



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

**DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DISOLUCIÓN PARA
MICROESFERAS DE ESTRADIOL Y PROGESTERONA
EMPLEANDO EL APARATO IV CELDAS DE FLUJO CONTINUO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

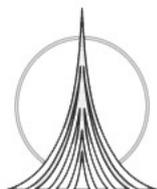
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MIRIAM TORRES FLORES

DIRECTOR: M en F. ERNESTO ORTEGA ESCAMILLA

ASESOR: M en F. JORGE A. CARLÍN HERNÁNDEZ



México D.F. 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS.

A la FES Zaragoza, porque me otorgó las herramientas para adquirir una formación profesional, por el espacio, los momentos inolvidables y porque me permitió lograr uno de mis objetivos.

Al M en F. Ernesto Ortega Escamilla por la enseñanza, paciencia, apoyo y el tiempo dedicado.

Al M en F. Jorge A. Carlín Hernández por su apoyo, colaboración e insistencia para que fuera posible completar este trabajo.

A mis sinodales: Dra. Leticia Cruz Antonio, M en C. Alma E. Ibarra Cazares y Q.F.B. Ma. Cirenía Sandoval López por su paciencia y visión académica para mejorar este trabajo.

A M en F. M Teresa Francisco Doce por haberme permitido formar parte del grupo de trabajo de biofarmacia y por su apoyo e insistencia.

A mis amigos: Marisol Alarid, Lucía Zambrano y Aurelio De Gyves por ser un apoyo incondicional, por orientar y animar en cada momento que compartimos.

A David Hernández, Noé Lino y a todo el personal de CAFET que compartieron sus conocimientos, por la ayuda brindada y su amistad.

DEDICATORIA.

A Laura mi mamá, quien con su enseñanza, esfuerzo y fortaleza hizo posible esta victoria porque me enseñó que la lucha es día a día y con quien estoy totalmente en deuda.

A Teo mi papá, por el apoyo infinito, los consejos, el amor y confianza que me ha demostrado.

A Rocy mi hermana, quien en todo momento ha estado a mi lado, porque este triunfo es tuyo también.

A mi Nvdmnp por todo lo que vivimos, el amor, las lágrimas, que fueron el impulso para concluir este trabajo; por la mejor enseñanza de vida que me hiciste sentir con lo cual finalizo esa etapa de mi vida.

CONTENIDO:

	PÁGINA
AGRADECIMIENTOS	1
1. INTRODUCCIÓN	6
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1. Conceptos básicos de disolución	7
2.1.1. Disolución	7
2.1.2. Velocidad de disolución	7
2.1.3. Perfil de disolución	7
2.1.4. Aplicación de un perfil de disolución	7
2.1.5. Especificaciones de acuerdo NOM y FDA	8
2.2. Teorías de la disolución	11
2.3. Factores que influyen en un perfil de disolución	14
2.3.1. Solubilidad del fármaco	14
2.3.2. Tamaño de partícula	15
2.3.3. Estado cristalino y forma polimórfica	15
2.3.4. Cargas electrostáticas de las partículas sólidas	16
2.3.5. Forma de disociación del fármaco	16
2.3.6. Humidificación de las partículas	16
2.3.7. Medio de disolución	16
2.3.8. pH del medio de disolución	17
2.3.9. Temperatura del medio de disolución	17
2.3.10. Agitación y velocidad de flujo	17
2.3.11. Tensión superficial del medio de disolución	18
2.3.12. Viscosidad del medio de disolución	19
2.3.13. Deaeración	19
2.3.14. Tiempos de muestreo designados para el perfil	19
2.3.15. Selección del aparato de disolución a emplear	20
2.4. Equipos empleados para la prueba de disolución	20
2.4.1. Cuadro comparativo de las ventajas, desventajas y condiciones de uso de los equipos de disolución	21
2.4.2. Componentes del aparato celdas de flujo continuo	23
2.4.2.1 Calificación del desempeño del equipo	27
2.5. Selección del medio de disolución	28
2.5.1. Características de Tween 60	29
2.6. Características fisicoquímicas de estradiol y progesterona	30
2.6.1. Características fisicoquímicas de estradiol	30
2.6.2. Características fisicoquímicas de progesterona	32
2.6.3. Uso terapéutico de esteroides	33
2.7. Formas farmacéuticas de liberación modificada	33
2.7.1. Microesfera	33
2.7.2. Preparados inyectables	33

	PÁGINA
2.8. Cuantificación del método de disolución.....	33
2.9. Métodos estadísticos para establecer la comparación de los perfiles de disolución.....	34
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
4. OBJETIVOS.....	35
4.1. Objetivo general.....	35
4.2. Objetivos particulares.....	35
5. HIPÓTESIS.....	36
6. METODOLOGÍA.....	36
7. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	37
7.1. Desarrollo del método de disolución.....	39
7.2. Procedimiento para realización del perfil de disolución.....	41
7.2.1. Adecuación del equipo de disolución.....	41
7.2.2. Preparación de las celdas para microesferas de estradiol....	42
7.2.3. Preparación de las celdas para microesferas de progesterona.....	44
7.2.4. Preparación de las celdas para microesferas de estradiol:colesterol (1:1) + progesterona.....	44
7.2.5. Cálculos para la evaluación del perfil de disolución.....	44
7.3. Métodos de cuantificación.....	46
8. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	46
8.1. Resultados y análisis de resultados del método cromatográfico utilizado para la cuantificación de estradiol y progesterona en muestras provenientes de los perfiles de disolución.....	46
8.2. Resultados tomados de evaluaciones experimentales previas al desarrollo del método de disolución acelerada que sirvieron de base para el desarrollo del método.....	58
8.2.1. Evaluación del medio de disolución y velocidad de flujo.....	58
8.3. Resultados del método de disolución acelerada.....	60
8.3.1. Evaluación de la concentración de Tween 60 en el medio de disolución.....	60
8.3.2. Evaluación de la robustez del método a cambios en la concentración de Tween 60.....	61
8.3.3. Selección de los tiempos de muestreo.....	63
8.3.4. Evaluación del efecto de la forma farmacéutica de microesferas en la disolución.....	65
8.3.5. Evaluación de la reproducibilidad intraequipo.....	66
8.3.6. Evaluación de la reproducibilidad interequipo.....	70

	PÁGINA
8.3.7. Evaluación de la variación de la cantidad de muestra depositada en la celda tanto en microesferas de estradiol como microesferas de progesterona.....	71
8.3.7.1. Evaluación del efecto de la cantidad de muestra para microesferas de estradiol: colesterol (1:1)....	72
8.3.7.2. Evaluación del efecto de la cantidad de muestra microesferas de progesterona.....	73
8.3.8. Evaluación de la capacidad discriminativa del método de disolución en microesferas de estradiol: colesterol (1:1).....	76
8.3.9. Evaluación de estradiol en la mezcla de microesferas de estradiol: colesterol (1:1)+progesterona dosis (1:30) con el método de disolución propuesto.....	78
8.3.10. Evaluación de progesterona en la mezcla de microesferas de estradiol: colesterol (1:1)+progesterona dosis (1:30) con el método de disolución propuesto.....	80
9. CONCLUSIONES	83
10. SUGERENCIAS	83
11. BIBLIOGRAFÍAS	85

INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha habido un creciente interés por desarrollar tecnología para lograr formas farmacéuticas que permitan la liberación de fármacos en un plazo más largo, dentro de estas se encuentran las formas farmacéuticas de liberación modificada; especialmente para fármacos que se requiere administrar en bajas dosis y en terapias prolongadas; además de tener como característica fisicoquímica baja solubilidad en medios acuosos. Ejemplos de aplicaciones de liberación modificada son los anticonceptivos, anticancerígenos y antidepresivos entre otros. Entre las tecnologías más novedosas se encuentran los parches, los implantes, microcápsulas, nanocápsulas y las microesferas de liberación modificada.

Dentro de los fármacos más estudiados por su aplicabilidad en sistemas de liberación modificada, son las hormonas naturales como la progesterona y estradiol; ampliamente empleadas, solas como combinadas en anticonceptivos, promotores del crecimiento y en los últimos años en esquemas de terapia de reemplazo hormonal.

Durante el proceso de fabricación de microesferas de liberación modificada existe la necesidad de verificar la velocidad de liberación de los fármacos ya que algún cambio en el proceso de fabricación podría modificar la velocidad de liberación; por tal motivo la forma de evaluar este proceso es realizando perfiles de disolución; sin embargo por la forma de liberación la realización de un perfil puede tardar días o semanas en obtener resultados; por lo tanto existe la necesidad de desarrollar un método de disolución acelerado *in vitro* para microesferas, que permita obtener resultados oportunos, confiables, reproducibles, que sirva como método de control de calidad y que cumpla con los criterios que se especifican en documentos compéndiales; el presente trabajo tuvo la finalidad de desarrollar un método de disolución para caracterizar estradiol y progesterona en microesferas de liberación modificada, empleado el aparato IV celdas de flujo continuo que permitiera la liberación del 80% de los activos en 24 horas y como consecuencia la validación del método de cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución para evaluar la cantidad de principio activo disuelto por intervalo de tiempo en las muestras que provenían del método de disolución acelerado.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Conceptos básicos de disolución.

