de producir y usar empaques de diámetro de partícula tan pequeño como 10 μm . Esta tecnología necesitó de dispositivos más sofisticados, columnas de menor diámetro y longitud, bombas que proporcionaran alta presión, etc. Debido a la alta presión requerida para hacer pasar la fase móvil a través de menor diámetro de partículas y menor diámetro de columnas, la técnica en un principio fue reconocida como Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (HPLC).^[21] Con el pasar del tiempo el término de Presión cambió a Performance o Eficiencia.

HPLC es la técnica analítica de separación más utilizada en la actualidad debido a su gran aplicabilidad a diferentes tipos de sustancias (aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, fármacos, carbohidratos, entre otros), alta capacidad de separar mezclas de analitos y determinaciones cuantitativas exactas.^[18] Esta técnica utiliza una presión elevada para forzar al disolvente a que pase por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución.^[22]

HPLC no requiere de la volatilidad y estabilidad térmica de las sustancias a analizar, por otra parte, la fase móvil participa extensamente en el proceso de separación y existe una gran variedad de fases estacionarias, por lo tanto, es más versátil que la cromatografía de gases.^[13]

II.4.2 Modos de separación por HPLC

Los distintos modos o procedimientos de separación que se utilizan en HPLC tienden a ser muy variados y complementarios, por lo que suele clasificarse por los tipos de interacción que ocurren, entre ellas tenemos:

Cromatografía HPLC en el modo adsorción: Se utiliza para la separación de compuestos altamente polares insolubles en solventes polares. Los solventes muy polares tienden a desactivar la fase estacionaria, al punto que se debe evitar el agua. Los geles de sílice y la alúmina constituyen las fases más utilizadas, pero, la sílice es más empleada debido a su mayor capacidad de carga y su mayor diversidad de presentaciones. La única variable que se puede utilizar para optimizar el factor de retención (k) y el factor de separación (α) es la composición de fase móvil. Si los valores de k son muy grandes (los componentes de la muestra eluyen muy lentamente), se cambia el eluyente por uno de mayor fuerza eulotrópica. Aplicable fundamentalmente a muestras solubles en solvente no polares o moderadamente polares, es capaz de separar mezclas de compuestos isómeros posicionales. Prácticamente está fuera de uso, ya que ha sido sustituida por la cromatografía de reparto en fase normal.

Cromatografía HPLC en el modo exclusión por tamaño: Es una técnica de análisis que se aplica particularmente a especies de elevado peso molecular, con masas moleculares superiores a 10.000 Dalton. No hay interacción química entre los analitos y la fase estacionaria, ya que el tiempo de residencia va a depender del tamaño efectivo de las moléculas de los analitos. El relleno está hecho por partículas de polímeros o sílice que contiene una red de poros uniformes donde son atrapados los

componentes de la muestra. Las moléculas que son más grandes con respecto al tamaño promedio de poro del relleno son excluidas, no serán retenidas y por lo tanto son las primeras en ser eluidas, mientras que las moléculas que poseen diámetros significativamente menores, resultan atrapadas por mayor tiempo. Existen dos tipos: Cromatografía de Filtración de Gel (GFC) para polímeros solubles en agua, la fase móvil es acuosa y el empaque es un Gel hidrofílico. Mientras que la Cromatografía de Permeación de Gel (GPC) para polímeros solubles en solventes orgánicos, la fase móvil es orgánica y el empaque es poliestireno entrecruzado (hidrofóbicos). En GFC y GPC emplean el mismo mecanismo de separación. Entre las aplicaciones, tenemos la separación de polímeros, biomoléculas de alto peso molecular, etc. Una ventaja adicional, es que para series homologas, el tiempo de retención (volumen) puede ser relacionado con el logaritmo de peso molecular.

Cromatografía HPLC en el modo de intercambio iónico: La separación por este método se fundamenta en el intercambio iónico que ocurre entre iones de la muestra con los grupos iónicos enlazados al material polimérico del soporte. La magnitud de la interacción está fundamentada por el tamaño, la carga, polarizabilidad y fuerza ácida o básica de la especie. Se divide en cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía intercambio aniónico, según se analicen aniones o cationes respectivamente. Muy aplicable para cationes y aniones inorgánicos e iones orgánicos de relativo bajo peso molecular.

Cromatografía HPLC en el modo de exclusión iónica: Es el término empleado para describir el proceso de separación de especies neutras e iónicas empleando fases estacionarias de intercambio iónico. Está gobernado por mecanismos de exclusión Donnan, estéricos y procesos de adsorción. De acuerdo con la segunda ley de la termodinámica, todas las sustancias en solución tienden a difundir hasta alcanzar un

estado homogéneo donde cualquier punto en la solución, la concentración es la misma. Sin embargo, este hecho no es tan simple si existe una barrera que restrinja al paso de las sustancias. En ocasiones existe lo que se conoce como membrana semipermeable, que no es otra cosa que una barrera física para cierto tipo de sustancias. Por ejemplo, puede tratarse de una membrana que tenga poros de un diámetro pequeño, los cuales sólo permiten el paso de sustancias de un diámetro menor al de los poros; las moléculas de las sustancias que tengan un tamaño mayor no podrán difundir libremente. Esta situación se vuelve más compleja si las sustancias en solución poseen carga neta, porque entonces la difusión tenderá a reducir también la diferencia de cargas a ambos lados de la barrera. Cuando la diferencia de potencial eléctrico se establece este alcanza un equilibrio en el cual existe una diferencia de potencial constante, llamado Potencial Donnan. Se aplica para ácidos inorgánicos débiles, ácidos orgánicos, aldehídos, amino ácidos, alcoholes y carbohidratos.

Cromatografía de modo de afinidad: Se trata de un tipo especial de cromatografía de adsorción sólido-líquido en la que la sustancia de naturaleza bioquímica (anticuerpos, cofactores, inhibidores enzimáticos, lectinas y otras moléculas) denominadas ligandos de afinidad y enlazados químicamente en soportes sólidos adecuados, retienen a los solutos (analitos), también de naturaleza bioquímica, de manera reversible y selectiva. Las separaciones se basan en el acoplamiento "llave-cerradura" típico de la biología molecular.

En HPLC, cuando la fase estacionaria es un líquido unido a un sólido inerte, es conocida como cromatografía de reparto, pero también es nombrada como cromatografía de fase enlazada, ya que en la actualidad la totalidad de las fases estacionarias se encuentra unida al soporte sólido mediante un enlace covalente (mínimo sangrado). Entre ellas tenemos:

Cromatografía HPLC en fase normal: En este caso el grupo activo unido a la partícula de soporte es polar. Normalmente se comienza una fase móvil poco polar, como heptano, hexano, tetrahidrofurano, etc y se va añadiendo solventes más polares como cloruro de metileno, cloroformo. Normalmente se utiliza para la separación de compuestos polares, como aminas, anilinas, nitrogenados aromáticos, fenoles, pesticidas, etc. Los métodos de Cromatografía de Reparto en Fase Normal y Cromatografía de Adsorción tienden a ser complementarios y en muchos casos se superponen.

Cromatografía HPLC en fase inversa: El grupo activo unido a la partícula de soporte es un líquido no polar. Se utiliza para la separación de compuestos no polares o de moderada polaridad. En la mayoría de las aplicaciones de fase inversa, la elución se lleva a cabo comenzando con una fase de elevada polaridad, como es el caso de una disolución acuosa conteniendo concentraciones diversas de un solvente de menor polaridad como metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano (THF). Posteriormente se va añadiendo solventes menos polares. El 90 % de las separaciones analíticas de bajo peso molecular son llevadas a cabo por cromatografía en fase inversa, debido fundamentalmente al amplio rango de analitos que puede disolver la fase móvil, versatilidad y amplio rango de aplicación. Tiene aplicación para compuestos no iónicos, iónicos, polares y no polares.

Cromatografía HPLC en el modo de par iónico: Es un tipo de Cromatografía de Reparto en fase inversa que se utiliza para la separación de especies iónicas. La fase inversa se recubre dinámicamente por grupos iónicos, los cuales son añadidos a través de la fase móvil. En este tipo de cromatografía la fase móvil está constituida por un buffer y un reactivo iónico (Par Iónico). El contraión es de una cadena orgánica

relativamente larga y de carga opuesta al ión del analito que se desea determinar. En su área de aplicación compite con la cromatografía de intercambio iónico.

Cromatografía HPLC en el modo HILIC: Conocida como Cromatografía de Interacción Hidrofílica, es una variación de la cromatografía en fase normal. El principal mecanismo de retención es la separación de los analitos polares entre la fase estacionaria polar y la fase móvil no polar. El grado de elución es similar a aquel de la fase normal y la elución de la muestra estará en el mismo orden en que se incremente la hidrofiliidad. Se retienen analitos altamente polares que no serían retenidos con cromatografía de fase reversa. También presenta un débil mecanismo de intercambio aniónico con la fase estacionaria cargada positivamente, y en consecuencia los compuestos ácidos son fuertemente retenidos.

Como la cromatografía de reparto en fase inversa, es el método que proponen la mayoría de las monografías para la determinación de clorhidrato de propafenona, se hará énfasis en ese modo de separación por HPLC.

II.4.3. Cromatografía de reparto en fase inversa

En la cromatografía de reparto, un material sólido inerte, tal como gel de sílice o tierras de diatomeas, sirven para sostener una capa delgada de líquido, la cual es la fase estacionaria. A medida que la fase móvil transporta los analitos de la muestra a través de la fase estacionaria, se produce la retención y separación a causa de la interacción relativa de los componentes con ambas fases líquidas. Esto motiva un reparto de concentración que viene determinado por sus respectivos coeficientes de partición. ^[21]

Los soportes para casi todos los rellenos de fases unidas químicamente se preparan con sílice rígida o composiciones constituidas básicamente por sílice. Estos sólidos están formados en su mayoría por partículas mecánicamente resistentes, porosas y uniformes, con diámetros de 3, 5 o 10 μm . Para la preparación de la superficie de sílice, esta es totalmente hidrolizada por calentamiento con HCl 0,1 M durante uno o dos días. Quedando constituida por puros grupos silanoles químicamente reactivos (ver figura II).

[21]

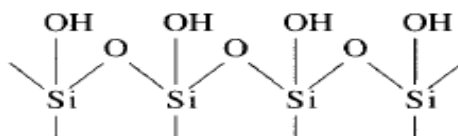


Figura II. Sílice hidrolizada

Los recubrimientos de fase unida químicamente más utilizados son los siloxanos, que se forman por reacción de la superficie hidrolizada con un organoclorosilano, ver figura III. Donde R = grupo alquilo o un grupo alquilosustituido. [21]

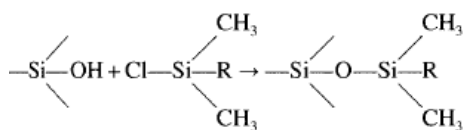


Figura III. Siloxanos

En la cromatografía de fase inversa, la fase estacionaria es no polar, por ejemplo: butil, fenil, ciclohexil y más común cadenas lineales de C₈, C₁₈. La fase móvil es polar y los compuestos no polares son retenidos de manera fuerte por el sistema, mientras que los

solutos polares eluyen de primero. Las separaciones en fase inversa son los métodos que se usan con más frecuencia en la HPLC. [19]

En cuanto al mecanismo de separación se refiere, aunque ha sido ampliamente estudiado, aún no se comprende totalmente. Como la fase estacionaria es no polar, las únicas fuerzas de interacción posible deberían ser las de Van der Waals. Sin embargo, estas fuerzas no bastan por sí mismas para justificar la retención observada. La teoría “solvolóbica” de Horváth, es probablemente la de mayor aceptación. Según esta teoría, la fuerza de retención en fase inversa se debe a un aumento de entropía que acompaña a la transferencia del soluto de la fase móvil (polar) a la fase estacionaria (no polar). Dicho de otro modo, la interacción entre moléculas de soluto y el eluyente es mucho más débil que la interacción de las moléculas de los eluentes entre sí. Como consecuencia, el soluto es expulsado de la fase móvil y forzado a penetrar en la fase estacionaria, que actúan como receptor pasivo. [19]

En HPLC en fase inversa (RP-HPLC), se observa que al aumentar la longitud de la cadena hidrocarbonada de C₁ a C₂₂, la retención aumenta como máximo en un factor de 10, a diferencia de la variación de retención que puede obtenerse por adición de un modificador orgánico, en cuyo caso la retención se reduce en un factor de 2 a 3 por cada 10 % de modificador agregado. El tipo de sustituyente más empleado en fase reversa es de tipo alquílico, especialmente C₁₈ y en menor proporción C₈, con menor o mayor grado de cobertura (capa monomérica o polimérica). [19]

La fase móvil está constituida por un solvente polar, mezcla de agua y un modificador orgánico, a los que se le podrá agregar aditivos, sales o buffer. A mayor proporción de modificador orgánico corresponde menor retención, y a mayor proporción de agua,

mayor retención. Los solventes de mayor empleo en RP-HPLC son: el agua, metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano. Los modificadores orgánicos (metanol, acetonitrilo, etc.) actúan como inhibidores del crecimiento bacteriano. Se considera que el agua actúa como transporte y no aporta selectividad al sistema, la cual estará dada por el modificador orgánico, los aditivos, el valor de pH, etc.^[19]

Numerosos métodos cromatográficos requieren el uso de sales en la fase móvil, generalmente para el control y regulación del pH o de la fuerza iónica. Estos aditivos, al igual que los solventes, deberán tener un alto grado de pureza^[19]. Añadir sales inorgánicas causa un incremento lineal en la tensión superficial de soluciones acuosas, incrementando el tiempo de retención. Los fosfatos son muy usados en cromatografía de fase inversa como sales de sodio o potasio debido a su baja absorción en el UV aún a longitudes de onda cortas. El pH también es importante porque modifica la hidrofobia del analito, por eso se suele usar un buffer como fosfato sódico para controlar el pH.^[23]

II.5 Validación de métodos analíticos

La validación de un método analítico permite conseguir objetivos técnicos y al mismo tiempo exigencias legales en la industria farmacéutica. Garantiza que los procedimientos empleados proporcionan resultados con aceptable confiabilidad, exactitud y precisión para el fin previsto.

Según el compendio de validación de métodos <1225> USP 35-NF30, la validación de un método analítico es un proceso que establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño de un procedimiento cumplen los requisitos para las

aplicaciones analíticas previstas. Los aspectos típicos que se evalúan en una validación de un método analítico se presentan en la tabla II.

Tabla II. Características analíticas típicas utilizadas para la validación de métodos.

Exactitud
Precisión
Especificidad
Límite de detección
Límite de cuantificación
Linealidad
Intervalo
Robustez

Los requisitos de las pruebas farmacopeicas varían desde determinaciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones subjetivas de atributos. Considerando esta amplia variedad es lógico que diferentes procedimientos de prueba requieran diferentes esquemas de validación. ^[24]

Las categorías de las pruebas habituales son las siguientes:

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

Categoría II: Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados.

También se utilizan para pruebas de verificación de procesos de limpieza. Estos métodos pueden subdividirse en dos: pruebas cuantitativas y pruebas de límite. En el primer caso se aplica a la determinación de impurezas y productos de degradación a niveles de trazas, donde los componentes presentes se encuentran en menos de 1% de la concentración analítica del fármaco a granel o lo indicado en la etiqueta del producto farmacéutico terminado. Todos los parámetros requeridos para la categoría I son aplicables a la categoría II: adicionalmente se debe evaluar límite de detección y límite de cuantificación (Tabla II). Para el segundo caso sólo se compara la muestra contra un patrón de referencia, ambos preparados bajo las mismas condiciones, se pretende evaluar la especificidad, por tal motivo la cuantificación no será necesaria. El resultado se expresa en función de la conformidad de la prueba. En algunos casos, podría evaluarse la exactitud y el rango, dicha evaluación podría depender de la naturaleza del método.

Categoría III: procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño. La precisión es el único parámetro requerido para estos procedimientos.

Categoría IV: pruebas de identificación. Para esta categoría sólo se requiere la prueba de especificidad. Una de las pruebas de identificación puede ser el HPLC, usualmente consiste en la comparación del tiempo de retención o el tiempo de retención relativo de una muestra comparada con un estándar bajo las mismas condiciones cromatográficas y el mismo día. El incremento en el uso de detectores de arreglos de diodos (PDA) acoplados a HPLC permiten adicionalmente la comparación de espectros UV de estándares y muestras. [24]

En la tabla III se presentan los datos requeridos para cada una de las categorías mencionadas:

Tabla III. Datos requeridos para la validación

Características de desempeño analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis cuantitativos	Prueba de límite		
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
Límite de detección	No	No	Si	*	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Intervalo	Si	Si	*	*	No

* pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica

II.5.1 Parámetros de validación

II.5.1.1. Exactitud

Es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero. [25]

En la valoración de un fármaco, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del procedimiento analítico con respecto a un analito de pureza conocida, o

comparando los resultados del procedimiento con los de un segundo procedimiento bien caracterizado, cuya exactitud se haya comprobado o definido. [25]

También puede determinarse mediante la aplicación del procedimiento analítico a mezclas sintéticas de los componentes del producto farmacéutico al que se hayan añadido cantidades conocidas de analito dentro del intervalo del procedimiento. Si no resulta posible obtener muestras de todos los componentes del producto farmacéutico, se puede aceptar tanto el agregado de cantidades conocidas del analito al producto farmacéutico (*spike*). [25]

La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra, o como la diferencia entre la media de la valoración y el valor verdadero aceptado, considerando los intervalos de confianza. [25]

II.5.1.2 Precisión

La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. [25]

Se evalúa determinando la repetibilidad, reproducibilidad y la precisión intermedia. Generalmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa de una serie de mediciones. [25]

La repetibilidad se refiere a la utilización de procedimiento analítico en un laboratorio durante un periodo corto por el mismo analista con el mismo equipo. La reproducibilidad se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios; y La precisión intermedia (conocida como tolerancia) estudia las variaciones típicas, por ejemplo diferentes días, analistas, equipos, etc dentro de un mismo laboratorio. [19]

II.5.1.3 Especificidad

Es la capacidad de un método de discriminar entre el analito de interés y otros componentes presentes en la muestra. Las pruebas se diseñan a fin de evaluar el grado de interferencia de impurezas, productos de degradación, excipientes u otros analitos. [24]

La especificidad podría ser evaluada continuamente durante el proceso de desarrollo del medicamento y posterior validación del método analítico. El nivel de las pruebas de especificidad dependerá de la fase en la cual se encuentre el método. Las pruebas más comunes aplicadas para evaluar la especificidad son:

- **No interferencia del placebo:** Los excipientes presentes en una formulación podrían ser evaluados, a fin de conocer si interfieren en la detección del analito, para ellos se prepara una solución con placebo bajo las mismas condiciones de la muestra, de la misma forma se prepara una solución de referencia (patrón), ambas soluciones se analizan según el método. La ausencia del pico en la región donde aparece la señal correspondiente al analito en estudio es una prueba suficiente para demostrar que los excipientes no interferirán en la lectura de la señal del analito.

- **Desafío del método:** Consiste en inyectar soluciones conocidas de impurezas, productos de degradación, intermediarios, homólogos, dímeros, etc, que podrían dar información acerca de la presencia de este tipo de sustancias en la muestra, al igual que en el caso anterior se preparan las soluciones con los patrones de las sustancias mencionadas y paralelamente se prepara una solución patrón, se comparan ambos resultados a fin de reconocer si existe la presencia de alguna de estas sustancias en la muestra.
- **Estudios de degradación forzada:** Consisten en la exposición de la muestra a una variedad de condiciones de estrés con el propósito de evaluar la presencia de productos de degradación. Es particularmente útil cuando no se cuenta con patrones de sustancias relacionadas. Las condiciones de estrés más evaluadas son el sometimiento de la muestra al calor, luz, medio ácido, medio básico y ambientes oxidativos. Otras condiciones podrían evaluarse, dependiendo de la naturaleza de la muestra. ^[24]

II.5.1.4. Límite de detección (LD)

Es la cantidad mínima de analito que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas. ^[19] Puede determinarse a través de una estimación estadística con la siguiente expresión:

$$LD = \frac{3,3 S_{y/x}}{S}$$

Donde $S_{y/x}$ = desviación estándar de la respuesta.

S = pendiente de la curva de calibración.

II.5.1.5. Límite de Cuantificación (LC)

Corresponde a la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas y se expresa también en unidades de concentración. ^[19] Puede determinarse a través de una estimación estadística y se expresa como:

$$LC = \frac{10 S_{y/x}}{S}$$

Donde $S_{y/x}$ = desviación estándar de la respuesta.

S = pendiente de la curva de calibración.

II.5.1.6. Linealidad

Es la capacidad de un procedimiento analítico para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras dentro de un intervalo dado. ^[25]

Los resultados deben ser evaluados por métodos estadísticos apropiados, por ejemplo, mediante el cálculo de una línea de regresión por el método de los mínimos cuadrados. En algunos casos, para obtener linealidad entre ensayos y concentraciones de la muestra, los datos de prueba podrán requerir una transformación matemática antes del

análisis de regresión. Los datos de la línea de regresión en sí pueden ser útiles para proporcionar estimaciones matemáticas del grado de linealidad. [25]

II.5.1.7. Rango

Es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito (incluyendo estos niveles) en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad. [25]

II.5.1.8. Robustez

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no ser afectada por variaciones pequeñas, aunque deliberadas, en los parámetros del procedimiento indicados en la documentación, y provee una indicación de su aptitud durante condiciones normales de uso. [25]

En el caso de métodos analíticos realizados por cromatografía líquida, algunos de los factores de estudio más comunes son:

- Influencia de las variaciones de pH en la fase móvil.
- Influencia de las variaciones en la composición de la fase móvil.
- Temperatura.
- Velocidad de flujo. [19]

En la selección de variables a considerar debe utilizarse todo el conocimiento ya adquirido durante el desarrollo analítico para minimizar el número de ensayos a realizar. Cuando los factores a evaluar en el estudio de la robustez son muchos, se recurre a un diseño global que permite agruparlos, reduciendo el número de ensayos a efectuar. ^[19]

Un diseño muy utilizado es el de Plackett y Burman, que permite estudiar el efecto de n variables en $n+1$ ensayos. El primer paso consiste en construir la matriz de diseño. La matriz de diseño es la relación que define el valor que deben tomar los factores en cada uno de los experimentos a realizar. ^[19]

Ejemplo:

Factores	Niveles	
	-	+
Flujo (mL/min)	a	A
pH	b	B
Concentración (g/L)	c	C

La letra minúscula corresponde al nivel más bajo y la mayúscula al nivel más alto. El orden que se presenta la secuencia de experimentos a realizar se denomina orden estándar de la matriz de diseño. En este orden es fácil construir la matriz: para el primer factor se van alterando los signos – y +, para el segundo se van alterando dos – y dos + y para el tercero cuatro – y cuatro + y así sucesivamente. Construyendo la matriz de esta forma, se garantiza que no habrá omisión de ninguna combinación de valores de los factores de diseño y que tampoco se repetirá ninguna. ^[19] En la tabla IV se presenta el diseño de la matriz de Plackett y Burman para evaluar la robustez del método analítico.

Tabla IV. Diseño de la matriz Plackett y Burman

Experimento	T	pH	C	Resultado
1	a (-)	b(-)	c(-)	S
2	A(+)	b(-)	c(-)	T
3	a (-)	B(+)	c(-)	U
4	A(+)	B(+)	c(-)	V
5	a (-)	b(-)	C(+)	W
6	A(+)	b(-)	C(+)	X
7	a (-)	B(+)	C(+)	Y
8	A(+)	B(+)	C(+)	z

Una vez efectuado el experimento, se procede a calcular la diferencias de medias para cada parámetro en forma individual (ver tabla V).

Tabla V. Cálculo de la diferencia de respuesta para cada parámetro.

Parámetro	Diferencia
A-a	$V_A = \frac{1}{4} (s+t+u+v) - \frac{1}{4} (w+x+y+z)$
B-b	$V_B = \frac{1}{4} (s+t+w+x) - \frac{1}{4} (u+v+y+z)$
C-c	$V_C = \frac{1}{4} (s+u+w+v) - \frac{1}{4} (t+v+x+z)$

Para decidir si un parámetro tiene influencia significativa sobre el resultado, se compara la diferencia obtenida para el cambio efectuado sobre ese parámetro y el producto de s (desviación estándar del estudio de precisión) y raíz de 2. ^[19]

$$\text{Si } |V_B| > s \sqrt{2} \Rightarrow \text{diferencia significativa}$$

II.6. Perfiles de disolución *in vitro* y su importancia

El proceso de absorción de un fármaco contenido en una forma farmacéutica sólida, después de la administración oral depende, entre otros aspectos, de la liberación del principio del producto y de su disolución o solubilización en las condiciones fisiológicas. Debido a la naturaleza de estos factores, la evaluación de la velocidad de disolución *in vitro* puede ser una predicción del comportamiento *in vivo*. [26]

Las pruebas de disolución farmacopeicas son pruebas límite puntuales, éstas únicamente evalúan la cantidad de principio activo disuelto en un tiempo determinado y el criterio de aceptación es útil para el control de calidad del medicamento, pero no proporcionan información de la velocidad a la cual el fármaco se disuelve. [26]

La evaluación de los perfiles de disolución ha sido extensamente aplicada en el diseño de medicamentos y manufacturas de tabletas y cápsulas. Se utiliza durante la optimización de la forma farmacéutica, pruebas de estabilidad, control del proceso de producción y el establecimiento de similitudes entre una nueva formulación genérica y una ya existente. Estas pruebas pueden ser una guía útil para orientar el desarrollo de una nueva formulación, así como una forma de control post-aprobación. [27]

Adam y colaboradores [28] afirman que la vía más simple para establecer comparaciones entre perfiles de disolución se realizan evaluando cada cierto tiempo el porcentaje de principio activo que se ha disuelto en el medio de disolución. A pesar de que en algunos casos comparar con un solo punto de disolución podría ser suficiente, es preferible

realizar mediciones en varios puntos, especialmente para aquellos principios activos que se disuelvan lentamente o que tengan baja solubilidad en agua.

Debido a la naturaleza crítica de la disolución y permeabilidad, la disolución *in vitro* podría ser relevante en la predicción del rendimiento *in vivo*. En función a esta consideración general, las pruebas de disolución *in vitro* para las formas de dosificación oral sólidas pueden ser utilizadas para:

- Evaluar la calidad de un medicamento lote a lote.
- Asegurar la calidad y el rendimiento continuados del producto después de la realización de cambios menores en la formulación, en el proceso de fabricación, en el lugar de fabricación y en la extrapolación del proceso de fabricación.

En 1990 Skelley ^[29] señaló que la importancia de las pruebas de disolución *in vitro* se debe a los siguientes aspectos:

- Proveen procesos necesarios de control.
- Determinan la estabilidad de la velocidad de liberación característica de un producto.
- Facilitan ciertas determinaciones regulatorias y juicios concernientes a cambios menores en la formulación.

II.6.1. Estudios de disolución *in vitro* en Venezuela

El instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”, a través de las normas de la junta Revisora de Productos Farmacéuticos, contempla los ensayos de disolución *in vitro* como una de las evidencias aceptables para la aprobación de un medicamento, si se logra demostrar la similitud de las cinéticas de disolución de un producto contra el producto de referencia. [27]

Debido a las limitaciones de las pruebas de disolución *in vitro* para determinar bioequivalencia, su aplicación para este propósito deberá limitarse a principios activos en suspensión y formas farmacéuticas sólidas orales de liberación convencional con alta permeabilidad, cuyo factor limitante del comportamiento farmacocinético sea su disolución. [30]

La evaluación deberá realizarse mediante la obtención de curvas que permitan determinar la evolución completa de la disolución a partir de la forma farmacéutica utilizada. [30]

Para productos cuya prueba de disolución se encuentra disponible en textos oficiales, o en aquellos donde se encuentre públicamente, pero no en textos oficiales, se deberán realizar perfiles de disolución comparativos entre el producto de referencia y el producto en evaluación, a intervalos de 15 minutos o menos, con un mínimo de tres puntos y siguiendo la metodología descrita. En el caso de aquellas referencias publicadas de manera no oficial, el INH podría solicitar la presentación de información adicional para sustentar los resultados. En la mayoría de los casos, las aprobaciones de

registro sanitario de productos de categoría C (conocidos) en Venezuela se realizan en función a los resultados de los perfiles de disolución comparativos, ya que en la actualidad no disponemos de infraestructura suficiente para la realización de pruebas de bioequivalencia. Por tal motivo, las exigencias de las pruebas de perfiles de disolución son cada vez más estrictas y se han convertido en un requisito indispensable a la hora de registrar un medicamento. [27]

II.6.2. Metodología estadística utilizada para la comparación de perfiles de disolución

Los perfiles de disolución deben hacerse sobre 12 tabletas como mínimo. Se deberán tomar muestras en un número suficiente de intervalos que permita caracterizar el perfil de disolución del medicamento, por ejemplo: 10, 15, 20 y 30 minutos. Esto debe hacerse así para tener una serie de datos estadísticamente válidos. Una vez recopilados los datos se procede aplicar métodos de comparación. El método específico utilizado para la comparación de perfiles de disolución se explica a continuación:

II.6.2.1 Método del modelo independiente

En 1998 Shah, Tsong y Sathe [31] afirmaron que este modelo permite caracterizar productos de manera más precisa que una prueba de disolución de punto único o de dos puntos, también se puede establecer la diferencia y la semejanza entre el comportamiento de la disolución de diferentes productos y arroja señales sobre bioinequivalencia. Permite comparar la diferencia en el porcentaje de fármaco disuelto

por unidad de tiempo entre una formulación de referencia y una formulación de prueba. Los factores de ajuste son denotados por f_1 (factor de diferencia) y f_2 (factor de similitud) y pueden ser definidos por:

$$f_1 = \left\{ \frac{\sum_{t=1}^n (R_t - T_t)}{\sum_{t=1}^n R_t} \right\} \bullet 100$$

Ecuación 3. Factor de diferencia

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

Ecuación 4. Factor de similitud

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

El factor f_1 calcula la diferencia en porcentaje entre las dos curvas en cada punto de muestreo y es una medida del error relativo entre las dos curvas. El cálculo del factor f_1 permite estimar el porcentaje de diferencia acumulativa entre las dos curvas comparadas a todos los puntos de tiempo y es una medida del error relativo entre las dos curvas. Conceptualmente f_1 es una función de la diferencia absoluta promedio entre los dos perfiles.

El f_2 es una transformación logarítmica del recíproco de la raíz cuadrada de la suma del cuadrado del error y es una medida de la similitud en el porcentaje de disolución entre ambas curvas.

En 2002 García, Lara y Jiménez ^[32] señalan que un procedimiento específico para determinar los factores f_1 y f_2 es el siguiente:

- Determinar los perfiles de disolución (12 unidades) para el producto prueba y el producto de referencia.
- Calcular los factores de diferencia y similitud a partir de los valores medios de disolución de ambas curvas en cada intervalo de tiempo, usando para ello las ecuaciones 3 y 4.

Dos curvas pueden ser consideradas similares cuando el valor de f_1 esté cercano a 0, aunque puede encontrarse en el intervalo de 0-15 y el valor de f_2 esté cercano a 100, en un intervalo entre 50 y 100.

La ecuación 4 sólo puede aplicarse cuando la diferencia en el porcentaje liberado entre la formulación de referencia y la formulación de prueba no sea ≥ 100 , ya que se obtendría como resultado un valor negativo. La comparación se basa en la fijación de modelos y rangos de aceptabilidad.

III. ANTECEDENTES

III.1. Farmacopea Británica. Volumen I & II. 2012. ^[33]

La Farmacopea Británica (BP) describe el análisis para la determinación de la pureza de clorhidrato de propafenona por potenciometría y realizan un análisis de las sustancias relacionadas que pueden estar asociadas a dicha molécula. Consiste en un análisis por HPLC, para materia prima que contiene clorhidrato de propafenona del 99 al 101 % (sobre la base seca).

A continuación se presentan las condiciones analíticas recomendadas en esta monografía.

HPLC:

Fase móvil:

Solución A: 3,42 g/L de K_2HPO_4 . Ajustado con ácido fosfórico a pH de 2,5.

Solución B: Acetonitrilo.

Columna: Octasilano 4,6 mm x 15 cm; 5 μ m.

Temperatura: 30 °C.

Tabla VI. Gradiente de eluente.

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)
0 - 8	65	35
8 - 20	65 → 30	35 → 70
20 - 30	30	70

Flujo: 1 mL/min.

Equilibrio: se hace pasar por el sistema cromatográfico la fase móvil a la composición inicial (tabla VI), antes de cada serie de inyecciones durante 60 minutos.

Volumen de inyección: 20 µL

Detector: UV a una longitud de onda de 220 nm.

Soluciones:

Diluyente: Solución B y Solución A (35:65 V/V)

Solución de prueba: Disolver 50 mg de la sustancia a ser examinada en la mezcla de solventes y aforar a 50 mL con dicha mezcla.

Solución de referencia (a): diluir 1 mL de la solución de prueba a 100 mL utilizando la mezcla de solvente. Luego, diluir 1 mL de esta solución a 10 mL con dicha mezcla.

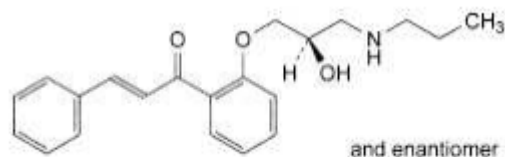
Solución de referencia (b): diluir 1 mL de la solución de referencia (a) a 10 mL utilizando la mezcla de solvente.

Solución de referencia (c): disolver 5 mg de la sustancia a ser examinada y 5 mg de propafenona impura B¹ CRS en la mezcla de solvente y diluir a 50 mL con dicha mezcla.

Las sustancias relacionadas al compuesto son las siguientes:

Impureza B¹:

(2E)-1-[2-[(2RS)-2-hidroxi-3(propilamino)propoxi]fenil]-3-fenilprop-2-en-1-ona



Impureza C:

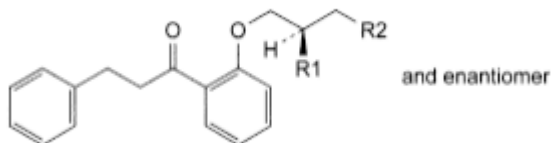
R1+R2= O: 1-[2-[[2-(2RS)-oxiranilo]metoxi]fenil]-3-fenilpropan-1-ona.

Impureza D:

R1=R2=OH: 1-[2-[(2RS)-2,3-dihidroxi]propoxi]fenil]-3-fenilpropan-1-ona

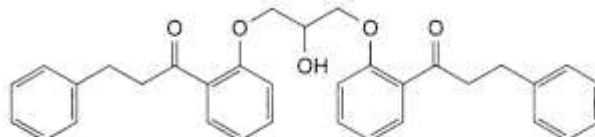
Impureza E:

R1= OH, R2= Cl: 1-[2-[(2RS)-3-cloro-2-hidroxi]propoxi]fenil]-3-fenilpropan-1-ona.

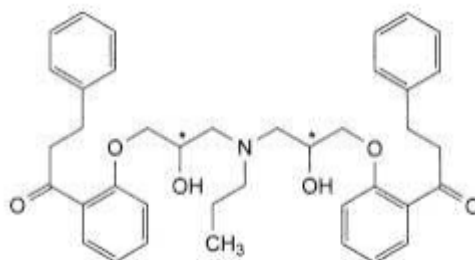


Impureza F:

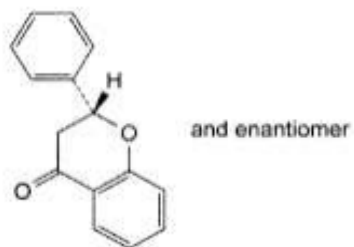
1,1'-[2-hidroxiopropano-1,3-diilbis(oxi-2,1fenileno)]bis(3-fenilpropan-1-ona).

**Impureza G:**

1,1'-[propilaminobis[(2-hidroxiopropano-3,-diilo)oxi-2,-fenileno]]bis(3-fenilpropan-1-ona).

**Impureza H:**

(2RS)-2-fenil-2,3-dihidro-4H-1-benzopirano-4-ona.



III.2. Farmacopea de Estados Unidos (USP). USP 35. 2012. [34]

La USP 35 NF 30 describe el análisis para la determinación de la pureza de clorhidrato de propafenona y sustancias relacionadas que pueden estar asociadas a dicha molécula. Consiste en un análisis por HPLC, para una materia prima que contiene Clorhidrato de propafenona del 99 al 101 % (sobre la base seca).

A continuación se presentan las condiciones analíticas recomendadas en esta monografía.

HPLC:

Solución A: 3,42 g/L de K_2HPO_4 . Ajustado con ácido fosfórico a pH de 2,5.

Solución B: Acetonitrilo.

Tabla VII. Gradiente de eluentes:

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)
0	65	35
8	65	35
20	30	70
30	30	70
31	65	35
36	65	35

Detector: UV 220 nm

Columna: Octasilano 4,6 mm x 15 cm; 5 µm.

Flujo: 1 mL/min.

Volumen de inyección: 20 µL.

Soluciones:

Diluyente: Solución A y Solución B (65:35)

Sistema de solución estable: 0,1 mg/mL de clorhidrato de propafenona USP y propafenona relacionada al compuesto B¹ USP en el diluyente.

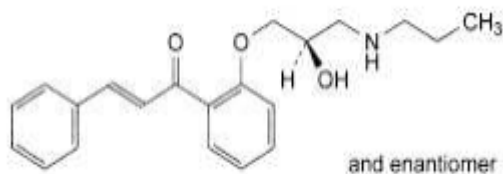
Solución estándar: 0,001 mg/mL de USP clorhidrato de propafenona en el diluyente.

Solución de muestra: 1 mg/mL de clorhidrato de propafenona en el diluyente.

Las sustancias relacionadas al compuesto son las siguientes:

Impureza B¹:

(2E)-1-[2-[(2RS)-2-hidroxi-3(propilamino)propoxi]fenil]-3-fenilprop-2-en-1-ona



Impureza C:

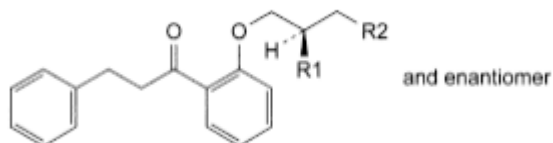
R1+R2= O: 1-[2-[[2-(RS)-oxiranilo]metoxi]fenil]-3-fenilpropan-1-ona.

Impureza D:

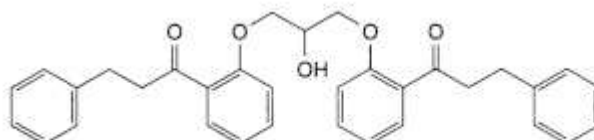
R1=R2=OH: 1-[2-[(2RS)-2,3-dihidroxi]fenil]-3-fenilpropan-1-ona

Impureza E:

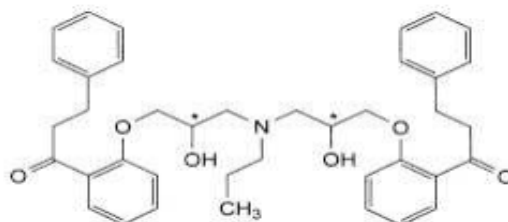
R1= OH, R2= Cl: 1-[2-[(2RS)-3-cloro-2-hidroxi]fenil]-3-fenilpropan-1-ona.