2.1.1 Disolución.

Es una prueba fisicoquímica por la cual un sólido entra en solución (acto de disolver). La disolución puede considerarse como un tipo específico de cierta reacción heterogénea en la cual la transferencia de masa es el resultado de un efecto neto, entre el paso de moléculas del sólido hacia la solución y la desagregación de moléculas de las partículas sólidas.

La prueba de disolución farmacopéica es una prueba límite que únicamente evalúan la cantidad de principio activo disuelto en un tiempo determinado y el criterio de aceptación, es útil para el control de calidad de medicamentos, pero no proporcionan información de la velocidad ni de la cinética que sigue el fármaco cuando se disuelve. Dicha prueba determina la cantidad acumulativa del fármaco que entra en solución en función del tiempo. (1, 2 y 3)

2.1.2 Velocidad de disolución.

La velocidad con que se disuelve el medicamento en forma intacta “la forma de dosificación” en fragmentos o partículas. La velocidad de disolución puede definirse como la cantidad de fármaco que pasa del estado sólido a la solución por unidad de tiempo bajo condiciones controladas de interfase líquido sólido, temperatura y composición del medio.

De acuerdo a los factores tanto de liberación del principio activo y de la disolución o solubilización en las condiciones fisiológicas; la evaluación de la velocidad de disolución *in vitro* puede ser una predicción del comportamiento *in vivo*, siempre y cuando el paso limitante sea la disolución. (1, 4 y 5)

2.1.3 Perfil de disolución.

Determinación experimental de la cantidad de fármaco disuelto a diferentes tiempos, en condiciones experimentales controladas, a partir de la forma farmacéutica. Un perfil de disolución considera diversos tiempos de muestreo, lo que permite establecer la velocidad de disolución. (2 y 5)

2.1.4 Aplicación de un perfil de disolución.

Se han utilizado especificaciones y pruebas de disolución de punto único para evaluar los escalamientos de lotes y cambios posteriores a la aprobación, tales como aumento en la escala de producción, cambios en el lugar de fabricación, en componentes y composición; además de cambios en equipos y procesos; sin embargo para cambios más importantes, se recomienda una comparación de perfiles de disolución realizada bajo condiciones idénticas para el producto antes y

después del (de los) cambio(s). Los perfiles de disolución pueden considerarse similares en razón de 1) similitud global de los perfiles y 2) similitud en cada punto de tiempo de disolución de la muestra. (6)

2.1.5 Especificaciones de acuerdo a NOM y FDA

Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable requisitos que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.

El estudio de disolución o el estudio de bioequivalencia del medicamento de prueba se debe realizar con un lote estándar de producción o bien un lote escalado, que asegure que no se modifica significativamente la reproducibilidad de los perfiles de disolución, cuando lotes subsecuentes del medicamento se elaboren de acuerdo a la NOM-059-SSA1-1993, y que cuente con un certificado de aprobación conforme a la FEUM (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos) vigente. Cuando en ésta no aparezca la información, puede recurrirse a farmacopeas de otros países cuyos procedimientos de análisis se realicen conforme a especificaciones de organismos especializados u otra bibliografía científica reconocida internacionalmente.

Además de la comparación de los perfiles de disolución, se deben realizar pruebas de valoración y uniformidad de dosis expresada como uniformidad de contenido. (2 y 5)

Criterios y requisitos para la evaluación de los perfiles de disolución en formas farmacéuticas orales de liberación inmediata aplicables a liberación prolongada.

El equipo de disolución utilizado debe cumplir con las dimensiones y especificaciones descritas en el método general de análisis United States Pharmacopeia/ National Formulary (USP/NF) <<711>>, así como con la normatividad aplicable, la verificación y calificación del equipo.

Realizar los perfiles de disolución con 12 unidades, tanto del medicamento de prueba como del de referencia, en las mismas condiciones.

El método de evaluación de los perfiles de disolución se debe registrar por escrito antes de realizar el estudio, incluyendo las condiciones experimentales como medio de disolución, aparato utilizado, velocidad de agitación, método de análisis, tiempo de muestreo, forma de muestreo y fórmula de cálculo.

Para realizar el perfil de disolución, deben seleccionarse por lo menos cinco tiempos de muestreo (excepto el tiempo cero) que permita caracterizar apropiadamente la curva ascendente y la fase de meseta. Durante la realización del perfil de disolución, los muestreos deben realizarse, dentro de los tiempos establecidos en el método de evaluación con una variación que no afecte los

resultados de la prueba. Utilizar una curva de calibración de la sustancia de referencia para calcular por interpolación la concentración del fármaco disuelto. El volumen extraído puede o no reemplazarse. Cuando no se reemplace el volumen, no se debe extraer más del 10% del medio de disolución. En cualquier caso, para el cálculo del porcentaje disuelto se debe considerar el volumen de la alícuota y la cantidad extraída en cada muestreo. (2, 5, y 6)

Evaluación de los perfiles de disolución.

El porcentaje disuelto debe calcularse con respecto a la dosis nominal del fármaco.

Se deben reportar los porcentajes disueltos a cada tiempo de muestreo en cada unidad de dosificación contra el tiempo.

Se deben graficar los porcentajes disueltos promedio y los de cada unidad de dosificación contra el tiempo.

Si el coeficiente de variación del porcentaje disuelto es menor o igual que el 20% para el primer tiempo de muestreo y menor o igual que el 10% para los tiempos subsecuentes, se compararán los perfiles de disolución usando el factor de similitud (f) definido en la siguiente ecuación:

$$f = 50 \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (R_i - P_i)^2 \right]^{-0.5} \right\} * 100$$

n= Número de tiempos de muestreo

R_t= Porcentaje disuelto promedio en el tiempo t del medicamento de referencia.

P_t= Porcentaje disuelto promedio en el tiempo t del medicamento de prueba.

Un factor de similitud entre 50 y 100 indica perfiles de disolución similares.

Si el coeficiente de variación del porcentaje disuelto del medicamento de referencia es mayor a 20% para el primer tiempo de muestreo y mayor a 10% para los tiempos subsecuentes; utilizar una prueba estadística científicamente sustentable. (2 y 5)

En casos donde el coeficiente de variación sea más del 15% es conveniente un método modelo independiente multivariado para la comparación de los perfiles de disolución; el cual está basado en las distancias de Mahalanobis que toma en cuenta la correlación existente entre las variables en estudio para determinar la distancia y la distancia en desviaciones estándar. (6)

Se han descrito varios modelos matemáticos analizados bajo modelo dependiente, para hacer la comparación de los perfiles de disolución evaluados antes de los cambios y posterior a los cambios aprobados. (6)

Guía de la FDA relacionada con la disolución.

La FDA (Food and drug Administration) ha desarrollado guías relacionadas con la disolución debido a que provee información y recomendaciones sobre la metodología de desarrollo, especificaciones del escenario y las aplicaciones regulatorias de la prueba de disolución. En adición, ésta provee información con respecto a los casos en que un único punto de prueba de disolución es adecuado como una prueba de control de calidad o cuando dos puntos o un perfil de disolución es necesario caracterizar en un producto farmacéutico. (7)

Especificaciones de las pruebas de disolución de acuerdo a la FDA:

Las especificaciones de disolución *in vitro* generalmente están basadas en la fabricación de lotes clínicos y/o biolotes.

En este apartado, la prueba de disolución *in vitro* llega a ser una medición predictiva del desempeño *in vivo* de la formulación; además las especificaciones de disolución pueden ser usadas para minimizar la posibilidad de liberación de lotes que puedan ser diferentes con respecto al desempeño *in vivo*. (2, 6 y 7)

Especificaciones de disolución cuando no existen datos evaluados *in vivo* para establecer una correlación *in vitro in vivo*.

El intervalo para especificación en cualquier tiempo de muestreo en una especificación es $\pm 10\%$ de desviación del valor promedio a partir de resultados de perfiles de disolución obtenidos de biolotes.

Para ciertos casos donde, desviaciones razonables mayores a 10% del intervalo pueden ser aceptadas, originan que el intervalo en algún tiempo de muestreo no exceda el 25% de desviación. Especificaciones mayores al 25% pueden ser justificadas basadas en la evidencia de que la medida del perfil de disolución entre lotes (lote por lote) por abajo y arriba del límite son bioequivalentes.

Como mínimo se usan tres tiempos de muestreo. Estos tiempos de muestreo pueden cubrir el estado inicial, medio y alto del perfil de disolución. El último tiempo de muestreo debe ser el tiempo en el cuál al menos el 80% del fármaco se ha disuelto.

Si la máxima cantidad de fármaco disuelto es menor del 80%, el último tiempo de muestreo debe ser el tiempo en el cual se ha alcanzado la meseta del perfil de disolución. (7)

2.2 Teorías de la disolución

Modelo de la capa de difusión.

En términos sencillos, el proceso de disolución ocurre en dos etapas. La primera etapa consiste en la solución del sólido en la interfase y segundo la difusión de sólido disuelto hacia el seno del medio de disolución. La primera etapa es muy rápida y conduce a la formación de una capa saturada que se puede suponer que es estacionaria. La segunda etapa: la difusión es más lenta y por lo tanto es el paso limitante de la velocidad de disolución.