**Impureza F:**

1,1'-[2-hidroxi]propano-1,3-diilbis(oxi-2,1fenileno)]bis(3-fenilpropan-1-ona).

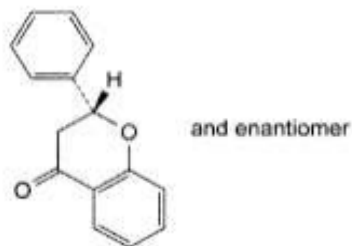
**Impureza G:**

1,1'-[propilaminobis[(2-hidroxi]propano-3,-diilo)oxi-2,-fenileno]]bis(3-fenilpropan-1-ona).



Impureza H:

(2RS)-2-fenil-2,3-dihidro-4H-1-benzopirano-4-ona.

**III.3. G.L. Hoyer. 1988.** ^[35]

Este autor desarrolló un método para la detección simultánea de propafenona y 5-hidroxiopropafenona usando la técnica RP-HPLC. El clorhidrato de propafenona y el estándar interno (Li-1115) fueron suministrados por la división de investigación clínica de Knoll farmacéutica. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

Fase móvil: Buffer K_2HPO_4 0,1 M, ajustado a pH 2,5 con ácido orto fosfórico al 85 %, acetonitrilo (63:37)

Flujo: 2 mL/min.

Volumen de inyección: 10 μ L

Detección: UV a 210 nm.

Columna: Octadecilsilano (L1) 25 x 0,4 cm. 5 μ m.

Procedimiento experimental: Preparó una serie de patrones combinados de propafenona y 5-hidroxiopropafenona acidificados con HCl, a un pH 3,5 y construyó una curva de calibración para determinar las concentraciones de cada muestra analizada.

Las muestras que se analizaron fueron las siguientes: En primer lugar, se tomó la mezcla de suero humano sin propafenona y sin 5-hidroxiopropafenona, la cual fue utilizada como blanco. En la segunda muestra, añadió 1,5 µg de propafenona y 0,75 µg de 5-hidroxiopropafenona a la mezcla de suero humano y por último, analizó el suero de algunos pacientes.

A las muestras anteriores se les realizó una extracción líquido- líquido, a cada tubo se le añadió 0,5 mL del buffer, y 2 µg del estándar interno. Posteriormente se agregó una alícuota de 7 mL de cloruro de metileno, y se agitó vigorosamente por 1 minuto. Estos se centrifugaron para separar la capa orgánica de la acuosa, tomándose 5 mL de la capa orgánica y transfiriéndola a un tubo de centrifuga, posteriormente se secaron los extractos bajo corriente de nitrógeno en un baño de agua (40°C). El extracto seco fue reconstituido en 200 µL de fase móvil, y 100 µL fueron inyectados en la columna.

Se compararon los cromatogramas de cada muestra. Los picos fueron identificados como propafenona, 5-hidroxiopropafenona, y estándar interno. Estos compuestos eluyen a 6; 2,9 y 4,3 minutos respectivamente.

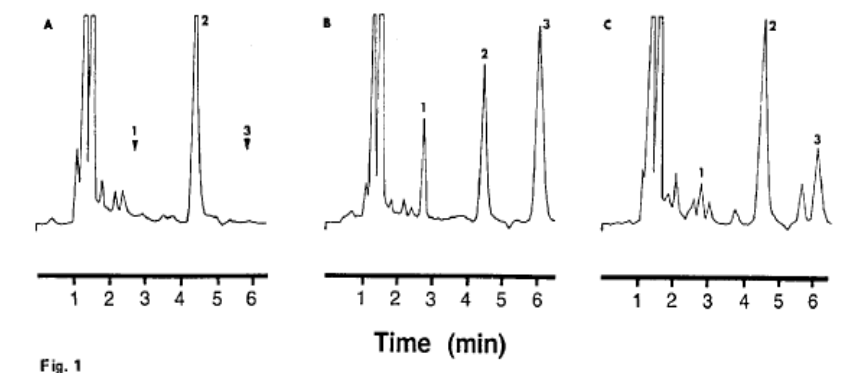


Figura IV: Cromatogramas. A- Extracto de Suero humano con estándar interno. B- Extracto de suero humano con propafenona, 5-OH propafenona y estándar interno. C- Extracto de Suero de pacientes con estándar interno.

Al comparar los cromatogramas de la figura IV, se observó que hay varios picos presentes en el extracto (C), los cuales no están presentes en el extracto (A) ni (B). Estos picos no fueron identificados, y tal vez se deban a metabolitos de propafenona.

La linealidad de este ensayo fue confirmada sobre el rango de 0,0075 a 1,5 μg para el 5-hidroxiopropafenona y para la propafenona en 0,15 a 3 μg . La cual es suficiente para cubrir el rango terapéutico de propafenona. La eficacia de la extracción para la propafenona y 5-hidroxiopropafenona desde el suero, fue de 89 y 87%, respectivamente.

El método fue hallado efectivo para cualquier plasma o suero usado. Además, no es necesario equilibrar la columna después de cada corrida cromatográfica porque este método usa condiciones isocráticas.

III.4 Juárez O Hugo y colaboradores (2009).^[36]

El objetivo de estos autores fue desarrollar una formulación extemporánea de propafenona, evaluar su estabilidad fisicoquímica y microbiológica para uso pediátrico. Prepararon una formulación con aspecto similar a una suspensión, después de pulverizar finamente el contenido de una tableta de 150 mg de propafenona, el polvo fue pasado a través de una malla de número 100 (tamaño de partícula 150 μm) para tener el tamaño de partícula homogéneo. Después agregaron 100 mL del jarabe de granadina, para obtener una concentración final de 1,5 mg/mL.

Para estudiar la estabilidad se prepararon 6 muestras y se colocaron en frascos ámbar, 3 a temperatura ambiente y 3 en refrigeración. Se tomaron muestras a los 10, 30, 60 y 90 días y se cuantificaron por HPLC acoplado al sistema *Millenium* versión 3,2, y equipo waters con detección fluorométrica a una longitud de excitación de 200 nm y 210 nm de emisión, usando una columna Symmetry C₁₈ (L1) de fase inversa de 5 μm , y 150 x 3,9 mm I.D. Se utilizó una fase móvil compuesta por una solución 50 mM de fosfato de potasio monobásico pH 3,2, y acetonitrilo en una proporción 70:30, y un flujo de 1 mL/min. Para la extracción del fármaco se utilizó una mezcla de éter dietílico y diclorometano en una proporción 50:50. La fase orgánica fue separada y evaporada a sequedad bajo flujo de nitrógeno, el residuo fue suspendido en 200 μL de fase móvil conteniendo propanol (3 mg/mL) como estándar externo y se inyectaron 100 μL . Adicionalmente se determinaron los valores de pH. La estabilidad fue determinada de acuerdo al porcentaje del contenido de propafenona que mantenían con respecto a los valores iniciales ocurrido en las diferentes etapas de estudio.

Una vez que se determinó su estabilidad, se preparó y se administró el medicamento a los pacientes, posteriormente se tomaron muestras de sangre para la cuantificación de las concentraciones del medicamento en plasma. La curva estándar fue lineal en el rango de concentraciones probado con un coeficiente de correlación $r^2 > 0,99$. No se observaron cambios en el pH (pH = 7), durante el periodo de estudio el porcentaje de contenido se mantuvo mayor a 90% tanto en condiciones de refrigeración como a temperatura ambiente. (Ver tabla VIII)

Tabla VIII. Estabilidad de una formulación extemporánea de propafenona sometida a condiciones de temperatura ambiente y de refrigeración

Concentración inicial ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$) Día 1	Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$) Día 10	Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$) Día 30	Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$) Día 60	Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$) Día 90
6	3-5	5.96 ± 0.18	6.31 ± 0.04	6.37 ± 0.19	6.6 ± 0.11	6.09 ± 0.55
	15 ± 5	6.12 ± 0.17	6.24 ± 0.19	6.1 ± 0.37	6.0 ± 0.46	5.95 ± 0.3
12	3-5	12.09 ± 1.02	12.84 ± 0.31	12.81 ± 0.32	13.98 ± 0.26	13.26 ± 0.89
	15 ± 5	12.30 ± 0.82	12.34 ± 0.46	12.60 ± 0.54	12.87 ± 0.08	12.92 ± 0.18
18	3-5	18.43 ± 0.53	17.85 ± 1.06	17.16 ± 0.16	18.68 ± 2.57	18.44 ± 1.48
	15 ± 5	17.72 ± 0.54	17.96 ± 1.24	18.43 ± 0.45	18.93 ± 0.43	18.73 ± 0.26

Los valores representan promedio \pm desviación estándar

No se encontró crecimiento bacteriano en ninguno de los días del estudio de estabilidad en sus diferentes condiciones de almacenamiento, manteniendo su estabilidad a lo largo de los 90 días. Estos resultados permitieron asegurar que el uso de esta formulación puede representar una opción temporal de tratamiento en niños que requieran su uso.

Los parámetros de la curva de calibración y sus coeficientes de correlación mostraron una excelente linealidad en el rango de concentración y el límite de cuantificación fue de 4 µg/mL para ambas precolumnas. La recuperación del procedimiento del lavado de muestra, para ambos, no difiere del 100 %. Las precolumnas fueron comparadas y se demostró que el uso de precolumnas de acceso restringido provee la eliminación selectiva de proteínas y otros compuestos de la matriz. Los límites de cuantificación obtenidos fueron de (25 - 40) ng/mL para un volumen de inyección de 50 µL.

III.5. Dhandapani B y colaboradores. (2010).^[37]

Desarrollaron tres métodos simples, precisos, rápidos y sensibles para la determinación de propafenona en tabletas. En el método A (espectroscopía UV), se preparó una solución de propafenona pesando 100 mg de la misma y transfiriéndola a un matraz aforado de 100 mL, se llevó a este volumen con etanol obteniendo una concentración final de 1000 µg/mL. Se tomaron diversas alícuotas de esta solución (0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 y 2 mL respectivamente) y se transfirieron a matraces aforados, se llevaron a un volumen final de 10 mL con etanol, obteniendo así una concentración final de: 20 µg/mL; 40; 80; 120; 160; 200 µg/mL respectivamente. La absorbancia de la solución resultante se midió a 301 nm con espectrofotómetro UV-Visible contra blanco (etanol). La linealidad fue observada en el rango de concentración de (20 - 200) µg/mL con un coeficiente de correlación de 0,9819.

En el método B (Estimación espectrofotométrica) se preparó una solución de propafenona, al pesar 100 mg de la misma y transfiriéndola a un matraz aforado de 100 mL, se llevó a este volumen con etanol obteniendo así una concentración final de 1000 µg/mL. Se tomaron diversas alícuotas de esta solución (2; 4; 6; 8 y 10 mL,

respectivamente) y se llevaron a diversos matraces aforados de 10 mL con etanol; obteniendo así una concentración de 200; 400; 600; 800 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Estas soluciones se transfirieron a diferentes embudos de separación, los cuales contenían 10 mL de azul de metileno, 10 mL de cloroformo y 1 mL de buffer de fosfato (pH 8), esta mezcla se agitó durante 15 min, la capa orgánica fue separada y se midió la intensidad del color verde azulado a 485 nm frente al blanco. La linealidad fue observada en el rango de concentración de 200 – 1000 $\mu\text{g/mL}$ con un coeficiente de correlación de 0,9769.

En el método C (método hidrotópico) consistió en el uso de un agente de disolución hidrotópico (citrato de difenhidramina), la propafenona es insoluble en agua y este agente hace que sea soluble en esta, debido a la formación de un complejo. La absorbancia de la solución resultante fue medida a 301 nm. La solución patrón fue preparada disolviendo 250 mg de citrato de difenhidramina en 10 mL agua destilada y llevada a un matraz aforado de 1000 mL. Luego, se añadió 100 mg de propafenona y esta solución se calentó sobre un baño de agua hasta que la solución se aclaró, el volumen del matraz se completó con agua destilada para obtener una concentración final de 1 $\mu\text{g/mL}$ (solución A). Se tomó una alícuota de 10 mL de esta solución y se llevó a un volumen de 100 mL con agua destilada para obtener una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$. (Solución B). Se tomaron diversas alícuotas de la solución B (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 y 3,0 mL respectivamente), llevándose a un volumen final de 10 mL con agua destilada, para obtener concentraciones finales de: 5, 10, 15, 20, 25, y 30 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. La absorbancia de estas soluciones se midió a 301 nm frente al blanco. La linealidad fue observada en el rango de concentración de (15 - 150) $\mu\text{g/mL}$, con un coeficiente de correlación de 0,9985.

Para cada método se midió la absorbancia de la solución de la muestra y se determinó la cantidad de propafenona, utilizando la curva de calibración.

IV. JUSTIFICACIÓN

En base a la revisión bibliográfica, se encontró que el análisis de clorhidrato de propafenona en tabletas recubiertas por HPLC no aparece reportado en ninguna de las monografías estudiadas. Por lo tanto, es justificable el desarrollo y validación de una metodología analítica para la determinación de clorhidrato de propafenona en tabletas recubiertas y la realización de su ensayo de disolución. Dicha metodología debe garantizar que este medicamento cumpla con los parámetros de calidad establecidos por las autoridades regulatorias nacionales e internacionales.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo General

Desarrollar y validar una metodología analítica para la determinación y ensayo de disolución de clorhidrato de propafenona en tabletas recubiertas, utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

V.2. Objetivo Específicos

1. Seleccionar las condiciones cromatográficas preliminares más idóneas para la cuantificación de clorhidrato de propafenona.
2. Optimizar las condiciones cromatográficas encontradas.
3. Optimizar y evaluar el procedimiento de extracción del clorhidrato de propafenona que se encuentra dentro de la forma farmacéutica (tabletas recubiertas).
4. Seleccionar las condiciones cromatográficas preliminares más idóneas para la realización del ensayo de disolución de clorhidrato de propafenona en tabletas recubiertas.
5. Realizar el perfil de disolución comparativo de tabletas de clorhidrato de propafenona de 150 mg.

VI. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

VI.1 REACTIVOS

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

- Acetonitrilo grado HPLC. Mallinckrodt.
- Fosfato dibásico de potasio grado analítico. Mallinckrodt.
- Ácido o-fosfórico al 85 %. Fischer Scientific.
- Agua Destilada. Destilador Cascada Ro Waters (Pall corporation).
- Agua 18 mΩ. Ultrapurificador de agua Barnstead (Nanopure).
- Ácido clorhídrico al 37 %. Merck.
- Hidróxido de sodio. Merck.
- Peróxido de hidrógeno al 30 %. Riedel de Haën.

VI.1.1 Patrón

El patrón de referencia fue clorhidrato de propafenona, Recalcine, de una pureza sobre la base seca del 99,3 % y una humedad del 0,12 %.

VI.1.2 Muestras

Los medicamentos analizados de Clorhidrato de Propafenona fueron:

- Rytmonorm 150 mg, tabletas recubiertas Lote: 268048D. Fabricado por Abbott Gmb H8 Co.KG. Alemania y distribuido en Venezuela.
- Normorytmin 150 mg. Lote: 27772QA. Fabricado por Abbott Gmb H8 Co.KG. Alemania y distribuido en Argentina.

VI.2 INSTRUMENTACIÓN

Para la realización de los análisis de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia se empleó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia de la casa comercial Waters ® (ver figura V) conformado por:

- 1- Bomba, modelo 600E.
- 2- Inyector automuestreador, modelo 717.
- 3- Detector de arreglo de diodos, modelo PDA 996.
- 4- Columna cromatográfica de fase inversa μ bondapak C-18 (L1), 3,9 x 300 mm, 10 μ m, 125 Å.
- 5- Software Millenium 32®.



Figura V. Sistema HPLC.

- Los perfiles de disolución fueron realizados en el disolutor, Hanson Research, modelo SR8 plus, aparato II (paletas). Una fotografía del mismo se muestra en la figura VI



Figura VI. Equipo Disolutor

- Los análisis espectrofotométricos se realizaron en un Espectrofotómetro UV-Visible, Shimadzu, modelo UV-1201 (ver figura VII). Con celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.



Figura VII. Espectrofotómetro UV-Visible.

- Balanza analítica digital, Mettler Toledo, modelo AG 245.
- pH meter, Orion Research, modelo 601 A.
- Membranas de filtración de nylon de 0,45 μm , millipore.
- Baño de ultrasonido, Sonicor, modelo SC 200.

VI.3 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO DE MEDIDA

VI.3.1 Condiciones Cromatográficas Preliminares

La primera etapa de esta investigación consistió en ensayar una serie de experiencias preliminares, a fin de evaluar la posibilidad de realizar el análisis del clorhidrato de propafenona empleando la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia. Todo ello, en base a los insumos y equipos disponibles en nuestros laboratorios.

Las condiciones operativas de partida para la corrida cromatográfica fueron una combinación de la información encontrada en la revisión bibliográfica. En este orden de ideas, se partió de un estándar puro de clorhidrato de propafenona y una vez comprobada su retención cromatográfica, la aplicamos sobre una de las muestras problemas.

En un principio, para determinar la longitud de onda de trabajo se empleó el detector de arreglo de diodos del equipo de HPLC como espectrofotómetro. Para ello, a una disolución del estándar puro de clorhidrato de propafenona se le realizó un barrido de longitudes de ondas entre 200 y 400 nm respectivamente. Tal como se muestra en la figura VIII, se observaron dos máximos, uno a 248,1 nm y otro de menor coeficiente de absorptividad a 303,7 nm. Se escogió la longitud de onda de 248,1 nm por ser la de mayor coeficiente de absorptividad y por consiguiente la de mayor sensibilidad.

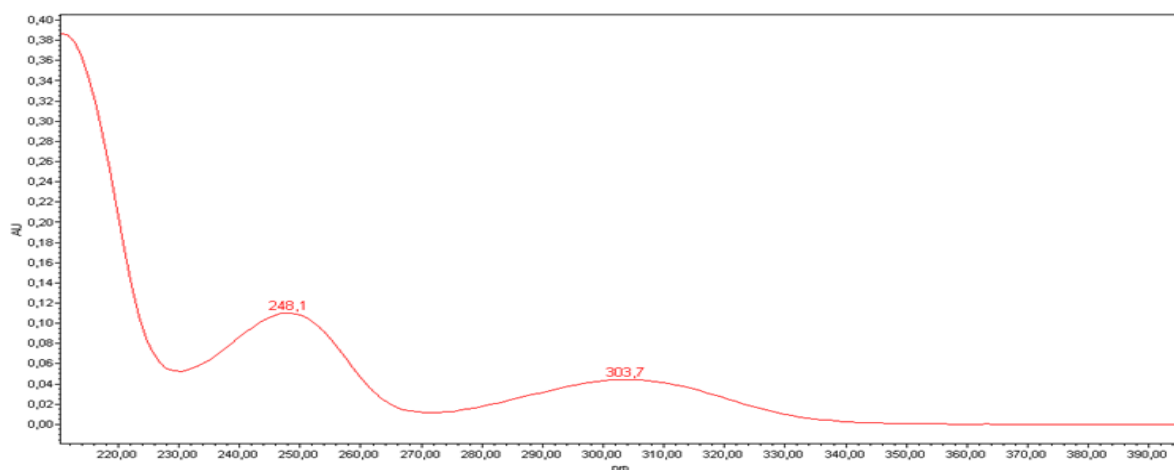


Figura VIII. Espectro de absorción UV del patrón de clorhidrato de propafenona.

Una vez escogida la longitud de onda de trabajo, se procedió a preparar la fase móvil, la cual consistió en una mezcla de un buffer de fosfato dibásico de potasio (3,42 g/L ajustado a pH 2,5 con ácido o-fosfórico) y acetonitrilo, en una proporción de 40:60 respectivamente. Dicha fase móvil fue filtrada por succión a través de un filtro de nylon de 0,45 μm y posteriormente desgasificada por ultrasonido durante 20 min.

En un primer ensayo, se empleó una columna cromatográfica de fase inversa octadecilsilano de 3,9 mm de diámetro interno, 300 mm de longitud y con un tamaño de partícula de 10 μm , muy similar a las reportadas en la literatura para dichos análisis. Sin embargo, dicha columna es de larga data, y se desconocían las condiciones operativas de la misma. En todo caso, como se mencionó anteriormente, servirá como punto referencial de partida para la futura optimización del sistema de medida.

Seguidamente, se disolvió el estándar de clorhidrato de propafenona en la fase móvil (condición descrita en la norma USP 35 NF 30, sugerida para la determinación de impurezas en la materia prima). El volumen de inyección fue de 40 μL (establecido por

omisión en el equipo), y el patrón fue filtrado previo a la inyección en un disco con filtro de nylon de 0,45 μm .

El flujo volumétrico fue de 1,5 mL/min y una vez estabilizado el sistema, se procedió a realizar la corrida del patrón, observándose el cromatograma mostrado en la figura IX.

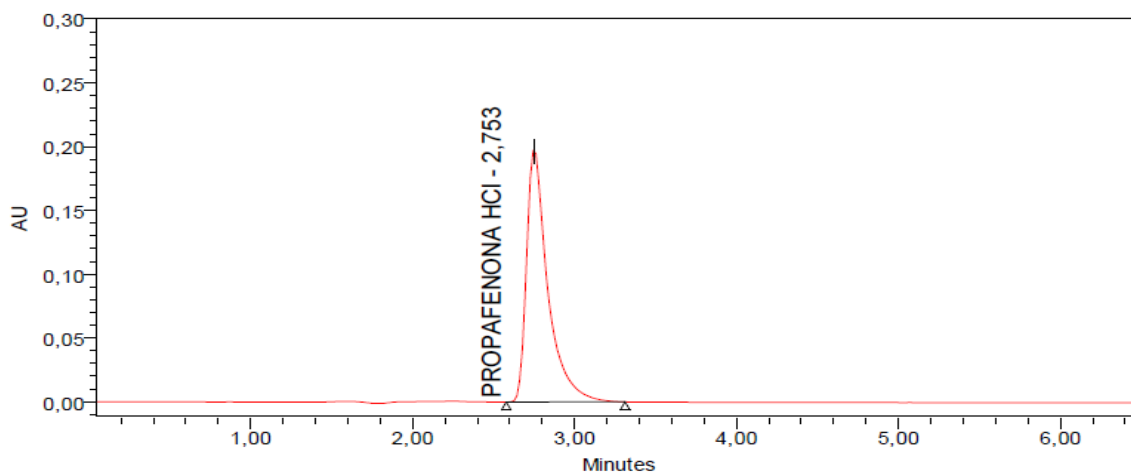


Figura IX. Cromatograma del estándar de clorhidrato de propafenona con las condiciones preliminares.

En el cromatograma de la figura IX, se presenta la corrida cromatográfica de 6 min del patrón en estudio, observándose una sola banda a un tiempo de retención (t_R) de 2,753 min, el cual debe corresponder al clorhidrato de propafenona. Aunque no disponemos de un analito no retenido por la fase estacionaria para determinar el tiempo muerto (t_M) y a su vez el factor de retención (k), podemos inferir que: a pesar de poseer un t_R relativamente corto, existe una retención relativa aceptable, partiendo del hecho que la mejor corrida cromatográfica es aquella que realiza la mejor separación en el menor tiempo posible. Por otra parte, se puede notar una ligera cola en la banda cromatográfica, que conlleva a cierta asimetría de la misma, quizás atribuible a las condiciones operativas de dicha columna.

Seguidamente bajo las mismas condiciones cromatográficas anteriores, se procedió a realizar una corrida sobre el tipo de muestras en estudio, para notar si algún componente de la misma, pudiese interferir en el cromatograma y conllevar a modificaciones operacionales del cromatógrafo. Lo ideal sería realizar el ensayo sobre un estándar certificado de clorhidrato de propafenona en tabletas, pero debido a la inexistencia del mismo, procedimos a preparar una “muestra de referencia”, que a pesar de no conocer su concentración exacta, servirá como sistema de referencia para efectos comparativos de las modificaciones experimentales.

La muestra de referencia fue preparada a partir de los medicamentos suministrados por el mercado nacional, para ello se empleó el Rytmonorm 150 mg en tabletas recubiertas. Para disponer de una cantidad suficientemente grande, se seleccionaron 10 tabletas para un peso promedio total de 300 mg aproximadamente. Se mezclaron y pulverizaron en un mortero, obteniéndose un polvo muy fino y homogéneo. Sobre esta muestra de referencia se hicieron los ensayos pertinentes al tratamiento de la misma.

Un cromatograma de la muestra de referencia disuelta “parcialmente” en la fase móvil e inyectada en el equipo HPLC se muestra en la figura X. La banda que aparece a un tiempo de retención de 2,756 min, debe corresponder al clorhidrato de propafenona y aunque en la grafica se presenta una corrida de 6 min, se pudo observar que no aparecieron compuestos adicionales dentro de los 15 min, lo que indica que las condiciones cromatográficas, a pesar de tener un tiempo de retención relativamente corto son satisfactorias para la muestra de referencia.

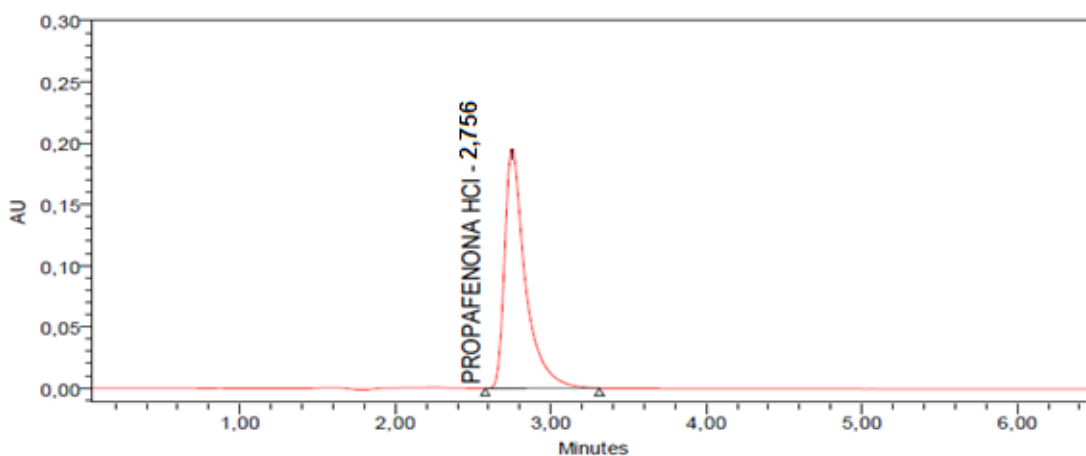


Figura X. Cromatograma de la muestra con las condiciones cromatográficas preliminares.

VI.3.2 Optimización de las Condiciones Cromatográficas Preliminares

A pesar de lograr condiciones cromatográficas relativamente aceptables en una columna de dudosa condiciones de operación, se procedió a optimizar las condiciones con una columna nueva que garantizara el funcionamiento apropiada de la misma.

Se adquirió una nueva columna cromatográfica provista por la casa Waters Corporation, modelo μ Bondapak, de fase inversa octadecilsilano, químicamente enlazada a una sílice porosa de 3,9 mm de diámetro interno y 300 mm de longitud, un tamaño de partícula irregular de 10 μ m.

Se decidió disminuir el volumen de inyección y cambiar las condiciones del modificador orgánico con la idea de aumentar el tiempo de retención. Después de una serie de modificaciones las condiciones definitivas fueron las siguientes:

Fase móvil: Buffer fosfato dibásico de potasio: Acetonitrilo (45:55)

Volumen de inyección: 10 μ L

Flujo de fase móvil: 1,5 mL/min

Un cromatograma con las mejores condiciones cromatográficas se muestra en la figura XI. Del mismo se puede observar que el clorhidrato de propafenona presentó un tiempo de $t_R = 3,179$ min y un factor de asimetría igual a 1,01, lo cual indicó un aumento de la retención relativa y una mejora fundamental de la simetría de la banda. Por otra parte, las réplicas de las inyecciones de la muestra de referencia a arrojó un promedio del $t_R = 3,179$ min, con un s de 0,001 min y un CV del orden del 0,2 %, considerados bastante aceptables.

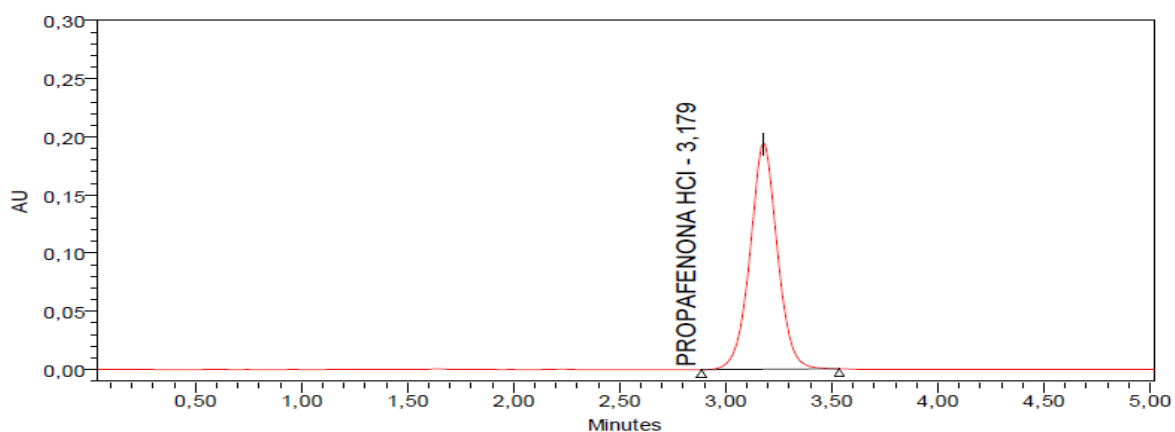


Figura XI. Fase móvil (45:55) con un volumen de inyección de 10 μ L.

Con las condiciones cromatográficas optimizadas se procedió a evaluar el sistema de tratamiento de muestra.

VI.3.3 Procedimiento de tratamiento de muestra

Este procedimiento consiste básicamente en evaluar la efectividad de la extracción en la disolución de la muestra. Para ello, se empleó la muestra de referencia y se estudiaron dos metodologías clásicas para la extracción de este tipo de muestra:

Método 1:

- Se pesó alrededor de 1/4 de peso promedio de muestra ($\pm 0,01$ mg) y se añadió una pequeña cantidad de fase móvil.
- Se agitó en el vortex durante 5 minutos.
- Se enrasó a volumen en un balón de 25,00 mL.
- Se filtró con papel de filtro Whatman 40, donde se separó la fase líquida de los residuos sólidos (excipientes) y finalmente se realizó una dilución de 3,00 en 20,00 mL respectivamente.
- Antes de inyectar la disolución en el cromatógrafo, esta se filtró con un disco de nylon de 0,45 μm .

Método 2:

- Se pesó alrededor de 1/4 de peso promedio de muestra ($\pm 0,01$ mg) y se añadió una pequeña cantidad de fase móvil.
- Se agitó en el vortex durante 5 minutos.
- Se enrasó a volumen del balón de 25,00 mL.
- La disolución se centrifugó, separando la fase líquida de los residuos sólidos (excipientes).
- Del sobrenadante, se realizó una dilución de 3,00 en 20,00 mL respectivamente.

- Antes de inyectar la solución en el cromatógrafo, esta se filtró con un disco de nylon de 0,45 μm .

Como parámetro de evaluación se empleó el área de la banda, ya que se desconoce la concentración exacta de clorhidrato de propafenona en la muestra de referencia. Los resultados que se obtuvieron en los dos métodos se muestran a continuación en la tabla IX:

Tabla IX. Cantidad de clorhidrato de propafenona obtenida en los dos métodos del tratamiento de muestra.

Método 1		Método 2	
Réplica	Áreas	Réplica	Áreas
1	1133583	1	1203362
2	1123271	2	1211920
3	1144744	3	1209121
Promedio	1133866	Promedio	1208134
s	10739	s	4363
CV	1	CV	0,4

Los datos obtenidos en la tabla IX muestran que a pesar de no encontrar grandes diferencias, el método 2 permite una ligera mejoría en la cuantificación del clorhidrato de propafenona, ya que a concentración y volumen de inyección constante se obtuvo mayor área cromatográfica (1208134 Vs 1133866), adicionalmente, el coeficiente de variación es levemente menor.

VI.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE MEDIDA

VI.4.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DEL CLORHIDRATO DE PROPAFENONA EN TABLETAS RECUBIERTAS.

Una vez desarrollada la metodología analítica se procedió a validarla, esto se llevó a cabo mediante estudios que permitieron evaluar las características de desempeño del método y conocer si estas cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.

VI.4.1.1 Evaluación de las figuras de mérito del sistema cromatográfico.

Bajo las condiciones cromatográficas optimizadas anteriormente, se procedió a inyectar replicas de un patrón 0,210 mg/mL de clorhidrato de propafenona, con la idea de evaluar bajo el régimen de repetibilidad los parámetros cromatográficos relativos a: tiempo de retención, área de la banda, factor de asimetría al 5 % de altura (AF), y número de platos teóricos (N). En la tabla X se presentan los resultados.

Tabla X. Evaluación de las figuras de mérito del sistema cromatográfico

Réplica	t_R (min)	Área	FA	N
1	3,044	1821385	1,082	2274
2	3,044	1811567	1,082	2237
3	3,045	1818107	1,079	2297
4	3,046	1815549	1,076	2268
5	3,046	1817531	1,085	2233
6	3,048	1859757	1,081	2188
Promedio	3,046	1823983	1,081	2250
s	0,002	17821	0,003	38
CV	0,05	1	0,3	2

El promedio del tiempo de retención fue de 3,046 minutos con un coeficiente de variación de 0,05 %.

El factor de asimetría fue de 1,081, indicando que la banda cromatográfica es muy simétrica, ya que el valor óptimo es 1,00 y el máximo de aceptación es de 1,50.

Se obtuvo un número de platos teóricos igual a 2250, con un coeficiente de variación de 2 %.

La repetibilidad del ancho de base arrojó un coeficiente de variación de 1 %, bastante aceptables.

VI.4.1.2. Linealidad

Para evaluar la linealidad del método se elaboraron curvas de calibración, partiendo de un patrón puro de clorhidrato de propafenona y se trabajó en un rango de 5 concentraciones comprendidas entre 0,05 y 0,41 mg/mL respectivamente. Las concentraciones de los patrones se presentan en la tabla XI.

Tabla XI. Concentraciones de clorhidrato de propafenona para la curva de calibración

Concentración (mg/mL)
0,0000
0,0506
0,1012
0,202
0,304
0,405

* El patrón se disolvió en la fase móvil Buffer fosfato dibásico de potasio: Acetonitrilo (45:55). La concentración del buffer fue de 3,42 g/L de K_2HPO_4 , ajustado con ácido fosfórico a pH de 2,5. Se Utilizó un volumen de inyección de 10 μ L y un flujo de 1,5 mL/min.

El estudio se basó en la construcción de curvas de calibración, las cuales fueron realizadas en 3 días diferentes, empleando réplicas de todos los patrones. Las curvas de calibración obtenidas se muestran en las figuras XII, XIII y XIV.

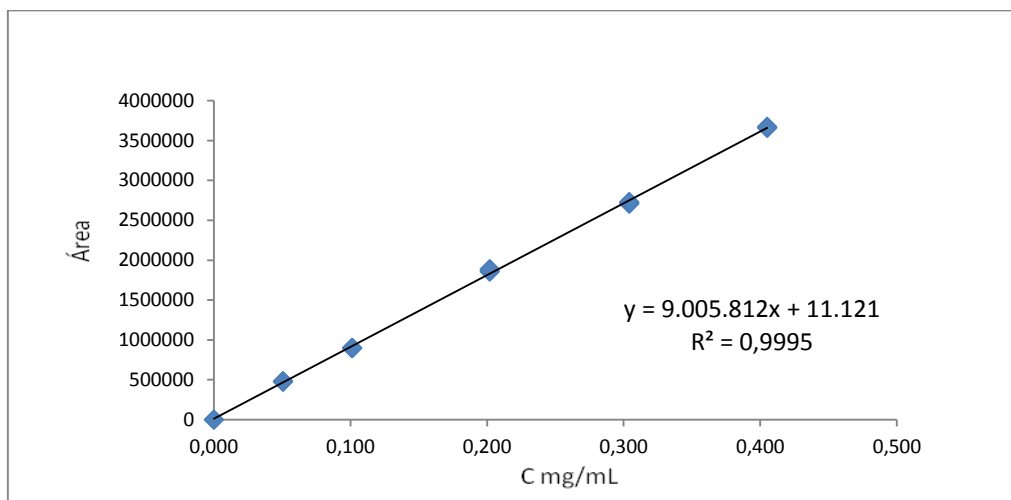


Figura XII. Curva de calibración día I.

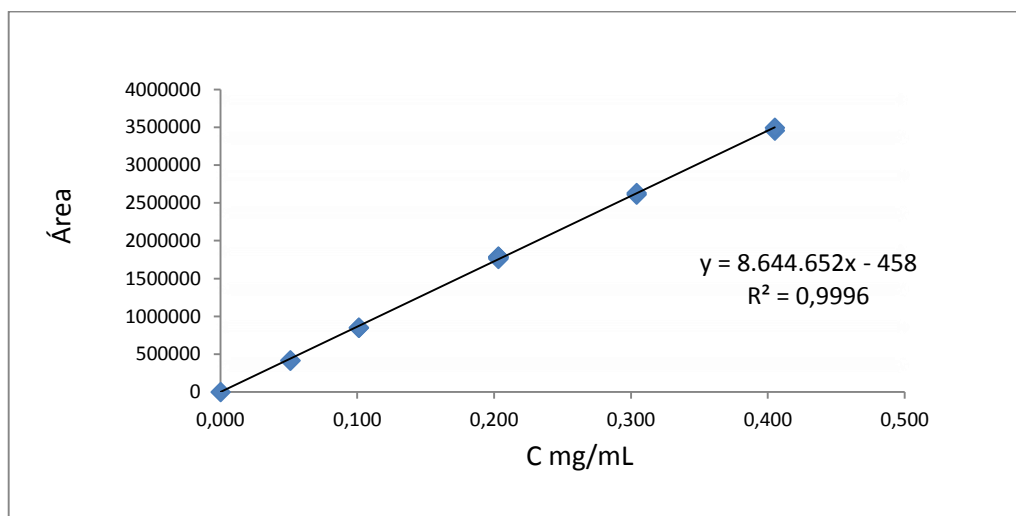


Figura XIII. Curva de calibración día II.