Los pasos que limitan la disolución dentro de los que destacan la primera ley de Fick del estado de difusión que define la cantidad de fármaco que pasa perpendicularmente por unidad de tiempo a través de una unidad de superficie de área. La primera ley de Fick considera como condición la difusión en estado estacionario; de manera que al cambiar la concentración del fármaco respecto al tiempo se puede derivar la ecuación de la segunda ley de difusión de Fick. La segunda ley de Fick explica que una unidad de área es atravesada y esta es la región de longitud dx donde se asume que se extiende desde x hasta $x + dx$. El incremento en la concentración por unidad de tiempo dentro de esta unidad de área, es el exceso de fármaco difundido desde el interior del medio hasta el exterior por difusión dividido entre el volumen. (4)

En términos generales Noeyes y Whitney desarrollaron una relación matemática basada en la segunda Ley de Fick para describir el fenómeno de disolución, el cual dice que la rapidez con la que un sólido se disuelve es proporcional a la diferencia entre la concentración requerida para la saturación del medio en que se está disolviendo el sólido y la concentración del sólido disuelto el cual se describe como:

$$\frac{dc}{dt} = K(c_s - c_t) \quad (1)$$

Donde $\frac{dc}{dt}$ es la velocidad de disolución del fármaco. K es la constante de disolución, c_s es la concentración de saturación o máxima solubilidad, c_t es la concentración en tiempo t y $c_s - c_t$ es el gradiente de concentración.

Posteriormente Burnner y Tolloczko modificaron la ecuación anterior con objeto de considerar el área de exposición del sólido o área superficial S . Así la ecuación se transformó en:

$$\frac{dc}{dt} = k_1 S (c_s - c_t) \quad (2)$$

En 1904 Nernst propuso la teoría del modelo de película para poder explicar el mecanismo de la disolución. Bajo la influencia de fuerzas no reactivas o químicas una partícula sólida sumergida en un líquido es sometida a dos pasos consecutivos: primer paso, la disolución, que es casi instantáneo; el segundo la

difusión, que es mucho más lento y por lo tanto es el paso limitante de la velocidad.

Burnner investigó el área de superficie, que afectan el proceso de disolución para poder determinar los componentes fundamentales de la constante de proporcionalidad. Por medio de la primera ley de difusión de Fick propuesta en la teoría de la película de Nernst, Burnner amplió la ecuación (2) para incluir el coeficiente de absorción D , el espesor de la capa de difusión estática, h y el volumen del medio de disolución, v , llegando a

$$\frac{dc}{dt} = k_2 \cdot DS/vh(c_s - c_t) \quad (3)$$

La constante de proporcionalidad k_2 se conoce como la constante de la velocidad de disolución intrínseca y es característica de cada compuesto químico. (4)

La definición de condiciones *sink* se originaron en un hecho largamente conocido por los farmacólogos en cuanto a que la concentración de un fármaco a ambos lados de la capa epitelial de la pared intestinal se aproxima al equilibrio en un breve lapso y que el tracto gastrointestinal actúa como un filtro natural; es decir, el fármaco es absorbido en forma instantánea en el momento en que se disuelve (no hay saturación). Por lo tanto en condiciones *in vivo* no hay desarrollo de una concentración y por consiguiente no se produce el efecto retardado del gradiente de concentración sobre la disolución. Para simular las condiciones de no saturación *in vivo*, las pruebas de disolución *in vitro* en general se llevan a cabo por medio del empleo de un gran volumen de medio de disolución que es repuesto en forma constante con solvente fresco a una velocidad específica, de modo que la concentración del soluto nunca llega a más del 10 al 15% de su solubilidad máxima. Si se mantiene este parámetro, se dice que la prueba de disolución está siendo realizada en condiciones de no saturación.

Esto puede verse en el siguiente tratamiento matemático.

Suponiendo que $c_s \gg c_t$, de la ecuación (3) se convierte en

$$\frac{dc}{dt} = k_2 \frac{DS}{vh} C_s \quad (4)$$

Dado que c_s y D son constantes para cada sustancia química especificada, podrían ser incorporadas en k_2 y aparecer en ecuación (5) como k_3 :

$$\frac{dc}{dt} = k_3 \frac{S}{vh} \quad (5)$$

Si el volumen del medio de disolución y el área de superficie se mantienen constantes durante toda la prueba de disolución, entonces:

$$\frac{dc}{dt} = k \quad (6)$$

La ecuación 6 predice una velocidad de disolución constante en condición de filtración y representa un proceso cinético de orden cero. Es decir la concentración del fármaco aumenta linealmente con el tiempo. También se cree que la ecuación 6 se aproxima a la condición *in vivo*. Para el caso donde la solubilidad de fármacos es baja, la disolución de las partículas del fármaco desempeña un papel fundamental en la determinación de la biodisponibilidad. Usualmente para cumplir este supuesto se emplea gran volumen como medio de disolución o reemplazamiento del medio de disolución constantemente con solvente fresco a una velocidad específica. (4)

Ley de Hixon y Crowell

En la ecuación 2 el área de superficie se consideraba constante durante toda la prueba de disolución. La velocidad de disolución intrínseca no podría mantenerse igual para un cristal en disolución o un preparado sólido común, en cuyo caso la desintegración completa es una prioridad. Por lo tanto, para desarrollar una ecuación de disolución sobre la base de un área de superficie cambiante. Hixon y Crowell modificaron la ecuación 2 para representar la velocidad de aparición del soluto en la solución por medio de la multiplicación de cada lado de la ecuación por v (volumen) dejando $k_1v = k$

$$\frac{dW}{dt} = KS(c_s - c_t) \quad (7)$$

Donde W es el peso del soluto en solución.

También consideraron que $S = kw^{2/3}$, donde k es una constante que contiene el factor de forma y la densidad de la partícula y w es el peso de las partículas no disueltas a tiempo t .

$$\frac{dW}{dt} = K(kw^{2/3})(c_s - c_t) \quad (8)$$

Después de tratamientos, matemáticos que involucran la ecuación de la primera ley de Fick y la integración bajo la ecuación de que w es igual a w_0 , el peso inicial de la partícula a tiempo cero, la ecuación 9 resulta

$$w_0^{1/3} - w^{1/3} = K_1t \quad (9)$$

La ecuación 9 se denomina ley de la raíz cúbica de Hixson y Crowell para la disolución. (4 y 8)

Wagner y su modelo de disolución.

Para determinar la velocidad de disolución de formas farmacéuticas sólidos en condiciones estandarizadas, deben considerarse varios procesos fisicoquímicos. Éstos incluyen características de humidificación de las formas farmacéuticas sólidas, la capacidad de penetración del medio de disolución en los preparados, el

proceso de hinchamiento, la desintegración y la desagregación. Wagner propuso el esquema presentado en la figura 1; para los procesos involucrados en la disolución de formas farmacéuticas sólidas. (4 y 9)

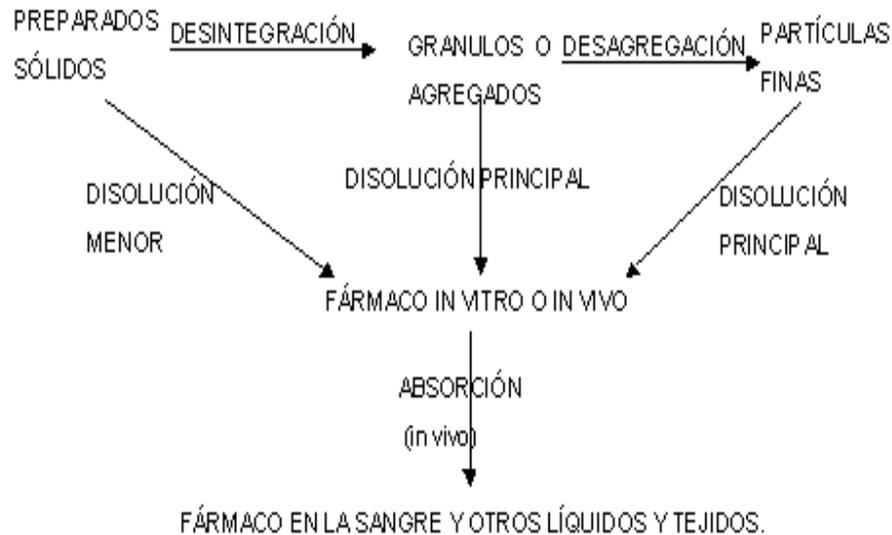


Figura No. 1: Diagrama esquemático de Wagner que ilustra los procesos involucrados en la disolución de formas farmacéuticas sólidas.

2.3 Factores que influyen en un perfil de disolución

Existen diversos factores que influyen en la prueba de disolución. De manera general dichos factores se pueden clasificar como sigue:

- ❖ Los factores inherentes al fármaco y/o producto cuya disolución se quiere evaluar.
- ❖ Los factores inherentes al medio y a la prueba de disolución.

Factores inherentes al fármaco y/o producto cuya disolución se quiere evaluar.