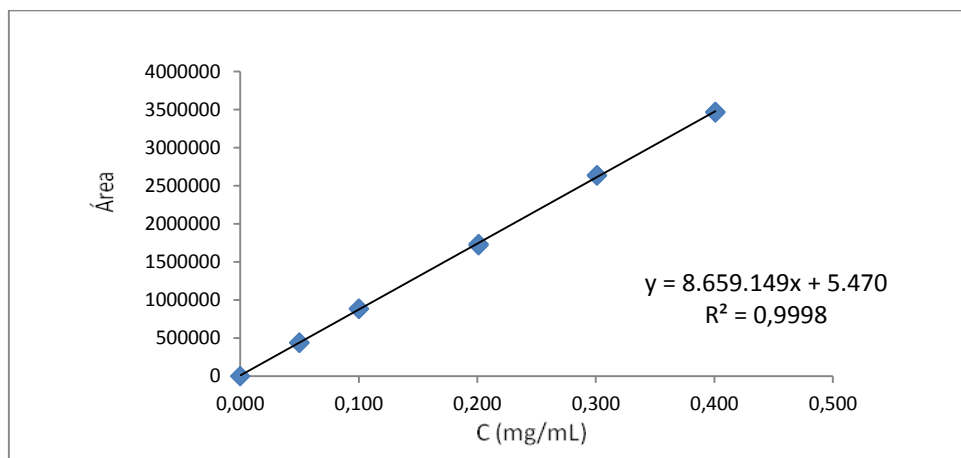


Figura XIV. Curva de calibración día III.

Las curvas de calibración presentaron coeficientes de determinación de 0,9995; 0,9996 y 0,9998, respectivamente, los resultados obtenidos muestran que el método es lineal, ya que existe proporcionalidad entre la concentración del clorhidrato de propafenona y su respuesta.

VI.4.1.3 Límites de detección y cuantificación

Se procedió a realizar los cálculos de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC), utilizando los valores de la regresión lineal y la desviación estándar de la regresión ($S_{y/x}$) obtenidas de la curva de calibración del día III. Se calculó a través de la siguiente expresión:

$$\mathbf{LD} = \frac{3,3 S_{y/x}}{S} \quad \mathbf{LC} = \frac{10 S_{y/x}}{S}$$

Donde $S_{y/x}$ = desviación estándar de la regresión.

S = pendiente de la curva de calibración.

De acuerdo a los cálculos, los valores correspondientes al límite de detección y límite de cuantificación fueron 0,006 mg/mL y 0,018 mg/mL, respectivamente.

VI.4.1.4. Precisión

La precisión del método analítico se estudió mediante la precisión del sistema (o repetibilidad instrumental), repetibilidad del método y precisión intermedia.

VI.4.1.4.1 Precisión del sistema

La precisión del sistema se realizó evaluando la dispersión de los valores obtenidos en la variación del tiempo de retención y área del clorhidrato de propafenona. Se realizaron 6 inyecciones del patrón de clorhidrato de propafenona de concentración 0,202 mg/mL y los resultados obtenidos se muestran en la tabla XII.

Tabla XII. Precisión del sistema (patrón)

Réplica	t _R (min)	Áreas
1	2,937	1891829
2	2,937	1884426
3	2,938	1859757
4	2,938	1884034
5	2,939	1889055
6	2,940	1861996
Promedio	2,938	1878516
s	0,001	13989
CV	0,03	1

* El patrón se disolvió en la fase móvil Buffer fosfato dibásico de potasio: Acetonitrilo (45:55). La concentración del buffer fue de 3,42 g/L de K₂HPO₄, ajustado con ácido fosfórico a pH de 2,5. Se Utilizó un volumen de inyección de 10 µL y un flujo de 1,5 mL/min.

Los respectivos coeficientes de variación se encuentran en 0,03 % para el tiempo de retención y 1 % para el área. Estos resultados muestran que el método es preciso, ya que el criterio de aceptación de la USP es un valor de coeficiente de variación del sistema no mayor al 2 %.

VI.4.1.4.2. Repetibilidad

Se realizó el estudio de la repetibilidad del método analítico durante tres días por el mismo analista y con el mismo equipo. Para la evaluación de la repetibilidad se empleó la muestra de referencia, donde se pesó aproximadamente 115 mg de misma.

Los resultados que se obtuvieron en la variación de la concentración del clorhidrato de propafenona en las réplicas de la muestra de referencia, se encuentran en la tabla XIII.

Tabla XIII. Repetibilidad del método analítico para el clorhidrato de propafenona presente en la muestra de referencia.

Muestra	Cantidad pesada de muestra \pm 0,01 mg	Cantidad de clorhidrato de propafenona (mg/tab)	Promedio (mg/tab)	CV
1	115,44	148,15	148,12	0,64
		147,16		
		149,06		
2	115,45	144,33	144,33	0,52
		145,81		
		145,29		
3	115,77	144,52	146,26	0,61
		146,26		
		145,74		

4	115,80	140,82	140,32	0,64
		140,32		
		140,07		
5	115,46	144,20	144,61	0,73
		142,60		
		144,61		
6	115,41	140,81	143,58	1,18
		143,58		
		143,89		
Promedio		144,5 mg/tab		
s		2,6		
CV		1,8		

* Cada muestra se colocó en un balón de 50 mL y se añadió fase móvil Buffer fosfato dibásico de potasio: Acetonitrilo (45:55), se agitó en el vortex durante 5 minutos y luego se centrifugó. Del sobrenadante se realizó una dilución de 3 en 20 mL

Las concentraciones de la muestra de referencia fueron calculadas utilizando la curva de calibración del día III (ver figura XIV).

El promedio de las seis réplicas de la muestra de referencia fue de 144,5 mg/tab con un coeficiente de variación de 1,8 %. Los resultados muestran que el método es preciso, ya que todos los valores de coeficiente de variación fueron menores a 2 % (criterio de aceptación de la USP 35).

VI.4.1.4.3. Precisión intermedia

La precisión también debe medirse bajo ciertas condiciones donde se pueda evaluar la reproducibilidad del método. Por esta razón, se realizó un estudio con 3 analistas, donde cada uno realizó dos réplicas de la muestra. Cada muestra se inyectó por triplicado a la concentración correspondiente al 100 % de la curva de calibración.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla XIV.

Tabla XIV. Precisión intermedia con diferentes analistas.

Réplica	Analista 1		Analista 2		Analista 3	
	M _x 1 (mg/tab)	M _x 2 (mg/tab)	M _x 1 (mg/tab)	M _x 2 (mg/tab)	M _x 1 (mg/tab)	M _x 2 (mg/tab)
1	144,2	140,8	142,6	143,0	146,9	149,6
2	142,6	143,5	143,5	142,3	148,7	149,5
3	144,6	143,8	143,4	142,9	149,0	148,6
Promedios	143,8	142,7	143,2	142,7	148,2	149,2
s	1,1	1,7	0,5	0,4	1,2	0,6
CV	0,7	1,2	0,4	0,2	0,8	0,4
	Analista 1		Analista 2		Analista 3	
Promedio	143,3		143,0		148,7	
s	0,8		0,3		0,7	
CV	0,5		0,2		0,5	

* Cada muestra se colocó en un balón de 50 mL y se añadió fase móvil Buffer fosfato dibásico de potasio: Acetonitrilo (45:55), se agitó en el vortex durante 5 minutos y luego se centrifugó. Del sobrenadante, se realizó una dilución de 3 en 20 mL

Las concentraciones de las muestras se obtuvieron a partir de la curva de calibración del día III.

El promedio para cada analista fue de 143,3; 143,0 y 148,7 mg/tab, respectivamente, se puede observar que el resultado del analista 3 se acercó más al valor declarado por el medicamento (150 mg/tab). Los coeficientes de variación de cada uno fueron excelentes, arrojado valores de 0,5; 0,2 y 0,5 %, respectivamente, indicándonos que el método es preciso.

VI.4.1.5 Robustez

En la tabla XV se presentan las variables escogidas para la evaluación de la robustez del método:

Tabla XV. Factores seleccionados para la evaluación de la robustez.

Factores	Niveles	
	-	+
Flujo (mL/min)	1,3	1,7
pH	3,18	3,58
% Acetonitrilo	53	57

El empleo del diseño de la matriz de Plackett y Burman, permitió estudiar el efecto que tienen las variables seleccionadas (variación de flujo, pH y proporción de acetonitrilo en la fase móvil) cuando han sido modificadas ligeramente.

Para conocer si la variable tiene influencia significativa sobre el resultado, se compara la diferencia obtenida para el cambio efectuado sobre ese parámetro y el producto de la desviación estándar y la raíz de 2:

$$\text{Si } |V_B| > s \sqrt{2} \Rightarrow \text{diferencia significativa}$$

De acuerdo a esta información se construyó la matriz aplicando el modelo de Plackett-Burman. En la tabla XVI se presenta la matriz construida.

Tabla XVI. Diseño de la matriz según el modelo de Plackett-Burman

Experimento	pH \pm 0,05	% ACN	Flujo (mL/min)
1	3,18	53	1,3
2	3,58	53	1,3
3	3,18	57	1,3
4	3,58	57	1,3
5	3,18	53	1,7
6	3,58	53	1,7
7	3,18	57	1,7
8	3,58	57	1,7

Una vez diseñada la matriz se procedió a realizar 8 experimentos mencionados en la tabla XVI.

Se empleó una concentración del patrón de clorhidrato de propafenona de 0,199 mg/mL, el cual se disolvió en la fase móvil (45:55). La concentración de clorhidrato de propafenona en la muestra de referencia fue de 0,225 mg/mL.

Para cada experimento se realizaron 6 inyecciones del patrón y muestra, los resultados obtenidos se encuentran en la tabla XVII y XVIII (ver anexo 1.1).

Tabla XIX. Interpretación de los resultados para el estudio de la robustez.

	influencia	resultado
A	-2,42	CONFORME
B	0,60	CONFORME
C	0,75	CONFORME
AB	-0,98	CONFORME
AC	1,08	CONFORME
BC	1,80	CONFORME
ABC	1,80	CONFORME

Los datos presentados en la tabla XIX permiten confirmar si la variable tiene influencia significativa sobre el resultado, esto se hace comparando la diferencia obtenida para el cambio efectuado sobre ese parámetro y el producto de s y raíz de 2.

$$\text{Si } |V_B| > s \sqrt{2} \Rightarrow \text{diferencia significativa}$$

La influencia de las variables estudiadas presentan valores por debajo de $s\sqrt{2}$, ya que el producto de este es 4,45 permitiendo concluir que el método es robusto bajo las condiciones estudiadas.

VI.4.1.6. Especificidad.

Este parámetro es muy importante, ya que se refiere a la propiedad del método de producir una señal medible debido a la presencia del analito, libre de interferencias. En el caso del análisis de un fármaco, resulta de gran utilidad contar con las materias primas, subproductos de síntesis y productos de degradación. Al no contar con este

último, fue necesario realizar un ensayo de degradación artificial que consistía en pesar alrededor de 1/4 de peso promedio de la muestra de referencia en un balón de 25,00 mL y dejarla en reposo durante 7 días bajo las siguientes condiciones:

- **Termólisis:** se sometió la muestra a calentamiento en un baño de vapor durante 4 horas a una temperatura fija de 50 °C.
- **Hidrólisis ácida:** se le añadió 5,00 mL de HCl al 10 %.
- **Hidrólisis alcalina:** se le añadió 5,00 mL de NaOH al 4 %.
- **Oxidación:** se le añadió 5,00 mL de H₂O₂ al 35 %.
- **Fotólisis:** se expuso a radiación UV.

Este análisis se completó con el estudio de pureza u homogeneidad del pico correspondiente al analito.

Pureza del pico cromatográfico

Es necesario disponer de un detector de arreglo de diodos (PDA), este detector evalúa la pureza del pico cromatográfico en 4 fases.

La primera fase consiste en comparar el espectro de cada punto del pico cromatográfico con el espectro del ápice y la marca como fase I. Si encuentra diferencias espectrales evalúa nuevamente el pico tomando en cuenta el espectro del

ápice y el espectro de la impureza como referencia y lo marca como fase 2 y así continua hasta obtener las 4 fases.

El gráfico de pureza del pico cromatográfico del patrón de clorhidrato de propafenona se muestra en la figura XV.

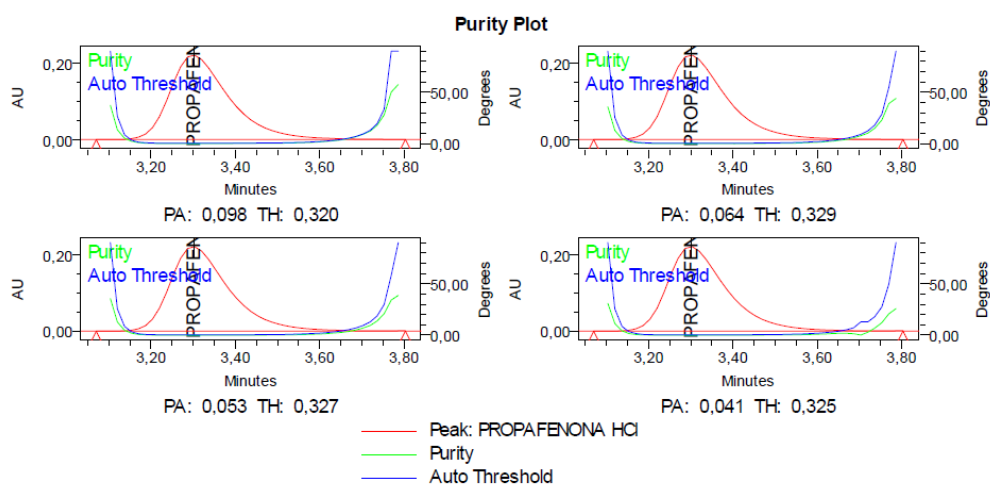


Figura XV. Gráfico de pureza del pico del patrón de clorhidrato de propafenona.

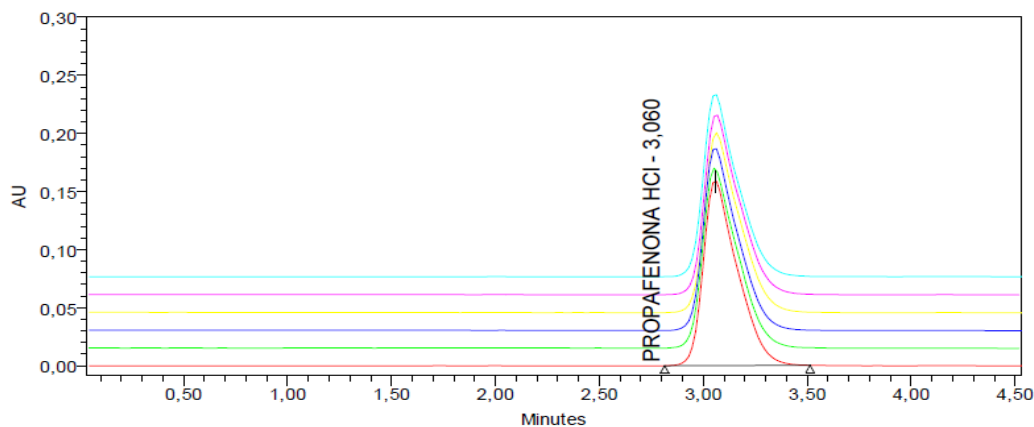
En la figura XV se muestran los ángulos de pureza (PA) obtenidos para el pico de clorhidrato de propafenona en cada fase. El ángulo del umbral (TH) tiene un valor alrededor de 0,325. Estos valores indican que el pico corresponde al del clorhidrato de propafenona, debido a que no existen evidencias espectrales significativas, ya que los ángulos de pureza son menores que el del ángulo del umbral.

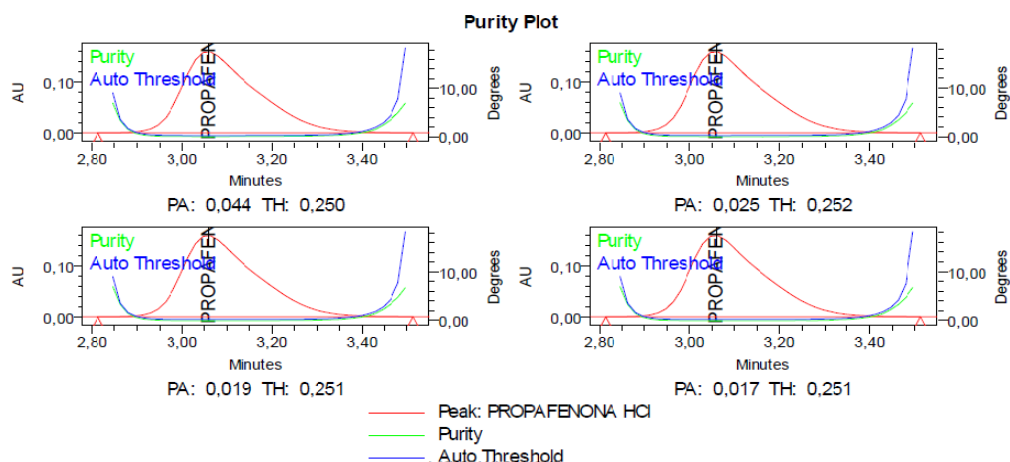
Degradación forzada

El primero paso fue tener una muestra y un patrón control de tal manera de poder establecer diferencias significativas a través de los cromatogramas y con la ayuda del PDA obtener los respectivos gráficos de pureza permitiendo ratificar la presencia o no de productos de degradación que coeluyan con el analito de interés. Para ello, la muestra fue sometida a ciertos ensayos que fueron mencionados en la sección VI.4.6. Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

Patrón control

Se preparó un patrón de concentración 0,201 mg/mL y se inyectó por sextuplicado. En la figura XVI se muestra el cromatograma y el gráfico de pureza obtenido.





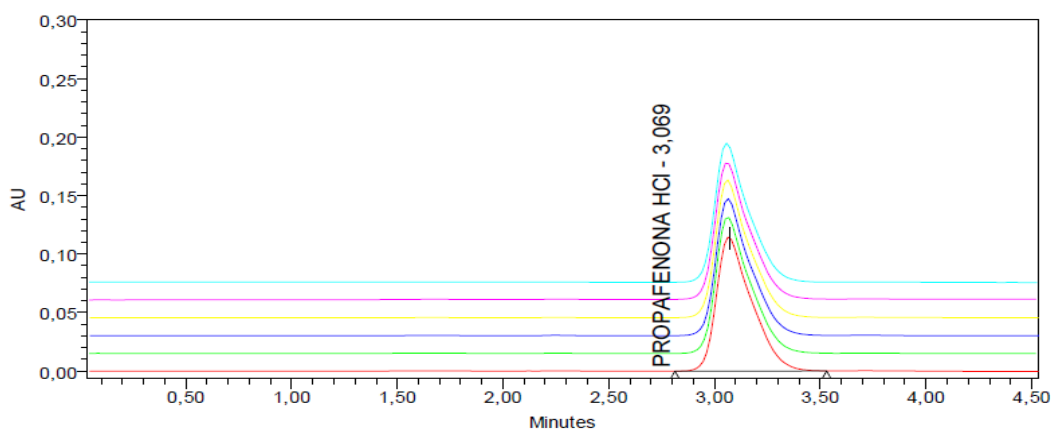
Figura

XVI. Cromatograma y gráfico de pureza del pico de clorhidrato de propafenona correspondiente al patrón control.

En la figura XVI se puede notar gran reproducibilidad en las inyecciones del patrón. Además, el valor de $PA = 0,044$ es menor que $TH = 0,250$, indicando que no hay interferencias en el pico cromatografico.

Muestra control

Se preparó la muestra de referencia según la metodología descrita en la sección VI.3.3. (Método 2), Los resultados que se obtuvieron se muestran en la figura XVII.



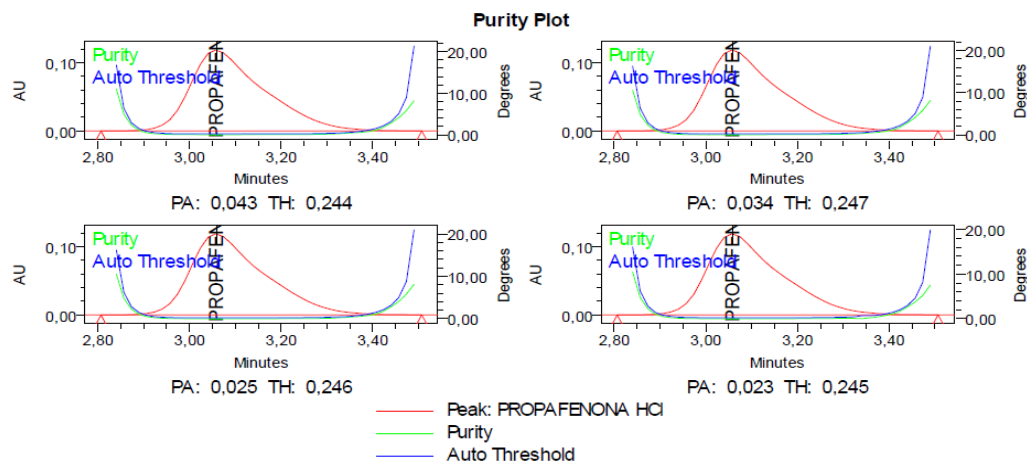
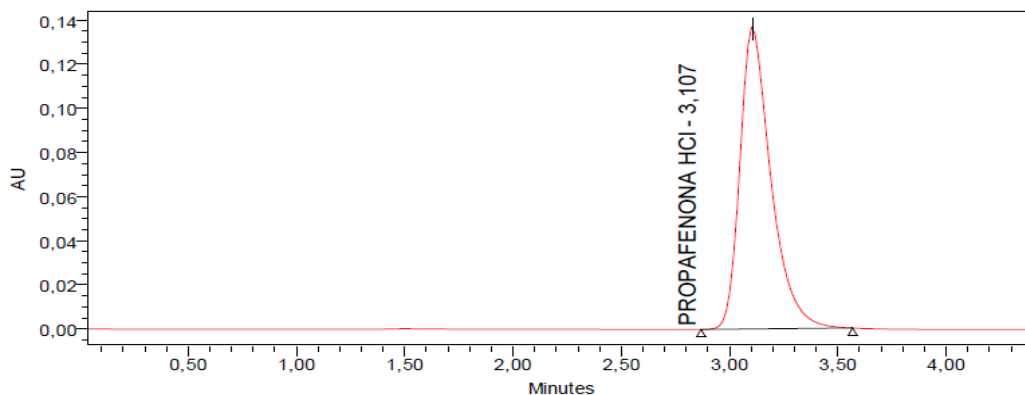


Figura XVII. Cromatograma y gráfico de pureza del pico de clorhidrato de propafenona correspondiente a la muestra control.

Al igual que en el patrón, podemos observar en la figura XVII que el valor de $PA = 0,043$ es menor que $TH = 0,244$, evidenciando que no hay interferencias en el pico cromatográfico.

Termólisis

La muestra de referencia fue sometida a calentamiento (baño de vapor) durante 4 horas y a una temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego se continuó el tratamiento de la muestra según lo descrito en la sección VI.3.3. (Método 2). Los resultados se presentan en la figura XVIII.



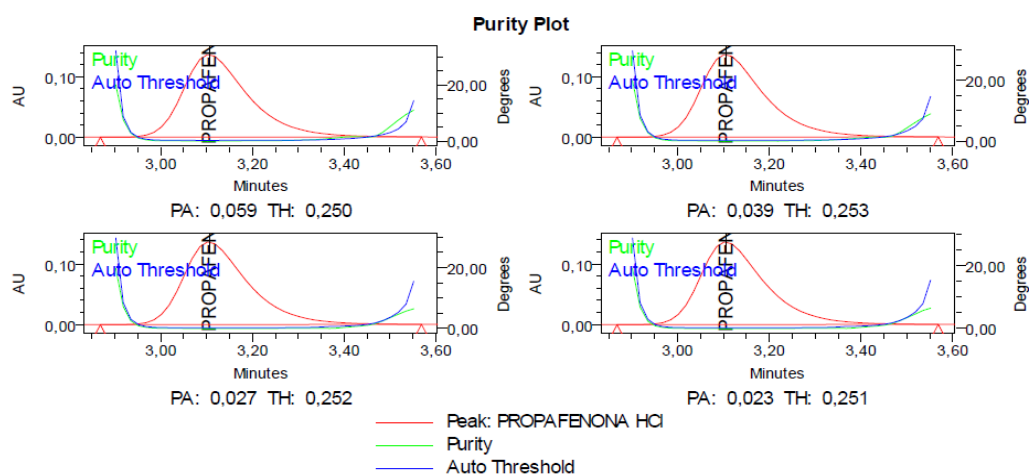


Figura XVIII. Cromatograma y gráfico de pureza del pico de clorhidrato de propafenona en la muestra de referencia sometida a termólisis.

En la figura XVIII, se puede observar la presencia de un solo pico correspondiente al clorhidrato de propafenona. En cuanto al análisis de pureza, encontramos que el valor de $PA = 0,059$ es menor que el de $TH = 0,250$ confirmando el hecho de que no hay diferencia espectral y por lo tanto, que la muestra es muy estable y no sufre degradación si se somete a una temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Hidrólisis ácida

La muestra de referencia fue sometida a una hidrólisis ácida con ácido clorhídrico al 10 % y se dejó en reposo durante 7 días. Al cumplir ese tiempo se continuó el tratamiento de la muestra según lo descrito en la sección VI.3.3. (Método 2), En la figura XIX se presenta los resultados obtenidos.

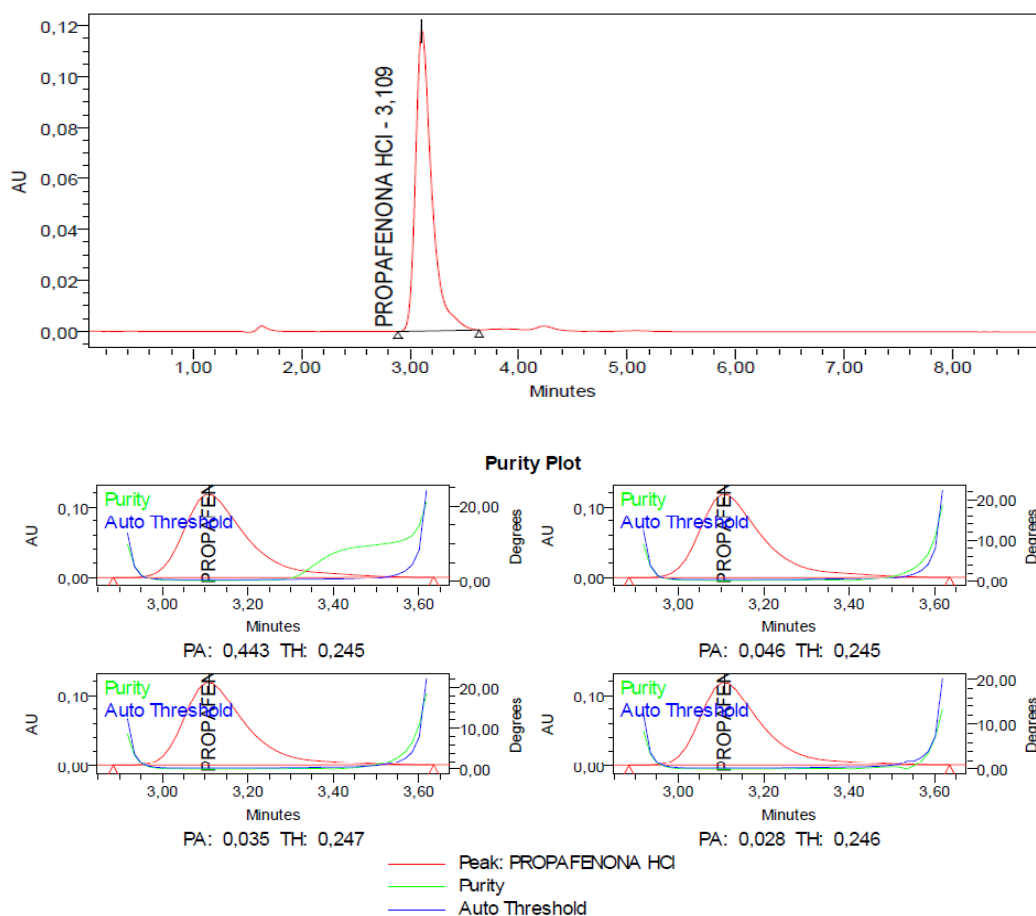


Figura XIX. Cromatograma y gráfico de pureza del pico de clorhidrato de propafenona en la muestra de referencia sometida a hidrólisis ácida.

En el cromatograma se puede observar la presencia un pico que aparece en un tiempo de retención de 3,1 minutos, el cual corresponde al clorhidrato de propafenona. Adicionalmente, se observan dos pequeñas señales antes y después del pico principal. Al evaluar los datos obtenidos en el gráfico de pureza, se observa que el valor de PA = 0,443 es mayor que el TH = 0,245, este resultado evidencia la presencia de productos de degradación que están coeluyendo con el clorhidrato de propafenona.

Hidrólisis básica

La muestra de referencia fue sometida a una hidrólisis básica con hidróxido de sodio al 4 % y se dejó en reposo durante 7 días. Al cumplir ese tiempo se continuó el tratamiento de la muestra según lo descrito en la sección VI.3.3. (Método 2), En la figura XX se presenta los resultados obtenidos.

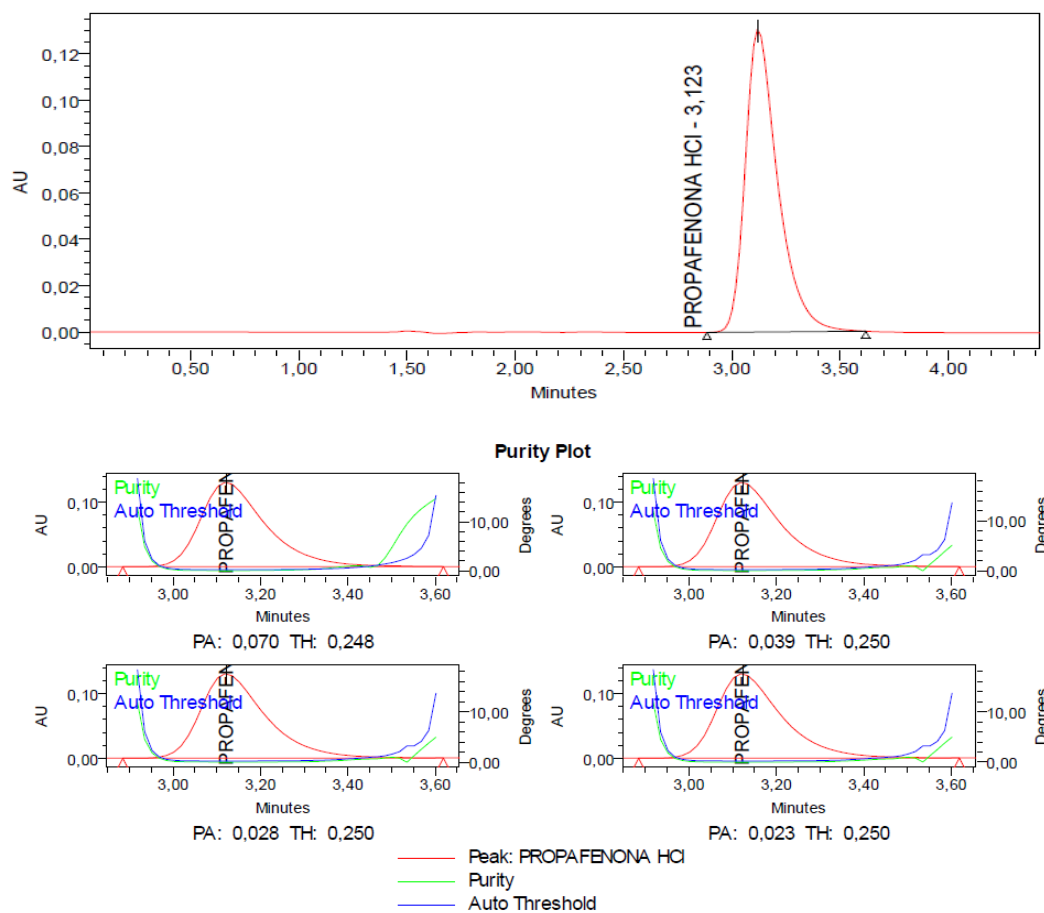
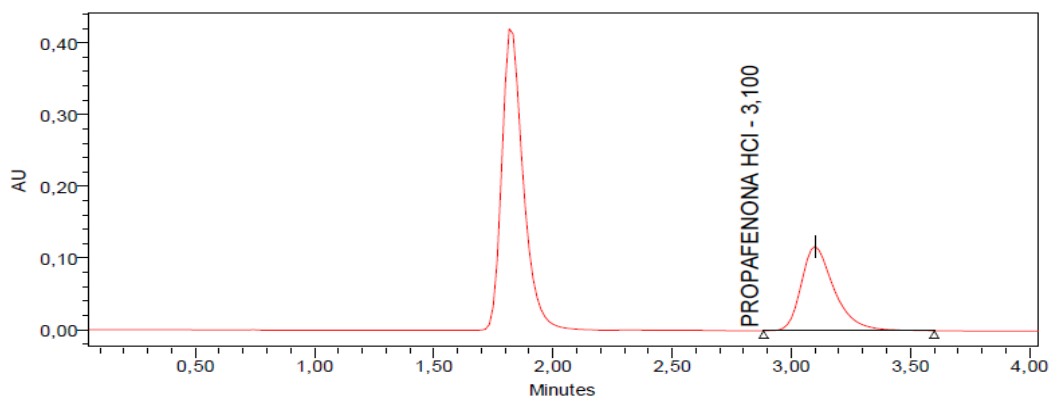


Figura XX. Cromatograma y gráfico de pureza del pico de clorhidrato de propafenona en la muestra de referencia sometida a hidrólisis básica.

En el cromatograma sólo se observa una señal correspondiente al clorhidrato de propafenona, y el análisis del gráfico de pureza confirma este hecho, ya que el valor de PA = 0,070 es menor que el TH = 0,248 indicando que no hay interferencia en el pico cromatográfico. Por lo tanto, la muestra es estable frente a una hidrólisis básica.

Oxidación con peróxido de hidrógeno

La muestra de referencia fue sometida a exposición con peróxido de hidrógeno al 35% durante 7 días. Al cumplir ese tiempo se continuó el tratamiento de la muestra según lo descrito en la sección VI.3.3. (Método 2), En la figura XXI se presenta los resultados obtenidos.



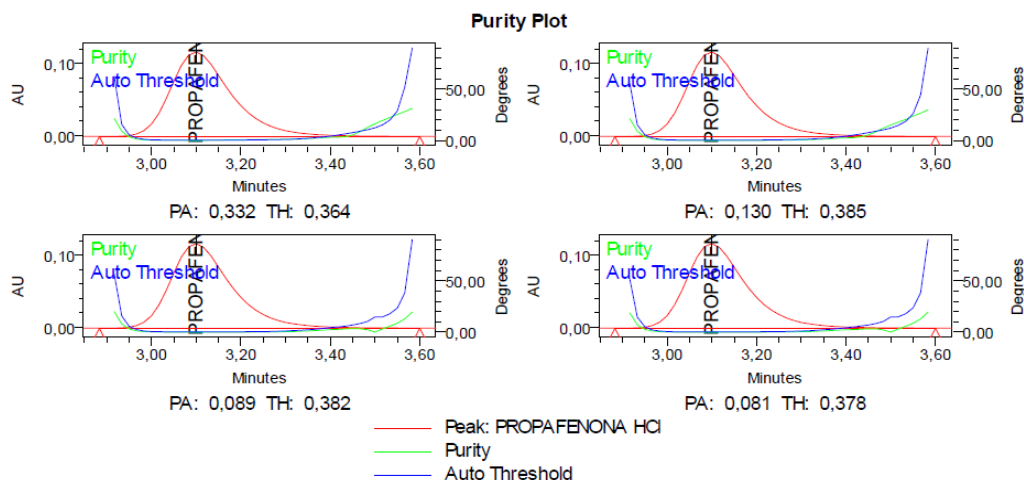


Figura XXI. Cromatograma y gráfico de pureza del pico de clorhidrato de propafenona en la muestra de referencia sometida a oxidación con peróxido de hidrógeno.

En el cromatograma de la figura XXI se pueden observar 2 señales. La señal correspondiente al clorhidrato de propafenona se ve reducida y aparece a los 3,1 minutos. También se observa un pico de señal muy intensa a los 1,824 minutos. Este hecho indica que la muestra se degrada en presencia de peróxido de hidrógeno. Al estudiar el gráfico de pureza se puede notar que el valor de $PA = 0,332$ está muy cercano al $TH = 0,364$ indicando que posiblemente pueda estar presente algún tipo de interferencia dentro de la señal del clorhidrato de propafenona.

Fotólisis

La muestra de referencia fue expuesta a radiación UV por 7 días. Al cumplir ese tiempo se continuó el tratamiento de la muestra según lo descrito en la sección VI.3.3. (Método 2). En la figura XXII se presenta los resultados obtenidos.

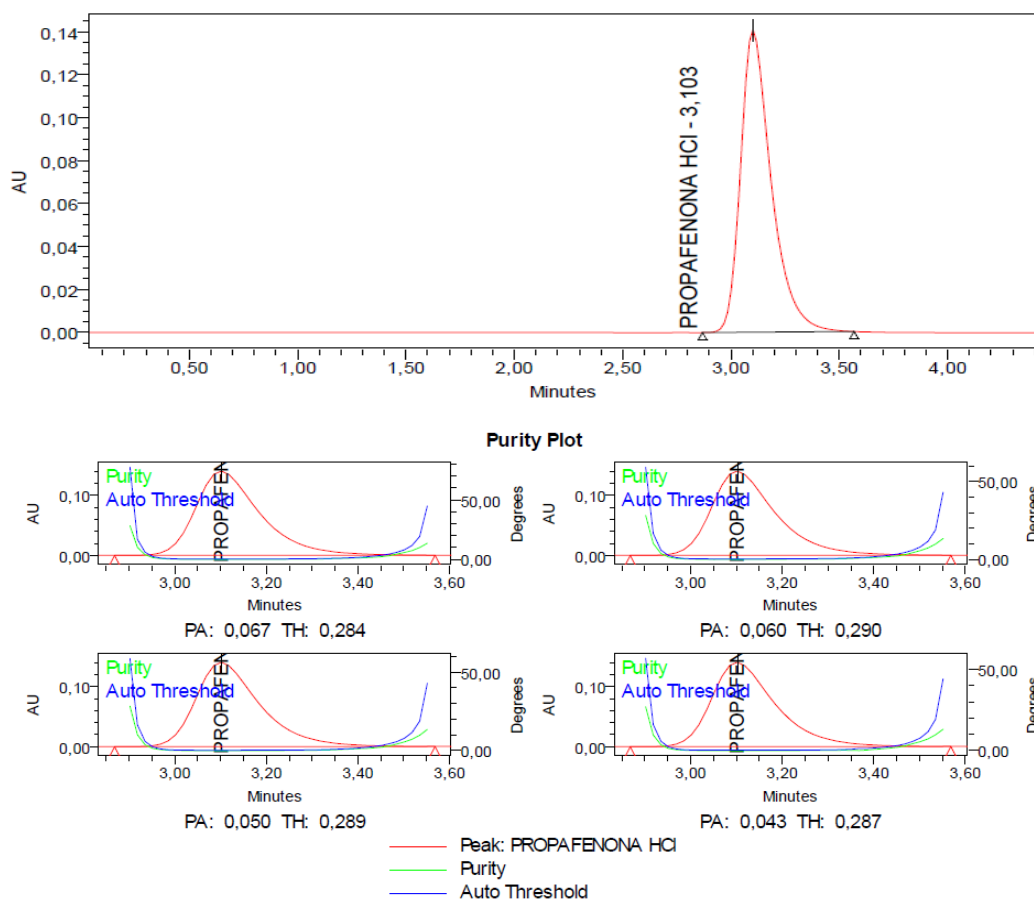


Figura XXII. Cromatograma y gráfico de pureza del pico de clorhidrato de propafenona en la muestra de referencia sometida a radiación UV.