2.3.1 Solubilidad del fármaco.

Tal como indica la ecuación de Noyes Whitney modificada (ecuación 1) la solubilidad acuosa del fármaco es el principal factor que determina la velocidad de disolución; ya que cuando la velocidad de disolución es menor que la velocidad de absorción, el proceso de disolución llega a ser el paso limitante. (4, 8 y 10)

2.3.2 Tamaño de partícula.

De acuerdo a la teoría de Noyes-Whitney la velocidad de disolución es directamente proporcional a la superficie de las partículas que se pone en contacto con el medio de disolución e inversamente proporcional al tamaño de dichas partículas. De aquí que la disminución del tamaño de partícula puede incrementar la velocidad de disolución mediante un aumento de la superficie de contacto con el medio. (18)

La micronización de polvos hidrofóbicos pueden originar en algunos casos una agregación y flotación al dispersarse los polvos en el medio de disolución; de manera que el incremento en el área superficial de un fármaco no siempre es garantía de un incremento equivalente en la velocidad de disolución; ya que hay fármacos con superficies hidrofóbicas, los cuales tienden a adsorber aire en la superficie e inhibir su humectabilidad. (4)

2.3.3 Estado cristalino y forma polimórfica.

Los sólidos pueden encontrarse como cristal los cuales son átomos, moléculas o iones que son acomodadas en repetidas unidades de red en tres dimensiones los cuales tienen puntos de fusión definidos.

Algunos fármacos pueden existir en más de una forma cristalina y éstos son llamados polimorfos los cuales tienen diferentes propiedades físicas incluyendo diferentes puntos de fusión y solubilidades. Un polimorfo puede cambiar su sistema cristalino y éste es reversible a diferencia de los amorfos que son moléculas no acomodadas lo que resulta en materiales no cristalinos que no tienen puntos de fusión definidos.

Se ha observado que por lo general la forma anhidra del fármaco disuelve mejor que una forma cristalina hidratada.

Aunque tienen la misma estructura química, las diferentes formas polimórficas, poseen diferentes propiedades físicas entre ellas la solubilidad y por ende la velocidad de disolución.

Muchos fármacos presentan formas polimórficas metaestables, pseudo estables y que con una alteración de sus propiedades, se convertirá en la forma más estable. La solubilidad de una forma metaestable es siempre mayor que la de la forma estable. Por lo tanto al trabajar con una forma polimórfica metaestable se debe considerar esta propiedad con objeto de evitar variaciones en la disolución que puedan impactar en la reproducibilidad de la prueba.

Los fármacos cristalinos tienden a disolver más lentamente en agua que la forma amorfa, debido a que se requiere mayor energía para romper el estado cristalino. Los corticosteroides, esteroides y muchos otros fármacos pueden sufrir cambios

en la estructura cristalina estando en una suspensión o una solución saturada (polimorfismo). (11 y 12)

2.3.4 Cargas electrostáticas de las partículas sólidas.

Existen algunos fármacos que por sus características intrínsecas tienden a generar cargas electrostáticas que provocan la formación de aglomerados de partículas que impiden que éstas se comporten como partículas individuales afectando importantemente el área superficial. En estos casos es necesario utilizar un agente tensoactivo que permita la disipación de las cargas y por consecuencia la individualización de las partículas. (1)

2.3.5 Forma de disociación del fármaco.

Como las sales forman electrolitos débiles que son más solubles en agua que sus ácidos o bases débiles, la disolución de fármacos y la absorción ocurre más fácilmente con la forma salina. En algunos casos, la concentración contenida en el medio, como una medida de la fuerza iónica, afecta la velocidad de disolución de la forma salina del fármaco. La disminución del rango iónico resulta en un aumento en la velocidad de disolución del fármaco. Es importante notar que la velocidad de disolución aumenta conforme incrementa la ionización y la absorción del fármaco es más eficiente cuando un fármaco se encuentra en estado no ionizado. (11)

Factores inherentes al medio de disolución y a la prueba.

2.3.6 Humidificación de las partículas.

La humidificación de la superficie de formulaciones sólidas controla el acceso de líquido hacia la superficie del sólido y muchas veces es el factor limitante en el proceso de disolución. La velocidad de humidificación depende directamente de la tensión superficial en la interfase y el ángulo de contacto entre la superficie del sólido y el líquido. (10)

Idealmente la prueba de disolución debe ser llevada a cabo semejando hasta donde sea posible las condiciones fisiológicas, buscando que la interpretación de los datos de disolución se hagan en comparación al desempeño *in vivo* del producto. Las condiciones de la prueba deben estar basadas en las características fisicoquímicas de la sustancia farmacéutica y las condiciones del medio a las cuales la forma de dosificación es expuesta. (13)

2.3.7 Medio de disolución.

La selección del medio de disolución apropiado para pruebas de disolución depende ampliamente de las propiedades fisicoquímicas del fármaco de la forma farmacéutica; así como la selección del medio más cercano a las condiciones fisiológicas, prácticas y económicas.

Dentro de la amplia gama de posibilidades se encuentran los tensoactivos, amortiguadores, enzimas e incluso de solventes orgánicos siempre y cuando sea justificado.

Una consideración importante es la concentración del medio de disolución a emplear ya que tiene influencia en algunos casos con la estabilidad del fármaco en el medio de disolución. (4 y 8)

2.3.8 pH del medio de disolución.

Una variable importante que afecta la disolución es la diferencia de pH, ya que el fármaco debe ser soluble y estable en solución; lo cual depende del valor de pH. Cuando se ajusta la composición del medio para generar las condiciones *sink*, la influencia del tensoactivo, valor de pH y amortiguador deben ser evaluados.

La medición del pH es importante ya que puede variar de un día a otro y puede cambiar durante el desarrollo de la prueba dependiendo del principio activo y excipientes. Las características para una formulación son evaluadas generalmente sobre el rango de pH fisiológico de 1.2 a 6.8 (1.2 a 7.5 para formulaciones de liberación modificada). (6, 9, 14)

2.3.9 Temperatura del medio de disolución.

Dado que la solubilidad del fármaco depende de la temperatura, su control durante el proceso de disolución es muy importante y debe mantenerse dentro de un espectro de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$. En general, para la mayoría de las formas de dosificación, siempre se mantiene una temperatura de 37°C durante la determinación de disolución; sin embargo para el caso de parches transdérmicos, ungüentos o pomadas la temperatura de prueba es de 32°C y para supositorios una temperatura de 38°C . El efecto de las variaciones de la temperatura del medio de disolución depende principalmente de las curvas de temperatura / solubilidad del fármaco y los excipientes en el preparado. Para una molécula disuelta, el coeficiente de difusión, D , depende de la temperatura T de acuerdo con la ecuación de Stokes, ecuación 10

$$D = k T / (6 \pi \eta r) \quad (10)$$

Donde k es la constante de Boltzmann y $6\pi\eta r$ es la fuerza de Stokes para una molécula esférica (η es la viscosidad en unidades cps y r es el radio de la molécula). (9 y 15)

2.3.10 Agitación y velocidad de flujo.

La relación entre la intensidad de la agitación y la velocidad de disolución varía en forma considerable con el tipo de agitación usado, el grado de flujo laminar o turbulento en el sistema, la forma y el diseño del agitador, así como las propiedades fisicoquímicas del sólido. Cuando se usa un dispositivo agitador como

la canasta, una paleta, un filtro giratorio, etcétera, la velocidad de agitación genera un flujo que continuamente modifica la interfase líquido-sólido entre el disolvente y el fármaco en una forma similar a la velocidad de flujo en el aparato de disolución de celdas de flujo continuo. Los estudios del efecto de la agitación sobre la velocidad de reacciones heterogéneas llevaron a la relación empírica entre la velocidad de disolución y la intensidad de agitación, ecuación 11

$$K = a (N)^b \quad (11)$$

Donde N es la velocidad de agitación, K es la velocidad de disolución, a y b son constantes. Si el proceso de disolución es controlado por difusión, el valor de b debe ser de 1 o cercano a 1 de acuerdo con la teoría de la película de Nernst-Brunner, que dice que el espesor de la película es inversamente proporcional a la velocidad de agitación. Sin embargo, si el proceso de disolución es controlado puramente por una reacción de interfase, la velocidad de agitación no tendría ninguna influencia sobre la disolución y b debe aproximarse a cero.

Otro factor que afecta la correlación entre la agitación y la velocidad de disolución incluye la densidad de la fase sólida, el tamaño y las características del sólido, el agitador, el recipiente de disolución y el calor de la solución del soluto.

Cuando se emplea el aparato IV celdas de flujo continuo aplicado a polvos, la velocidad de flujo representa la agitación hidrodinámica del medio de disolución en los polvos. La velocidad de flujo modifica el grado de interfase entre el sólido / líquido. Por lo tanto el incremento en la velocidad de flujo incrementa la velocidad de disolución del polvo. De acuerdo al tamaño de partícula y a la forma del polvo, la velocidad de flujo puede estar entre 5 y 50 mL/min en ese orden logrando la optimización hasta obtener la mejor reproducibilidad.

Existen elementos adicionados en el equipo celdas de flujo continuo que permiten producir las condiciones de un flujo laminar, tales elementos son las perlas de vidrio de 1mm de diámetro con una densidad límite de 1.52g/mL; las cuales se depositan en la sección cónica de la celda.

El efecto del flujo del medio en la velocidad de disolución ha sido bien establecido. Para muestras colocadas en la celda de flujo, la velocidad lineal del medio es particularmente importante. La velocidad lineal del medio está relacionada con la velocidad volumétrica a través del área de la sección transversal. (9, 16 y 17)

2.3.11 Tensión superficial del medio de disolución

Se ha demostrado que la tensión superficial tiene un efecto significativo sobre la velocidad de disolución de los fármacos y en la velocidad de liberación de los preparados sólidos. Las sustancias tensoactivas y los agentes humectantes reducen el ángulo de contacto y por lo tanto mejoran el proceso de penetración en la partícula por el medio de disolución.

Existe un incremento significativo en la velocidad de disolución de fármacos escasamente solubles cuando se agregaron sustancias tensoactivas al medio de disolución, incluso con un nivel por debajo de la concentración crítica micelar, probablemente por la reducción de la tensión interfacial. (9 y 16)

2.3.12 Viscosidad del medio de disolución

En caso de procesos de disolución controlados por difusión es de esperar que la velocidad de disolución disminuya con el aumento de la viscosidad. Sin embargo, para el caso de procesos de disolución controlados a nivel de la interfase la viscosidad debe tener poco efecto. La viscosidad de suspensiones puede afectar la disolución de fármacos ya que el coeficiente de difusión disminuye conforme incrementa la viscosidad. (9 y 11)

2.3.13 Deaereación.

El nivel de oxígeno disuelto y otros gases está relacionado con la presencia de burbujas. El aire disuelto puede retrasar la disolución por la creación de una barrera; tanto si se adhiere a la superficie de la partícula en proceso de disolución o en la superficie del área en la cual se introduce la muestra para disolución (pared de vaso, cilindro o celda). Por otro lado, las burbujas en la unidad de dosis pueden incrementar la velocidad de disolución, o disminuir la velocidad de disolución por disminución de la capacidad de superficie efectiva. El método de deaereación debe ser caracterizado claramente, a partir de los cambios que pueden impactar la disolución en la velocidad de liberación, dicho impacto puede ser evaluado con una prueba de disolución empleando el método celdas de flujo continuo, que puede ser particularmente sensible a la deaereación del medio. (13 y 15)

2.3.14 Tiempos de muestreo designados para el perfil.

Para formas de dosificación de liberación modificada, un mínimo de 3 tiempos de muestreo son seleccionados para caracterizar el perfil de liberación del fármaco *in vitro* para control de calidad de rutina entre lote y lote en productos aprobados. Tiempos adicionales de muestreo pueden ser requeridos para el estudio de formulaciones en desarrollo, evaluaciones biofarmacéuticas y para propósitos de aprobación de un medicamento. Un primer tiempo de muestreo, normalmente 1 o 2 horas, se selecciona para explicar que es poca la cantidad que se libera por dosis. La liberación en este tiempo de muestreo no debe exceder valores esperados de acuerdo al mecanismo de liberación y al perfil de liberación total planeado. Un tiempo de muestreo intermedio es elegido para definir el perfil de liberación *in vitro* de la forma de dosificación y un tiempo de muestreo al final es designado para explicar esencialmente la liberación completa del fármaco. (14 y 15)

De acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998, para realizar perfiles de disolución en formas farmacéuticas orales de liberación inmediata, deben seleccionarse por lo menos cinco tiempos de muestreo (excepto el tiempo cero) que permitan caracterizar apropiadamente la curva ascendente y la fase de meseta. Únicamente

dos puntos estarán en la meseta de la curva y los otros tres distribuidos entre la fase ascendente y de inflexión y los tiempos de muestreo deben estar lo suficientemente espaciados a lo largo del perfil de disolución. ⁽²⁾

2.3.15 Selección del aparato de disolución a emplear.

Las características principales para la selección de un aparato de disolución son:

1. La fabricación, dimensiones y posición de todos los componentes deben ser precisamente especificados y reproducibles corrida tras corrida.
2. El aparato debe ser de diseño simple, fácil de operar y usado bajo una variedad de condiciones.
3. El aparato debe ser suficientemente sensible para revelar cambios en el proceso de fabricación y diferenciar entre formulaciones pero mantener resultados repetibles bajo las mismas condiciones.
4. El aparato, en la mayoría de los casos debe permitir controlar variables de intensidad como suave, uniforme, agitación de líquido no turbulento.
5. Debe mantener casi las condiciones sink perfectas.
6. Debe proveer una introducción fácil de la forma farmacéutica al interior del medio de disolución.
7. El aparato debe proveer la mínima abrasión mecánica a la forma farmacéutica durante su empleo.

La selección del aparato de disolución debe ser considerada durante el desarrollo del método de disolución; ya que esto puede modificar los resultados y la duración de la prueba. El tipo y forma de dosificación que se está investigando debe considerarse en primera instancia para la selección del aparato. ^(8 y 15)

2.4 Equipos empleados para pruebas de disolución.

La USP 30 NF25 reorganiza específicamente siete aparatos de disolución, donde describe estos y en algunos casos modificaciones pertinentes. La USP incluye aparato 1 (canastillas), aparato 2 (paletas), aparato 3 (cilindro reciprocante), 4 (celdas de flujo continuo), 5 (paletas sobre disco), 6 (método de cilindro), 7 (disco reciprocante). En la tabla No. 1 se describen los aparatos empleados de acuerdo al método de liberación de la forma farmacéutica. ⁽¹⁵⁾

Tabla No. 1. Aparatos recomendados basados en la forma farmacéutica.

FORMA FARMACÉUTICA.	MÉTODO DE LIBERACIÓN.
Formas de dosificación de liberación oral (forma convencional).	Canastillas, paletas, cilindro recíprocante y celdas de flujo continuo.
Suspensión oral.	Paletas.
Tabletas de desintegración oral.	Paletas.
Tabletas masticables.	Canastillas, paletas, cilindro recíprocante con perlas de vidrio.
Parches transdérmicos.	Paletas sobre disco.
Tópicos semisólidos.	Sistema de difusión con celdas de Franz.
Supositorios.	Paletas, canastilla modificada o cámara dual en celdas de flujo continuo.
Goma masticable.	Aparatos especiales [Farmacopea Europea (Ph. Eur)]
Polvos y granulados.	Celda de flujo continuo (para muestra de polvos / granulados en celda).
Formulación de micropartículas.	Celdas de flujo continuo modificadas.
Implantes.	Celdas de flujo continuo modificadas.

2.4.1 Cuadro comparativo de las ventajas, desventajas y condiciones de uso de los equipos de disolución.

TABLA No. 2. Comparación de los equipos de disolución descritos en la USP.

APARATO	VENTAJAS Y DESVENTAJAS	CONDICIONES DE USO	USO
1 (CANASTILLAS)	Es el aparato más ampliamente usado, está estandarizado, utiliza volumen de medio relativamente pequeño y el tipo de muestreo puede ser con o sin reemplazo. No es útil para evaluar polvos. ⁽¹¹⁾	1) Seis vasos cilíndricos con tapa de vidrio o de otro material inerte y transparente y cada vaso consta de, 2) un eje transmisor debe ser de acero inoxidable tipo 316 y girar suavemente sin bambolear, 3) un regulador de velocidad de rotación y 4) una canastilla. Mantener una temperatura del medio de disolución a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$. 50 a 100 revoluciones por minuto. ⁽¹⁵⁾	Cápsulas, supositorios y tabletas que tienen baja densidad y tienden a flotar en el medio de disolución o disolver muy lentamente. ⁽¹⁵⁾

APARATO	VENTAJAS Y DESVENTAJAS	CONDICIONES DE USO	USO
2 (PALETAS)	Es ampliamente usado. Es sencillo de usar, robusto y estandarizado. Pueden utilizar sinkers los cuales permiten que la muestra no flote. No aplica para parches transdérmicos y polvos. El bamboleo del eje y la deformidad de las paletas pueden originar resultados erróneos durante el desarrollo de la prueba. (15)	Consta de seis unidades de prueba, donde cada una está constituida por: 1) un vaso cilíndrico con tapa, 2) un eje transmisor, 3) un regulador de velocidad de rotación y 4) una hélice. La paleta y el eje son de Teflón u otro material. La velocidad de trabajo va de alrededor de 50 rpm a 75 rpm para tabletas y 25 rpm para suspensiones. (5)	Cápsulas, tabletas no recubiertas y recubiertas, así como en grageas. (15)
3 (CILINDRO RECIPROCANTE U OSCILANTE)	Basado en la pruebas de desintegración. Usado en casos donde uno o más cambios de pH / amortiguador se requieren durante el desarrollo de la prueba. Simula los cambios en cuanto a las condiciones fisicoquímicas y fuerzas mecánicas experimentadas por los productos farmacéuticos en la boca o en ciertas localizaciones del tracto gastrointestinal, tal como el píloro. (5 y 15)	Compuesto por siete columnas de seis filas, cada fila consiste de un equipo cilíndrico, un fondo liso de vidrio dentro de un vaso, un equipo recíprocante dentro del cilindro de material apropiado de acero inoxidable. Las mallas son hechas de material compatible que se ajusta a la parte superior e inferior del cilindro recíprocante. La operación implica la agitación del tubo interior dentro del tubo exterior medido en hundimientos por minuto. (5 y 15)	Productos de disolución de liberación inmediata o fármacos poco solubles, formas de dosificación de liberación sostenida con cubierta entérica y en tabletas masticables. (5)
4 (CELDAS DE FLUJO CONTINUO)	El suministro de medio de disolución en sistema abierto para la disolución de fármacos poco solubles y en sistema cerrado dependiendo de las características de solubilidad y saturación del fármaco. Mantener las condiciones <i>sink</i> . Ajustar la velocidad de flujo, realizar cambios rápidos de pH durante la prueba, las celdas pueden contener muestras diferentes y la simulación de condiciones fisiológicas. La farmacopea Japonesa no aprueba este equipo para la prueba de disolución. (5, 15 Y20)	Consiste de un reservorio y de una bomba para el medio de disolución, una celda de flujo constante, un baño de agua que mantiene el medio de disolución a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Ver figuras de la No. 2 a la No. 6 correspondientes al equipo de disolución comercial del aparato 4 celdas de flujo continuo. (18)	Tabletas, tabletas con cubierta entérica, supositorios, cápsulas de gelatina blanda, semisólidos, polvos, gránulos e implantes, microesferas y liposomas. (19)
5 (PALETAS SOBRE DISCO)	Facilidad de empleo debido a su similitud con el aparato 2 de la USP. La desventaja es su limitada aplicación para otras formas farmacéuticas. (21 Y22)	Un vaso y paletas además de un disco de acero inoxidable designado para sumergir el sistema de prueba en el fondo del vaso. La distancia entre la paleta y el disco es de 25 ± 2 mm. (21 y 22)	Parches transdérmicos y una modificación es llamada sandwich el cual consiste en malla de vidrio visible-parche-malla de polytef. (15)