En el cromatograma sólo se observa una señal, indicando que la muestra es estable si somete a radiación UV. Este hecho lo confirma el gráfico de pureza, ya que el valor de $PA = 0,067$ es menor que el $TH = 0,284$ evidenciando que no hay interferencia en el pico cromatográfico, y por lo tanto, que la muestra no sufre degradación bajo la exposición a radiación UV.

Muestra a los 7 días de preparación

Se preparó la muestra de referencia bajo las mismas condiciones que la muestra control y se dejó en reposo durante 7 días luego de su preparación. Los resultados obtenidos se muestran en la figura XXIII.

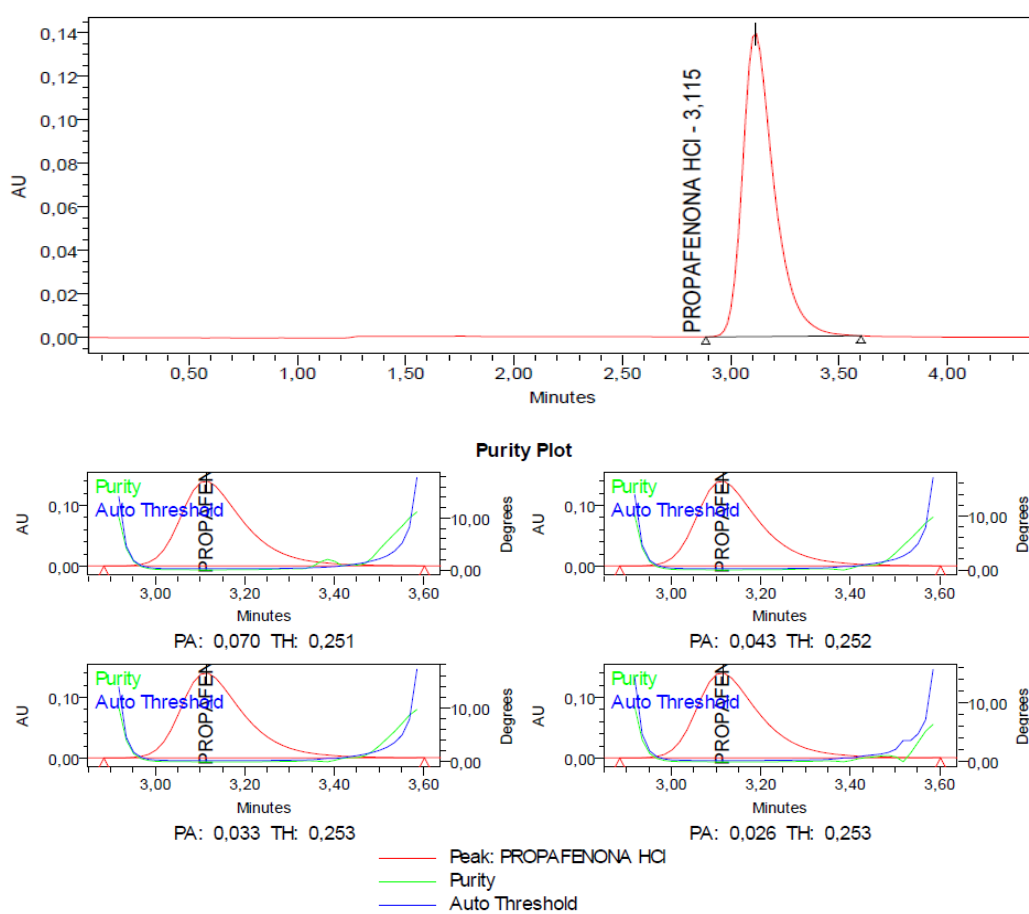


Figura XXIII. Cromatograma y gráfico de pureza del pico de clorhidrato de propafenona en la muestra de referencia 7 días después de su preparación.

En el cromatograma solo se observa una señal correspondiente al clorhidrato de propafenona. El análisis del gráfico pureza muestra que el valor de PA = 0,070 es menor que el TH = 0,251, lo cual demuestra que no existe diferencia espectral, por lo tanto la muestra es estable durante siete días después de ser preparada.

VI.4.1.7. Exactitud

La exactitud fue evaluada utilizando tres concentraciones del analito, preparadas por triplicado y cubriendo un rango de concentración del 80, 100 y 120 %. Para cada rango de concentración se pesó alrededor de 114 – 116 mg de la muestra de referencia en un balón de 50,00 mL. Se le agregó una pequeña cantidad de fase móvil (45:55) y se agitó en el vortex durante 5 minutos. Se centrifugó y se tomó 1,00 mL como cantidad fija y se llevó a un balón de 20,00 mL, donde para cada rango de concentración (80, 100 y 120 %) se añadió 4,00, 5,00 y 8,00 mL del patrón de clorhidrato de propafenona de concentración 0,598 mg/mL.

La exactitud se calculó como el porcentaje de recuperación y el ensayo contempló la contaminación de la muestra con el patrón de concentración conocida (como se describió anteriormente). Esta se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de Recuperación} = \frac{C_{\text{fortificada}} - C_{\text{Sin fortificar}}}{C_{\text{añadida de patrón conocido}}} \times 100$$

Ecuación 5. Cálculo del porcentaje de recuperación.

Los resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método se encuentra en las tablas XX (Ver anexo, sección 2) y en las tablas XXI y XXII.

Tabla XXI. Concentraciones de clorhidrato de propafenona en las muestra de referencia sin fortificar y fortificadas.

		Concentración (mg/mL)			
	Cantidad pesada de muestra $\pm 0,01$ mg	Sin fortificar	Fortificadas		
			80 %	100 %	120 %
80 %	116,43	0,0720	0,1908		
	116,48	0,0716	0,1941		
	116,94	0,0731	0,1923		
100%	115,48	0,0743		0,2269	
	115,63	0,0739		0,2234	
	115,64	0,0739		0,2255	
120%	114,92	0,0729			0,3129
	114,97	0,0720			0,3125
	114,05	0,0715			0,3071

* Se inyectaron 10 μ L y se utilizó un flujo de 1,5 mL/min.

Las concentraciones de las muestras de referencia fueron calculadas utilizando la curva de calibración del día III (ver figura XIV) y los resultados se mostraron en la tabla XXI.

Finalmente se calculó el porcentaje de recuperación mediante la ecuación 5.

Tabla XXII. Porcentaje de recuperación.

	Cantidad pesada de muestra $\pm 0,01$ mg	% Recuperación	Promedio	CV
80 %	116,43	99,38	100,50	1,68
	116,48	102,44		
	116,94	99,67		

100 %	115,48	102,05	101,16	1,04
	115,63	100,00		
	115,64	101,44		
120 %	114,92	100,33	99,78	1,13
	114,97	100,52		
	114,05	98,49		

Los resultados de exactitud en términos de porcentaje de recuperación para el clorhidrato de propafenona se encuentran en el rango comprendido entre 99,78 a 101,16 % con coeficientes de variación que oscilan entre 1,04 y 1,68 %. Indicando que la recuperación del analito es aceptable y que el método es exacto.

VI.6 ENSAYO DE DISOLUCIÓN

La absorción del fármaco después de la administración del medicamento dependerá de la correcta liberación de la sustancia medicinal en el organismo. Una prueba que proporciona información *in vitro* de este hecho es la evaluación de los ensayos de disolución.

El ensayo de disolución es una prueba de carácter farmacopéico que mide la velocidad a la cual una determinada cantidad de fármaco presente en una forma de dosificación sólida se disuelve en el tiempo, bajo condiciones estandarizadas tales como: interfase líquido/sólida, temperatura y composición del disolvente. Asimismo, permitirá establecer comparaciones entre medicamentos con la misma dosis y forma farmacéutica, para comprobar si existe similitud entre ellos.

En este orden de ideas, se desea proponer una metodología analítica que permita realizar la prueba de ensayo de disolución para tabletas de clorhidrato de propafenona, ya que no se encuentra reportada ninguna metodología hasta la fecha.

La agencia de medicamentos y alimentos de los Estados Unidos (FDA, Food and Drug Administration), señala las condiciones del ensayo de disolución para el clorhidrato de propafenona, sin describir ciertos detalles del mismo (tabla XXIII).

Tabla XXIII. Condiciones del ensayo de disolución propuesto por la FDA.

Nombre del medicamento	Forma de dosificación	USP Aparato	Frecuencia de giro (rpm)	Medio	Volumen (mL)	Tiempos de muestreo (min)
Propafenona HCl	Tableta	II (Paleta)	75	HCl 0,1 N	900	10, 20, 30 y 45

La FDA no especifica el método de medida para evaluar el ensayo de disolución, en nuestro caso particular, empleamos la espectrofotometría UV-Visible, ya que es una técnica sencilla, económica y rápida de utilizar.

VI.6.1. Selección de la longitud de onda.

En un espectrofotómetro UV-Visible se procedió a realizar un barrido de longitudes de ondas del patrón puro de clorhidrato de propafenona disuelto en HCl 0,1 N. El objetivo fue determinar la longitud de onda a monitorear en el ensayo de disolución. Tal como se muestra en la figura XXIV se realizó un barrido entre 200 a 400 nm respectivamente, presentando dos máximos, uno a 251 nm y otro de menor coeficiente de absorptividad a 305 nm. Se escogió la longitud de onda de 251 nm por ser la de mayor coeficiente de absorptividad y por consiguiente la de mayor sensibilidad.

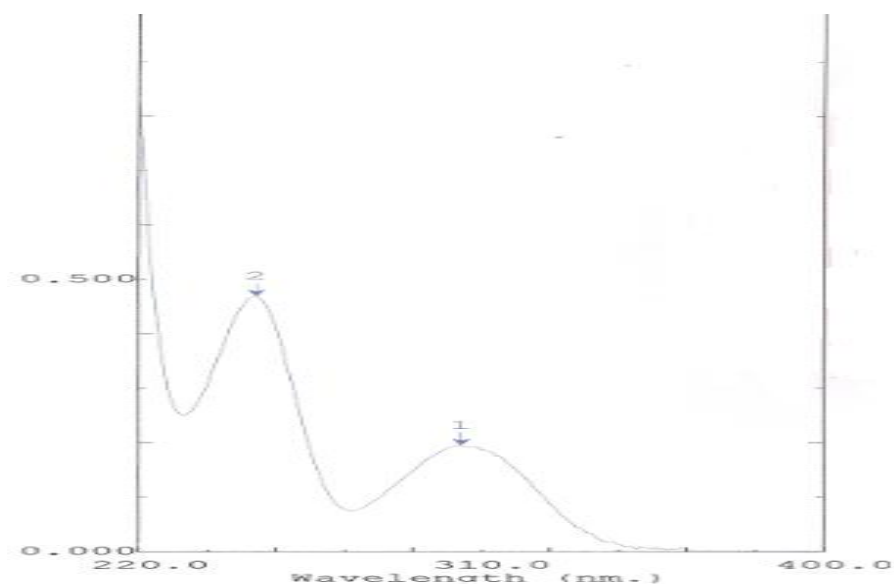


Figura XXIV. Espectro de absorción UV del patrón de clorhidrato de propafenona.

VI.6.2. Procedimiento del ensayo de disolución.

Bajo los parámetros establecidos en la tabla XXIII, se realizaron los ensayos de disolución, analizando 12 tabletas para cada medicamento mediante el siguiente procedimiento:

- Se colocó en cada vaso del disolutor 900 mL de HCl 0,1 N
- Se ajustó la temperatura del medio de disolución en $37,0 \pm 0,5$ °C.
- Se programó la velocidad de las paletas a 75 rpm y la temperatura del baño a $37,0 \pm 0,5$ °C.
- Se colocó la tableta dentro del vaso donde se encuentra el medio de disolución.
- Se realizaron 4 muestreos en los tiempos: 10, 20, 30 y 45 minutos.
- Durante cada intervalo de tiempo, se tomaron 5,00 mL de muestra con una inyectadora y se repuso el volumen de medio extraído con ácido clorhídrico 0,1 N a $37,0 \pm 0,5$ °C.
- Se diluye la alícuota tomada, tomando 3 mL de la misma y se llevó a volumen en un balón de 25 mL, con HCl 0,1 N.
- Cada muestra fue filtrada con una membrana de nylon de 0,45 μ m.
- Se determina el valor de absorbancia en el espectrofotómetro UV-visible, en una celda de cuarzo de 1,0 cm de paso óptico, a una longitud de onda de 251 nm, empleando como blanco HCl 0,1 N.

Los resultados de estos ensayos se presentarán en el apartado correspondiente a la validación del método para el ensayo de disolución, específicamente en la evaluación de la precisión (repetibilidad). Por consiguiente a continuación procedemos a la validación del ensayo de disolución, a fin de comprobar que esta metodología es confiable para evaluar el comportamiento in vitro de la disolución.

VI.7. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA EL ENSAYO DE DISOLUCION DE CLORHIDRATO DE PROPAFENONA EN TABLETAS RECUBIERTAS.

La validación del ensayo de disolución se realizó de acuerdo a lo establecido en la USP 35, apartado <1225>, correspondiente a la Categoría III. Esto se debe a que la prueba de disolución se considera una característica de desempeño del medicamento, es decir, permite evaluar específicamente la cantidad de principio activo disuelto en un tiempo determinado. Dicha categoría solamente exige la evaluación de la precisión como requisito esencial. Para la validación de ensayo de disolución solo se evaluaron dos parámetros: la precisión, la linealidad y rango del método.

VI.7.1 Linealidad y Rango

Para la evaluación de la linealidad se realizaron curvas de calibración, partiendo de un patrón puro de clorhidrato de propafenona disuelto en HCl 0,1 N y se trabajó en un rango de 5 concentraciones comprendidas entre 0,01 y 0,03 mg/mL. Las concentraciones de los patrones se presentan en la tabla XXIV.

Tabla XXIV. Concentraciones de clorhidrato de propafenona para la curva de calibración.

Concentración (mg/L)
0,00000
0,01245
0,01660
0,0208
0,0249
0,0332

* Se determinó la absorbancia de cada solución a la longitud de onda de 251 nm.

El estudio se basó en la construcción de curvas de calibración en tres días diferentes. Donde se midió la absorbancia de los patrones mencionados en la tabla XXIV.

Las curvas de calibración obtenidas se muestran en las figuras XXV, XXVI y XXVII.

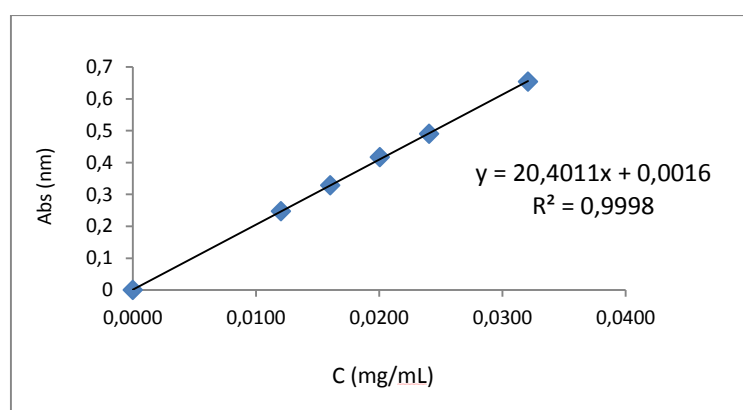


Figura XXV. Curva de calibración I.

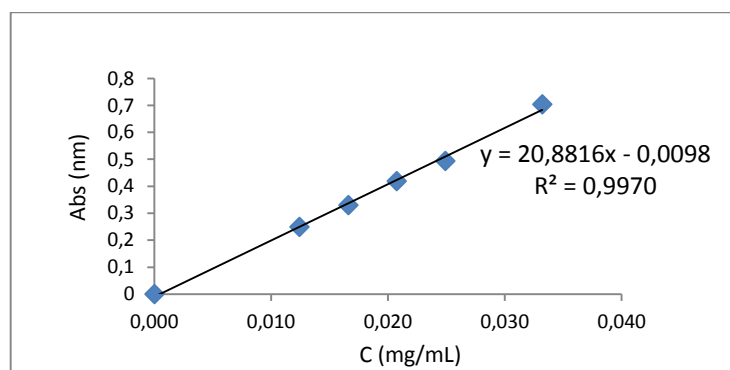


Figura XXVI. Curva de calibración II.

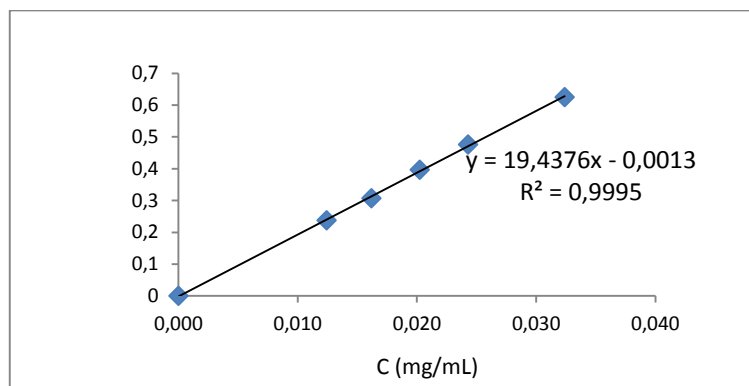


Figura XXVII. Curva de calibración III.

Las tres curvas de calibración presentaron coeficientes de determinación de 0,9998; 0,9970 y 0,9995, de los días 1, 2 y 3 respectivamente. En función a estos resultados, se puede señalar que se mantiene la linealidad entre la concentración del clorhidrato de propafenona y su respuesta.

VI.7.2. Precisión

La precisión del método analítico para el ensayo de disolución se estudió mediante la repetibilidad.

VI.7.2.1. Repetibilidad

La repetibilidad del método analítico se evaluó realizando dos ensayos de disolución en un mismo día, de 12 tabletas recubiertas y para su determinación, solo se tomaron en cuenta los valores porcentaje disuelto a los 45 minutos del ensayo. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla XXV.

Los cálculos de los porcentajes disueltos de clorhidrato de propafenona se realizaron utilizando la curva para determinar la concentración de la muestra disuelta. El porcentaje disuelto se expresa en función a la cantidad declarada por el fabricante:

$$\% \text{ Disuelto} = (\text{Conc Disuelta} / \text{Conc Declarada}) \times 100$$

Tabla XXV. Repetibilidad.

Tableta	% Disuelto
1	98,30
2	100,02
3	97,76
4	99,77
5	101,29
6	100,80
7	98,32
8	99,45
9	101,77
10	99,66
11	100,64
12	96,69
Promedio	99,54
S	1,52
CV	1,53

* De las muestras tomadas a los 45 minutos, se realizó una dilución de 3 en 20 mL y se llevó a su respectivo volumen con HCl 0,1 N. Se determinó la absorbancia de cada solución a la longitud de onda de 251 nm.

En los datos de la tabla XXV, se puede observar que a los 45 minutos del ensayo de disolución las tabletas se disuelven en un 99,54 %, con un respectivo coeficiente de variación de 1,53 %.

El criterio de aceptación para la repetibilidad (12 tabletas) no debe ser mayor de 20 % por lo tanto, se puede señalar que el método fue preciso. ^[24]

VI.8. PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVOS.

Se realizaron perfiles de disolución comparativos para los medicamentos Rytmonorm y Normorytmin. Esto se hizo con el objetivo de saber si muestran comportamiento semejante en relación con sus características de velocidad de disolución.