APARATO	VENTAJAS Y DESVENTAJAS	CONDICIONES DE USO	USO
6 (METODO SOBRE CILINDRO)	Adaptarse a un tamaño necesario del parche transdérmico. Limitada aplicación para las diversas formas farmacéuticas, además de que no está validado su método para calificación del equipo; aún cuando, se basa en el aparato 1 de disolución. (21 y 22)	Emplea el vaso aplicado para el aparato 1 de la USP, excepto que reemplaza la canastilla y el eje por un elemento agitador cilíndrico de acero inoxidable que mantiene la temperatura a $32 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante el transcurso de la prueba. La dosis de prueba es colocada en el cilindro para cada prueba y la distancia entre el fondo del vaso y el cilindro es de $25 \pm 2\text{mm}$. (21 y 22)	Parches transdérmicos. (21)
7 (DISCO RECIPROCANTE O SOPORTE DE OSCILACIÓN VERTICAL)	La ventaja del empleo del equipo es su amplia aplicación. No tiene tabletas calibradoras que garantice su empleo; por lo tanto para la calificación del desempeño se debe seguir una serie de datos que cubran las necesidades para la cual se emplea dicho equipo que sirve para determinar los parámetros críticos en los cuales se puede incluir la velocidad de inmersión en el baño y control de volumen. (21 y 22)	Un adaptación volumétrica calibrada que contiene una solución de concentración conocida hecha de vidrio u otro material inerte con el cual pueda ser sustituido; consta de un motor y del armado para el sistema reciprocante vertical y para evaluar el sistema en forma horizontal para una fila diferente de vasos diseñados automáticamente y la adaptación de muestras dispensadas en hundidores. Cada muestra se inserta y sumerge en forma vertical con agitación reciprocante (oscilante) de manera que cada sistema sea continuamente inmerso en una cantidad exacta de medio. La frecuencia es la forma de medir la oscilación y es de 30 ciclos por minuto con una amplitud de alrededor de 2 cm. (21 y 22)	Tabletas recubiertas, parches transdérmicos y una aplicación especial en la bomba osmótica aplicado a tabletas de liberación extendida. (21 y 22)

2.4.2. Componentes del aparato celdas de flujo continuo.

BOMBA

La función de la bomba es impulsar el medio de disolución del reservorio para que fluya a través de la celda. Aun cuando las bombas comerciales tienen un intervalo de operación de entre 240 y 960 mL por hora, las condiciones de flujo más usadas son entre 4,8 y 16 mL/ minuto, en donde el flujo es constante e independiente de la resistencia en el filtro observado; el perfil del flujo es sinoidal con una duración de 120 ± 10 pulsos por minuto. (18)

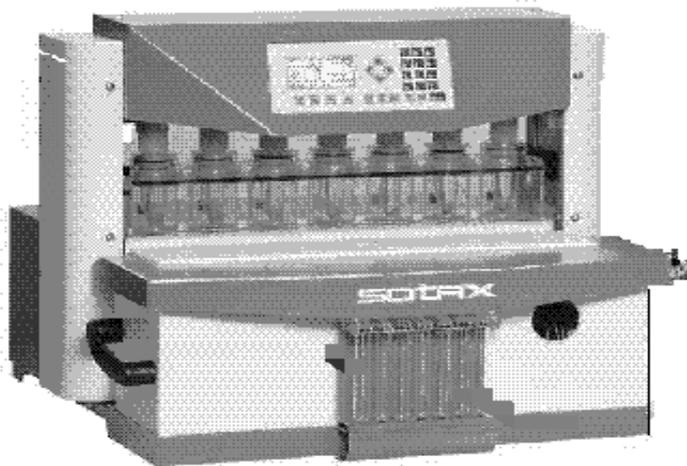


Figura No. 2: Equipo de disolución comercial que sigue el principio del aparato 4 de la USP.

CELDA

La celda de flujo continuo es la parte del aparato donde se lleva a cabo la disolución. Es aquí en donde las partículas sólidas están en contacto permanente con el medio de disolución. La temperatura del medio dentro de la celda debe ser lo más cercano a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, está constituida de material transparente e inerte, es montada verticalmente con un sistema de filtro que previene el escape de partículas no disueltas en la superficie de la celda; el diámetro de las celdas estándar es de 12 y 22.6 mm; el fondo del cono normalmente es llenado con pequeñas perlas de vidrio de alrededor de 1 mm de diámetro con una perla adicional de alrededor de 5 mm de diámetro posicionada en el apéndice para proteger la entrada de flujo al tubo; un adaptador para tableta es proporcionado para posicionar de manera especial la forma farmacéutica (ver figura No. 5). La celda es inmersa en un baño de agua y la temperatura se mantiene a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$. El armado de celda se esquematiza en las figuras No. 3 y 4.

El aparato usa un mecanismo de cierre con dos anillos tipo o, para la fijación y ensamblado de las celdas. La bomba está separada de la unidad de disolución en orden para evitar las vibraciones originadas por la bomba. La posición de la bomba no debe estar en un nivel más alto que el matraz reservorio de medio. Los tubos conectores deben ser lo más corto posibles, así como tubos de polytef con un diámetro interno de 1.6 mm, químicamente inerte incluyendo las conexiones finales. (18)

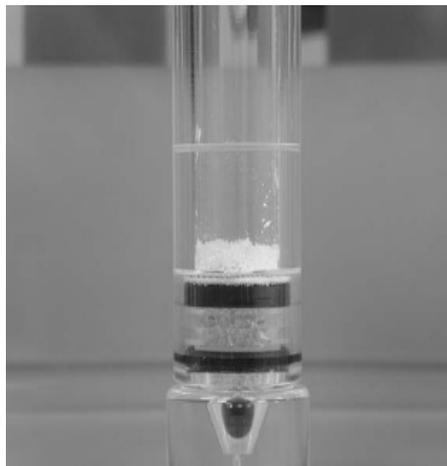


Figura No. 3. Ejemplo del armado de una celda para polvos de aparato IV de USP. (20)

USO.

Las celdas de flujo continuo, pueden emplearse como un sistema abierto o un sistema cerrado dependiendo de las características de solubilidad y saturación del fármaco, como se ilustra en la figura No. 5 y es aplicable para determinación de la velocidad de disolución de tabletas, tabletas con cubierta entérica, supositorios, cápsulas de gelatina blanda, semisólidos, polvos, gránulos e implantes, microsferas y liposomas (ver figura No. 6). (19)

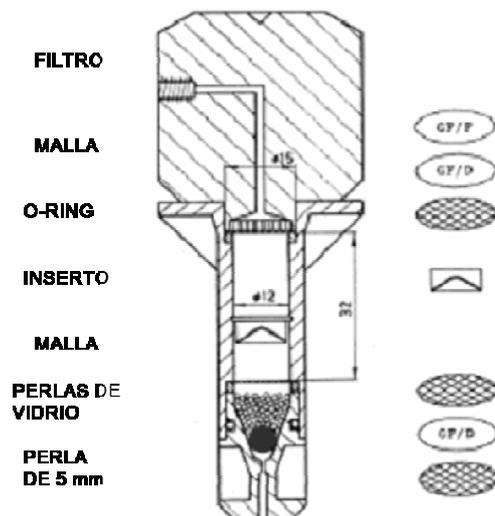


Figura No. 4. Esquematización del armado de la celda para polvos en aparato IV de USP. (20)

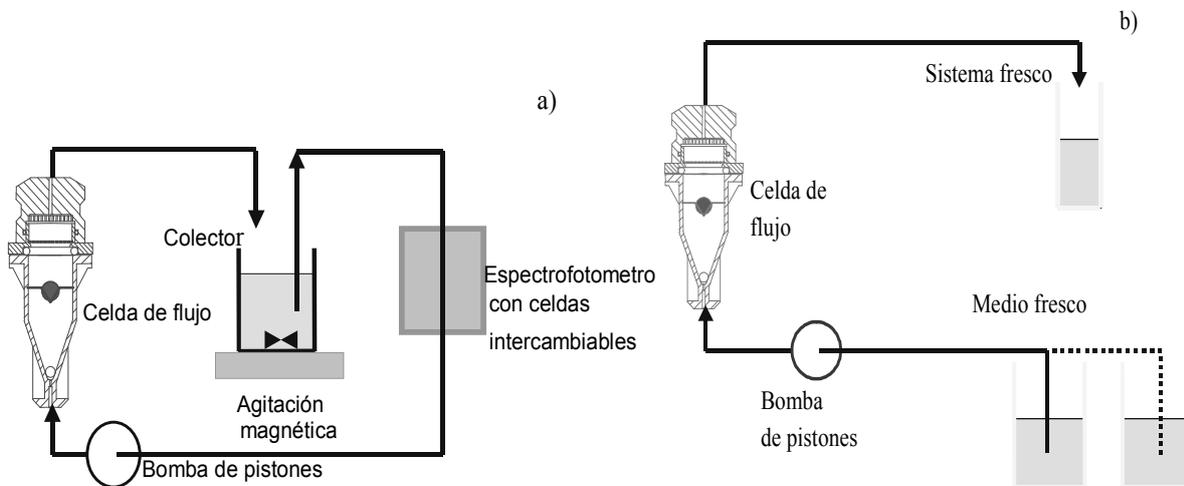


FIGURA No. 5: Empleo del sistema cerrado (a) y el sistema abierto (b).⁽²¹⁾

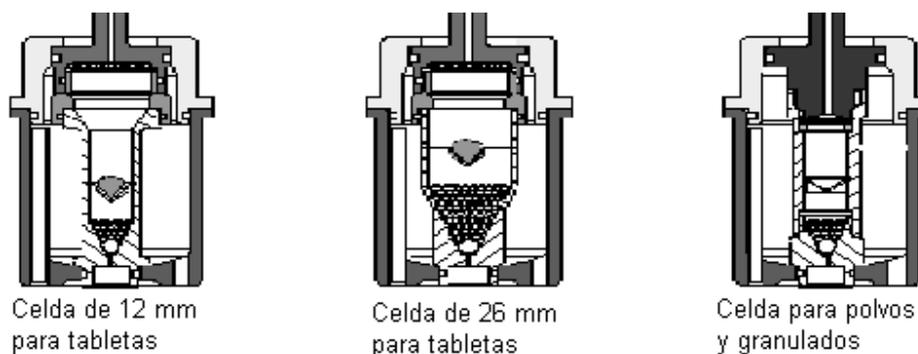


FIGURA No. 6: Representación de los tipos de celdas empleadas en el aparato 4 de la USP.⁽²³⁾

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LAS CELDAS DE FLUJO CONTINUO.

Emplean una cantidad muy pequeña de volumen en la celda, donde la muestra en solución es sometida a un suministro continuo de medio de disolución. El flujo del medio de disolución pasa a través de la celda desde el fondo hasta el borde de la celda. El movimiento especial con pulsaciones generadas por la bomba de pistones obvia la necesidad de una agitación posterior o elementos de agitación. Una filtración posterior en la parte superior de la celda retiene todo el material no disuelto y provee una solución clara que subsecuentemente es analizada cuantitativamente para determinar la cantidad de material disuelto.

Adicionalmente un sistema cerrado emplea un volumen constante y limitado de medio para disolución; el sistema de flujo a través de la celda es usualmente operado con un sistema abierto en el cual nuevo medio de disolución es continuamente suministrado dentro del sistema. La designación experimental de un sistema cerrado resulta en un perfil de disolución acumulativo. Con el sistema

abierto, todo el fármaco disuelto es instantáneamente cambiado a través del flujo del medio de disolución. Los resultados son generados como velocidades de disolución; es decir la fracción disuelta por unidad de tiempo. Los resultados obtenidos de pruebas en sistemas con celdas de flujo continuo también necesitan ser transformados para poder ser presentados como un perfil de disolución donde se evalúa la cantidad disuelta acumulada.

Otra de las grandes ventajas del empleo de dicho aparato es que mediante este aparato se pueden mantener las condiciones *sink* y la muestra se mantiene constantemente en disolvente fresco.

Ventajas adicionales son el uso de dispositivos para mantener la temperatura controlada, la posición de la muestra dentro de la celda, la posibilidad de ajustar la velocidad de flujo, realizar cambios rápidos de pH durante la prueba, las celdas pueden contener muestras diferentes y la simulación de condiciones fisiológicas.

Una de las desventajas del equipo es que en un sistema abierto se emplea un volumen ilimitado de medio el cual puede ser costoso; además de que no hay un método de calibración validado. (15 y 20)

2.4.2.1 Calificación del desempeño del equipo

PREVALIDACIÓN DEL EQUIPO.

Idealmente el proceso puede ser iniciado antes de que el equipo sea ordenado, con sucesivas actividades previas a la validación. Inicialmente el vendedor desempeña todas las evaluaciones.

Los requerimientos funcionales son la clave de la validación en un nuevo sistema o equipo.

A continuación se mencionan algunos requerimientos y especificaciones para el aparato 4 de disolución.

- La bomba debe ser capaz de ajustar el flujo (típicamente velocidades de flujo de 4, 8 o 16 mL/min).
- El tubo con el cual se suministra el medio de disolución desde la bomba hasta la celda, debe ser hecha de polyteflon con un diámetro interno de 1.6-mm.
- Las celdas pueden contener en el interior un holder (sujetador) de manera que se pueda sumergir en baños de agua que se mantiene a $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$

PRUEBAS DE CALIFICACIÓN.

Los requerimientos funcionales son asentados a través de la prueba de calificación. Se incluyen varias pruebas tales como: Calificación de la instalación (IQ), Calificación de operación (OQ), Calificación del desempeño (PQ) y pruebas

tales como son seguridad, almacenamiento e integridad de los datos; así como la una rastreabilidad auditable.⁽²¹⁾

2.5 Selección del medio de disolución.

Para algunos compuestos poco solubles, la adecuada disolución no puede ser obtenida con soluciones acuosas con valores de pH fisiológicos. Para estos compuestos, una solución acuosa que contenga un surfactante puede ser usado para garantizar la solubilidad del fármaco. Comúnmente se aceptan tensoactivos iónicos o no iónicos. En general, los detergentes no iónicos (Ej. Tween) son considerados más relevantes biológicamente, y estos son a menudo los primeros cambios cuando se considera la adición de surfactantes. ⁽³⁾

El tipo de surfactante o la concentración empleada puede ser justificado por perfiles de disolución en diferentes condiciones. Un tensoactivo puede ser usado como un agente humectante o hasta alcanzar la concentración crítica micelar (CMC) para solubilizar a la sustancia farmacéutica. Generalmente un incremento gradual en el porcentaje de la cantidad de surfactante (0.1%, 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1% y 2%) son evaluados. ^(23 y 24)

Un tensoactivo disminuye la tensión interfacial entre el solvente y el sólido en su superficie incrementando la superficie de contacto. Cuando se presentan en un medio líquido a bajas concentraciones los amfifílicos tienen una molécula o ion con cierta afinidad tanto por solventes polares como no polares que se encuentran de manera separada.

Conforme la concentración del tensoactivo en solución incrementa, ocurre una agregación sobre un estrecho rango de concentración. Las micelas son una agregación que puede contener 50 o más monómeros, los agregados llamados micelas; son pequeños agregados esféricos de moléculas del agente tensoactivo.

La concentración a la cual las primeras micelas se forman en solución es llamada concentración crítica micelar.

El HLB (balance hidrofílico –lipofílico) es una aproximación asignada con un número que indica el balance lipofílico-hidrofílico para cada surfactante. Un incremento en lo largo de la cadena polioxietileno incrementa la polaridad y por lo tanto, el valor de HLB (ver tabla No. 3); una cadena larga polar constante, un incremento en lo largo de la cadena alquílica, o el número de ácidos grasos, disminuyen la polaridad y por lo tanto también el valor de HLB. ^(10, 16)

TABLA No. 3. Valores de HLB de tensoactivos para indicar si son hidrofílicos o lipofílicos.

CARÁCTER	VALOR
Hidrofílico	10-18
Lipofílico	0-9

Factores que afectan la CMC para tensoactivos no iónicos

- a) Dependencia del grupo hidrofóbico
- b) Para surfactantes no iónicos del tipo oligo (óxido de etileno) un incremento en el número de grupos óxido de etileno a lo largo de la cadena alquílica resulta en un incremento de la CMC.
- c) Efecto del pH en la CMC
- d) Efecto de los electrolitos en la CMC
- e) Efecto de temperatura. (25, 26 y 27)

Los agentes tensoactivos se clasifican en 4 grupos de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas:

1. Aniónicos
2. Cationicos
3. No iónicos
4. Anfóteros. (16 y 25)

De acuerdo a su empleo se pueden usar en diversas concentraciones dependiendo si se requiere como agente emulsificante, agente solubilizante o agente tensoactivo. (16)

2.5.1 Características de Tween 60

POLISORBATO 60

NOMBRES COMERCIALES: Polisorbato 60, Polysorbatum 60, Cremophor PS 60; polyoxyetilen 20 estearato; sorbitan monooctadecanoato poli (oxi-1,2-etanedil) derivados.