Se realizaron 4 muestreos en los tiempos: 10, 20, 30 y 45 minutos. De la muestra extraída se realizó una dilución de 3 en 20 mL y se llevó a su respectivo volumen con HCl 0,1 N. Los resultados se presentan en la tabla XXVI, XXVII y en la figura XXX.

Tabla XXVI. Perfil de disolución de tabletas recubiertas de clorhidrato de propafenona 150mg. (Rytmonorm).

Tableta	% Disuelto			
	10 min	20 min	30 min	45 min
1	70,62	96,11	98,69	98,30
2	65,44	92,90	93,00	100,02
3	41,01	85,47	96,17	97,76
4	66,42	91,67	98,18	99,77
5	87,15	100,33	100,49	101,29
6	90,11	100,08	101,18	100,80
7	71,08	94,19	100,51	98,32
8	43,68	98,31	98,42	99,45
9	55,42	99,93	99,81	101,77
10	38,15	88,63	102,08	99,66
11	76,84	99,50	100,36	100,64
12	54,50	95,56	99,81	96,69
Promedio	63,37	95,22	99,06	99,54
S	17,20	4,85	2,47	1,52
CV	27,14	5,09	2,49	1,53

Tabla XXVII. Perfil de disolución de tabletas recubiertas de clorhidrato de propafenona 150mg. (Normorytmin).

Tableta	% Disuelto			
	10 min	20 min	30 min	45 min
1	62,41	84,97	98,62	98,73
2	69,31	90,10	90,20	99,51
3	69,05	94,44	100,94	101,05
4	35,31	80,34	96,28	99,97
5	43,23	81,88	100,54	104,59
6	65,47	98,27	102,22	103,61
7	27,63	85,96	101,14	100,99
8	72,12	99,56	99,67	100,99
9	39,65	88,27	101,67	101,78
10	74,68	96,75	101,71	101,83
11	49,37	92,12	99,01	100,51
12	27,63	101,55	101,92	102,80
Promedio	52,99	91,18	100,27	101,36
S	17,81	7,07	3,39	1,69
CV	33,62	7,75	3,38	1,66

En los datos en las tablas XXVI y XXVII se puede observar que el porcentaje disuelto de clorhidrato de propafenona aumenta en el transcurso del tiempo. Encontrándose en un rango de 63,37- 99,06 % para el Rytmonorm y 52,99 – 101,36 % para el Normorytmin.

La figura XXVIII muestra gráficamente el % disuelto de clorhidrato de propafenona en el tiempo.

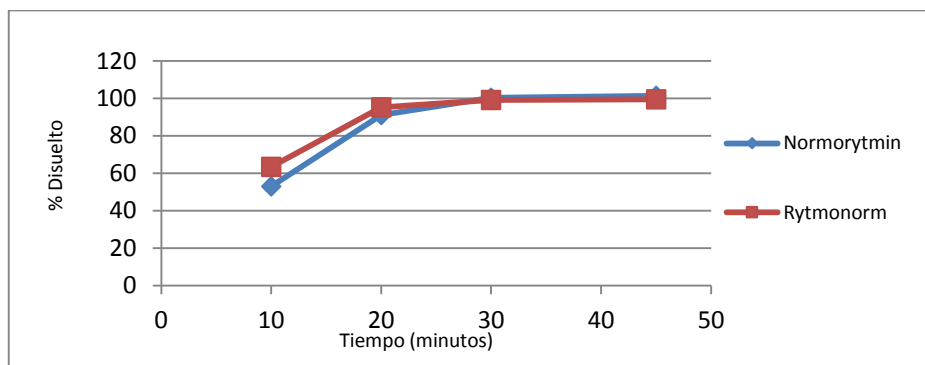


Figura XXVIII. Gráfico de los perfiles de disolución de los medicamentos Rytmonorm y Normorytmin.

Para comparar estadísticamente la diferencia en el porcentaje del fármaco disuelto por unidad de tiempo entre las dos formulaciones, es necesario utilizar el factor de diferencia f_1 y el factor de similitud f_2 (ver sección II.6.2.1).

A partir del perfil de disolución se logró determinar el factor de diferencia f_1 y el factor de similitud f_2 (Ver tabla XXVIII).

Tabla XXVIII. Cálculo del factor de diferencia y factor de similitud.

Factor de diferencia f_1	Factor de Similitud f_2	Dictamen
3,19	66,21	Cumple

El factor de diferencia fue 3,19; este valor se encuentra en el límite aceptable que es de (0-15). En cuanto al factor de similitud f_2 , se obtuvo un valor de 66,21, este también entra en el intervalo aceptable (50 - 100). Estos resultados nos indican que las dos

curvas pueden considerarse similares, y por lo tanto, que los dos medicamentos tienen el mismo comportamiento de disolución y liberación del principio activo.

VI.9. APLICACIÓN DE LA METODOLOGIA ANALITICA VALIDADA EN EL ANÁLISIS DE TABLETAS DE CLORHIDRATO DE PROPAFENONA EN OTROS MEDICAMENTOS.

Se desea aplicar la metodología desarrollada y validada en el análisis de un medicamento que contenga 150 mg de clorhidrato de propafenona. En el mercado nacional no se encuentra ningún genérico del medicamento Rytmonorm. Por esta razón, se decidió realizar un análisis al medicamento innovador Normorytmin 150 mg tabletas recubiertas.

VI.9.1 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE CLORHIDRATO DE PROPAFENONA EN TABLETAS RECUBIERTAS.

Se hicieron tres réplicas y dos inyecciones de la muestra y los resultados obtenidos se presentan en la tabla XXIX.

Tabla XXIX. Cantidad de clorhidrato de propafenona en Normorytmin.

Cantidad pesada de muestra \pm 0,01 mg	Área	Concentración mg/tab	Promedio mg/tab	CV
114,44	1704212	138,39	139,7	1,3
	1736689	141,03		
114,36	1720050	139,68	138,5	1,2
	1690508	137,28		
114,36	1678780	136,43	138,2	1,8
	1721954	139,93		
Promedio			138,8 mg/tab	
s			0,8	
CV			0,6	

Al observar la tabla XXIX, se puede apreciar que hay buena reproducibilidad en los valores de las áreas y que la cantidad de clorhidrato de propafenona presente en la muestra es de 138,8 mg/tab, con un buen coeficiente de variación de 0,6 %. El medicamento tiene un 92,53 % de lo declarado, cumpliendo con el límite de aceptación que se encuentra entre el 90-110%

VII. CONCLUSIONES

- Se desarrolló una metodología analítica por cromatografía líquida de alta eficiencia con detección UV-Visible de arreglo de diodos para la cuantificación del clorhidrato de propafenona. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: se empleó una columna μ Bondapak, de fase inversa octadecilsilano, químicamente enlazada a una sílice porosa de 3,9 mm de diámetro interno y 300 mm de longitud, un tamaño de partícula irregular de 10 μ m. La fase móvil estaba compuesta por un buffer fosfato dibásico de potasio: acetonitrilo en una proporción (45:55), el flujo de la fase móvil de 1,5 mL/min, el volumen de inyección de 10 μ L y la longitud de onda de 248 nm.
- La validación del método se realizó según el protocolo establecido por la <1225> USP 35-NF30.
- La linealidad se observó en el rango de los 5 niveles de concentración, que iban desde 0,05 y 0,41 mg/mL, con coeficientes de correlación mayor de 0,999.
- Se demostró que el método era preciso, ya que los coeficientes de variación obtenidos para la precisión del sistema se encuentran en 0,03 % para el tiempo de retención y 1 % para el área. Para la repetibilidad y precisión intermedia, los coeficientes de variación se encontraban entre 0,2 – 1,8 %, cumpliendo el criterio de aceptación de la USP que establece un valor de coeficiente de variación del sistema no mayor al 2 %.
- De acuerdo a los cálculos, los valores correspondientes al límite de detección y límite de cuantificación fueron 0,006 mg/mL y 0,018 mg/mL, respectivamente.

- El método fue hallado robusto bajo las condiciones de pH= $3,38 \pm 0,2$; flujo $1,5 \pm 0,2$ mL/min y porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil= 55 ± 2 %.
- Los resultados de exactitud en términos de porcentaje de recuperación para el clorhidrato de propafenona se encontraron en el rango comprendido entre 99,78 a 101,16 % con coeficientes de variación que oscilan entre 1,04 y 1,68 %. Indicando que la recuperación del analito fue aceptable y que el método es exacto.
- Al no contar con los productos de degradación, fue necesario realizar un ensayo de degradación artificial, este análisis se completó con el estudio de pureza u homogeneidad del pico correspondiente al analito.
- Las muestras que se sometieron a hidrólisis ácida y oxidación con peróxido de hidrógeno, sufrieron degradación. Mientras que las muestras sometidas a los 7 días de preparación, calor, hidrólisis básica y radiación UV se mantuvieron estables bajo estas condiciones, ya que no se encontraron diferencias espectrales.
- Una vez validado el método, se aplicó el análisis al medicamento innovador Normorytmin 150 mg, proveniente de Argentina. El medicamento posee un 92,53 % de lo declarado, cumpliendo con el límite de aceptación que se encuentra entre el 90-110%.
- Se desarrolló una metodología analítica para el ensayo de disolución por espectrofotometría. Para el ensayo de disolución las condiciones del análisis fueron las siguientes: se empleó como medio de disolución 900 mL de ácido clorhídrico 0,1 N, a una temperatura de 37°C. El ensayo de disolución se realizó

en 45 minutos y se analizaron las muestras obtenidas en un espectrofotometro a una longitud de onda de 251 nm, utilizando ácido clorhídrico 0,1 N como blanco.

- Se validó el método analítico para el ensayo de disolución y se encontró que el método era lineal en las concentraciones comprendidas entre 0,01 y 0,03 mg/mL. Además, se puede señalar que el método fue preciso ya que se obtuvo un coeficiente de variación de 1,53 %, entrando en el límite de aceptación.
- Se realizó el perfil de disolución para los medicamentos Rytmonorm y Normorytmin, encontrándose que los valores del factor de diferencia y similitud se encuentran en el intervalo aceptable, y que los dos medicamentos pueden considerarse similares.

VIII. RECOMENDACIONES

- Una vez desarrollado y validado el método, este puede ser utilizado como método de control de calidad, con el fin de garantizar que cualquier unidad de producto, dentro de un lote, cumpla con las pruebas y criterios de aceptación correspondientes. Permitiendo tener una combinación de medidas de prevención y de inspección, de manera que los defectos en el producto final se minimicen aplicando las reglas contempladas en las normas de correcta fabricación.

IX. ANEXOS

1. Áreas obtenidas al evaluar la robustez del método.

Tabla XVII. Áreas obtenidas en los 8 experimentos (Patrón)

	1	2	3	4	5	6	Promedio	CV	FS	t _R (min)
1	1840689	1836275	1862146	1848829	1856573	1890104	1855769	1	1,41	3,52
2	1966971	1925070	1953841	1937106	1932011	1966418	1946903	1	1,33	3,56
3	1858924	1870711	1871609	1885584	1874549	1868365	1871624	0,5	1,11	3,28
4	1963995	1897573	1939427	1957268	1993307	1997938	1958251	2	0,89	3,25
5	1378432	1416116	1367045	1398242	1403289	1400744	1393978	1	1,33	2,75
6	1422181	1445360	1440423	1414069	1438180	1403011	1427204	1	1,31	2,77
7	1400368	1413743	1412040	1417277	1407816	1419162	1411734	0,5	1,09	2,55
8	1400212	1406554	1410098	1404176	1409415	1408946	1403383	0,3	0,93	2,57

Tabla XVIII. Áreas obtenidas en los 8 experimentos (Muestra).

									C (mg/tab)	
	1	2	3	4	5	6	X promedio	CV	Obtenido	FR
1	2053339	2047223	2028704	2016939	2034309	2022785	2033883	1	145,60	97,06
2	2100990	2109806	2128335	2131450	2128794	2126811	2121031	1	144,73	96,49
3	2086714	2089191	2063120	2078402	2076612	2112807	2084474	1	147,96	98,64
4	2110714	2050320	2000855	2032561	2025424	2032490	2042061	2	138,53	92,36
5	1512266	1521073	1540250	1524139	1519357	1517765	1522475	1	145,09	96,73
6	1546028	1545535	1505252	1537053	1502729	1507238	1523972	1	141,85	94,57
7	1561991	1565414	1554818	1568209	1571126	1580442	1567000	1	147,46	98,31
8	1540640	1544838	1546687	1542260	1562838	1559660	1549487	1	146,68	97,78
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	X	144,74	96,49
	-2,39	0,56	0,71	-1,02	1,05	1,84	1,84	s	3,14	2,10
								CV	2	2

* Se pesó alrededor de 115 mg de la muestra en un balón de 50 mL y se añadió fase móvil Buffer fosfato dibásico de potasio: Acetonitrilo (45:55), se agitó en el vortex durante 5 minutos y luego se centrifugó. Del sobrenadante, se realizó una dilución de 3 en 20 mL

Al observar los resultados en la tabla XVII y XVIII, podemos notar que hay reproducibilidad en los valores de las áreas de cada experimento, y además, se obtuvieron buenos coeficientes de variación ubicados para el patrón entre 0,3 - 2 %; y para la muestra en 1 – 2 %.

2- Áreas obtenidas de las muestras sin fortificar y fortificadas

Tabla XX. Áreas de las muestras sin fortificar y fortificadas.

	Cantidad pesada de muestra \pm 0,01 mg	Sin fortificar	Fortificadas		
			80 %	100 %	120 %
80 %	116,43	616007	1642699		
	116,48	612898	1671123		
	116,94	625639	1655284		
100 %	115,48	636476		1954248	
	115,63	633057		1924372	
	115,64	632641		1942592	
120 %	114,92	624108			2697151
	114,97	616455			2693414
	115,05	612386			2647306

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Enfermedades Cardiovasculares. [Internet]. [Consultado en abril de 2013]. http://www.aefi.net/Portals/1/imagenes/fisioterapia%20y%20salud/enfermedad_cardiovascular_aef.pdf
- [2] Carlson Neil R. fundamentos de Psicología y Fisiológica. Editorial: Pearson educación. 1996
- [3] Enfermedades Cardiovasculares. [Internet]. Centro de prensa. Organización mundial de la Salud; Septiembre de 2012. [Consultado en marzo de 2013]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/index.html>
- [4] Balaguer Vitro, I. Control y prevención de las enfermedades cardiovasculares en el mundo. Barcelona. España. 2004.
- [5] Corella Dolores, Ordovás José M. Genes, Dieta y Enfermedades cardiovasculares. 2007.
- [6] Macaya Carlos M. Libro de la salud cardiovascular del Hospital Clínico San Carlos. Editorial: Fundación BBVA. 2007
- [7] Espinoza R. Salvador. Atención sanitaria inicial en situaciones de emergencia. Arán Ediciones. 2009
- [8] Marcano M, Solano L, Pontiles M. Prevalencia de hiperlipidemia e hiperglicemia en niños obesos. ¿Riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular?. Valencia. Venezuela. 2006
- [9] Lorenzo F. Pedro. Farmacología Básica y Clínica. Editorial médica Panamericana; 2008.

- [10] Fardy PS, Yanowiz FG. Rehabilitación Cardíaca. La forma física del adulto y las pruebas de esfuerzo. Editorial Paidotribo. 2003.
- [11] Gutiérrez Sotelo O, Araya G. Vivian. Manual de Arritmias Cardíacas: Guía Diagnóstica Terapéutica. Editorial Universidad de Costa Rica. 2002.
- [12] Chorro G. Francisco J. Cardiología clínica. Editorial Universitat de Valencia. 2011.
- [13] Gennaro Alfonso R. Remington Farmacia. Editorial Médica Panamericana. 2003.
- [14] Jadraque Martín. Cardiopatía isquémica: angina de pecho, infarto de miocardio. Capitel Editores. 1988.
- [15] Goodman Gilman A. Hardman Joel G. Limbird Lee E. Molinoff Perry B. Las Bases farmacológicas de la terapéutica. Editorial McGraw-Hill. Interamericana. Novena Edición.
- [16] Sourì E, Farsam H, Sadighian M. Stereospecific Determination of Propafenone by High-performance Liquid Chromatography. Theran, Iran. 1998.
- [17] Ficha técnica de Rytmonorm. [Consultado en marzo de 2013]. Disponible en:
<http://www.aemps.gob.es/cima/especialidad.do?metodo=verFichaWordPdf&codigo=55538&formato=pdf&formulario=FICHAS>
- [18] Méndez Alfonso, Del Carmen María. Desarrollo de métodos para el aislamiento y la detección de toxinas marinas en productos de la pesca y la acuicultura. Editorial: Universidad Santiago de Compostela.
- [19] Quattrocchi Oscar A, Abelaida Sara, Laba Raúl. Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. 1992.
- [20] Valcarcel C. Miguel, Gómez Hens A. Técnicas Analíticas de Separación. Editorial: Reverte. 1988.

[21] Skoog Douglas, Holler James, Nieman T. Principios de Análisis Instrumental. Editorial Mc Graw Hill. Quinta edición. Madrid. 2001.

[22] Harris Daniel. Análisis químico cuantitativo. Editorial Reverte. 2007

[23] Abburra Rogelio. Evaluación y control de los impactos generados por materiales y residuos no convencionales. 2007

[24] Lister Ashley. Validation of HPLC Methods in Pharmaceutical Analysis. 2005

[25] Farmacopea de *Estados Unidos (USP)*. <1225> *USP 35*. 2012.

[26] Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. ESTUDIOS DE PERFILES DE DISOLUCIÓN. Novena Edición.

[27] Bor Marisabel. Evaluación de perfiles de disolución de medicamentos genéricos comparados con el producto de referencia. 2008.

[28] E Adam, De Maesschalck R, De Spiegeleer B, Vnader Heyden, Smeyers-Verbeke J. Massart D. Evaluation of dissolution profiles using principal component analysis. *International Journal Pharmaceutics* 212, 41-53. 2001.

[29] Sreenivasa Rao B, Seshasayana A, Pardha Saradhi S.V, Ravi Kumar N y colaboradores. Correlación of “in vitro” release and “in vivo” absorption characteristics, of rifampicin from ethylcellulose coated nonparell beads. *International journal Pharmaceutics* 230, 1-9. 2001.

[30] Normas de la junta Revisora de Productos Farmacéuticos. [Consultado en noviembre 2013]. Página 26-27. Disponible en:

http://www.cavedro.org/wp/wp-content/uploads/2010/11/normas_junta_revisora_productos_farmaceuticos.pdf.

[31] De Sousa J, Medina O, Orozco Valero M. Disolución comparativa in vitro de diferentes aspirinas Nacionales con cubierta entérica frente a coraspirina® Magazine médico 13, 30-33.

[32] García R, Lara M, Jiménez R. Consideraciones sobre algunos métodos matemáticos empleados en la comparación de perfiles de disolución. SINTEFARMA 8 (1). [Consultado en Junio 2005]. Disponible en:

http://www.bvs.sid.cu/revistas/sint/volB_1_02/sint4102.htm

[33] Farmacopea Británica. Volumen I & II. 2012.

[34] Farmacopea de Estados Unidos (USP). USP 35. Propafenone. 2012.

[35] G.L. Hoyer. A HPLC Method for the Quantification of propafenone and 5-HydroxyPropafenone. Tucson, Arizona. USA. 1988.

[36] Juárez O Hugo, Flores Carmen, Ramírez Blanca, Sandoval Eurice, García Raquel, Flores Janett. Desarrollo y evaluación de una formulación extemporánea de propafenona para uso pediátrico. 2009.

[37] Dhandapani B. Keerthi J. Priyamvadhya D.L. Anusha BH. Babu Naik M. y colaboradores. Estimación espectrofotométrica de propafenona en droga y su formulación farmacéutica. India. 2010.