Es un Polisorbato éster de ácido graso de sorbitan polioxietileno que son una serie de ésteres parciales de ácidos grasos de sorbitol y este anhídrido copolimerizado con aproximadamente 20 moles de óxido de etileno por cada mol de sorbitol.

Las 20 unidades de óxido de etileno son las que le dan el carácter de surfactante no iónico hidrofílico. Son usados como agente tensoactivo en formulación de suspensiones parenterales.

NOMBRE QUÍMICO: Polioxietilen 20 sorbitan monoestearato.

FÓRMULA: $C_{64}H_{126}O_{26}$

PM: 1312 g/mol

ORGANOLÉPTICAS: Líquido oleaginoso o semigelatinoso a 25°C de color limón o anaranjado, con un tenue olor característico.

SOLUBILIDAD:

Soluble en etanol

Soluble en agua

Insoluble en aceite vegetal

Insoluble en aceite mineral

CONTENIDO DE:

Ácidos 2.0%

Hidróxidos 81-96%

Valor de saponificación 45-55

Valor HLB 14.9

Tensión superficial a 20°C 42.5mN/m

INCOMPATIBILIDAD:

Puede ocurrir decoloración y/o precipitación con varias sustancias, especialmente con fenoles, taninos y derivados de alquitrán.

La actividad antimicrobiana de conservadores parabenos es reducida en presencia de polisorbatos.

SEGURIDAD:

Han sido asociados con serios efectos adversos, incluyendo algunas muertes, en infantes con bajo peso por administración intravenosa en preparados que contenían vitamina E y una mezcla de polisorbato 20 y 80. Cuando se calienta para descomposición emite humo cáustico el cual es irritante.

Ingesta máx. 25mg/Kg. de peso en hombres.

Moderadamente tóxico por vía I.V.

Experimentalmente tumorigeno, efecto en la reproducción. (28 y 30)

2.6 Características fisicoquímicas de estradiol y progesterona**2.6.1 Características fisicoquímicas del estradiol**

Nombre genérico: 17-β-Estradiol

Nombre químico: Estra-1,3,5-(10)-trien-3,17-diol,(17-β)
Estra-1, 3,5-(10)-trien-3,17-β-diol

Formula condensada: C₁₈H₂₄O₂

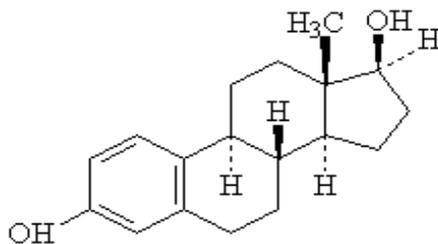


Figura No. 7. Fórmula desarrollada del 17-β-Estradiol

Peso molecular: 273.37 g/mol

Descripción: Polvo cristalino blanco, translúcido, prácticamente inodoro o cremoso inodoro e insípido.

Punto de ebullición: 176°C.

Solubilidad: Casi insoluble en agua (más de 10000 partes de agua para 1 parte de soluto). Libremente soluble en alcohol, soluble en acetona, dioxano y otros solventes orgánicos. Escasamente soluble en aceites vegetales.

Solubilidad en agua 5µg/cm³.

La forma amorfa del 17-β-estradiol sufre transformaciones entre sí al ser sometidas a calentamiento y/o agitación mecánica.

Una propiedad importante es la tendencia a adquirir la forma hemihidratada (Forma α). Se obtiene a partir de soluciones acuosas; acetato de etilo, cloroformo, etanol absoluto y otros disolventes orgánicos.

Espectro infrarrojo: 821, 1054, 1227, 1245, 1276 y 1493 cm⁻¹.

U.V.: 17-β-estradiol metanol-agua 2% A (v/v)

Máx. 221 nm ($A_{1\%}^{1\text{cm}} = 75$) y un umbral a 281 nm. El espectro sufre un efecto batocrómico con el aumento de pH (el punto isobéptico ocurre a 285.6nm).

Uso y contraindicaciones.

Náuseas, en dosis elevadas anorexia, vómitos y diarrea leve. Congestión mamaria, hiperplasia endometrial y la hemorragia. Riesgo de cáncer endometrial en mujeres posmenopáusicas.

El estradiol se absorbe por piel y por mucosas del tracto gastrointestinal. (10, 31 y 32)

2.6.2 Características fisicoquímicas de progesterona.

Nombre químico:

Pregn-4-en-3,20-diona.

Δ^4 -pregneno -3, 20- diona.

Corlutina.

Fórmula condensada: $C_{21}H_{30}O_2$

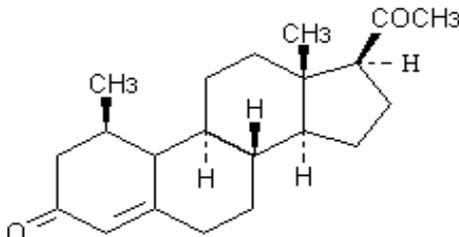


Figura No. 8. Fórmula desarrollada de progesterona

Peso molecular: 314.45 g/mol

Descripción: Polvo cristalino de color blanco o ligeramente amarillento.

Solubilidad: Es casi insoluble en agua (más de 10000 partes de agua para 1 parte de soluto), soluble en alcohol, soluble en acetona, dioxano y ácido sulfúrico concentrado.

Solubilidad en agua $9 \mu\text{g}/\text{cm}^3$.

La progesterona tiene dos formas cristalinas α y β que a altas temperaturas sufre transformación unilateral de β a α espontánea. La forma β es termodinámicamente inestable.

Espectro infrarrojo: Picos en 1662, 1614, 1700.872, 1209 y 1232 cm^{-1} en medio de dispersión bromuro de potasio.

U.V.: Disuelta en alcohol sufre un máx.: 240nm $A_{1\%}^{1\text{cm}} 540$

Toxicidad: En dosis elevadas produce analgesia ligera y anestesia general.

No administrarse de forma oral porque sufre biotransformación inactivación por el metabolismo del efecto de primer paso en hígado (hidroxilación conjugación). Es bien absorbida por vía rectal, vaginal e intramuscular.

Efectos adversos: Hemorragia menstrual anormal, (sangrado intermenstrual, cambio en la cantidad de flujo o amenorrea). Náuseas, vómito y somnolencia con la administración de progesterona por poco tiempo. Puede presentar edema, aumento de peso y malestar en pecho. (10, 31 y 32)

2.6.3 Uso terapéutico de esteroides.

El uso de estradiol y progesterona está indicado terapéuticamente para trastornos del ciclo menstrual. (33)

También se emplean para el caso de terapias de reemplazo hormonal y terapia de reemplazo estrogénica. (34)

El uso de estradiol está indicado para el tratamiento de los síntomas asociados a bajos niveles séricos de estrógenos y en particular de estradiol, ya sea por la suspensión de la producción y secreción de estrógenos debido a la menopausia, o por extirpación quirúrgica de los ovarios. (35)

Existen diversas presentaciones en las cuales los esteroides pueden dosificarse como comprimidos vía vaginal, en forma esferoidal en implantes subcutáneos y en suspensiones inyectables. (33 y 36)

2.7 Formas farmacéuticas de liberación modificada.

Las formas de dosificación con liberación modificada es una forma farmacéutica que permite una reducción en la frecuencia de dosis comparado con la forma de dosificación convencional. (7)

2.7.1 Microesfera.

Es un sólido no poroso de estructura esférica con diámetro de entre 5 y 300 μm , que contiene en su interior como mínimo una sustancia activa en su estructura. (36, 37 y 38)

2.7.2 Preparados inyectables.

Son soluciones, suspensiones o emulsiones estériles, que contienen uno o más fármacos, preparados por disolución o suspensión del principio activo y otros aditivos en agua para inyección o en un líquido no acuoso o en una mezcla de líquidos miscibles entre sí, envasados en recipientes adecuados, que se destinan para introducirse al organismo parenteralmente, por diferentes vías. (5)

2.8 Cuantificación del método de disolución.

Todo método de disolución debe contar con un método de analítico ya que al realizar pruebas de perfiles de disolución, se producen muestras las cuales requieren ser cuantificadas en un rango de concentraciones; además de que se debe demostrar que no existen interferencias provocadas por la presencia de otras sustancias tales como excipientes. (5)

Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra. Un analito se define como un componente específico de una muestra a medir en un análisis; por lo que un método analítico mide un componente específico (analito) en una muestra y como en todo proceso de medición, éste debe ser confiable para ser utilizado con un propósito definido. La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; es decir cumple con el objetivo para el que fue diseñado. (39 y 40)

De manera que al realizar un método analítico debe contarse con la evidencia de que el procedimiento que se realiza para el método analítico funciona para los fines previamente establecidos. (5).

Los parámetros de validación para la cuantificación debe demostrarse en función de la aplicación analítica por lo tanto los parámetros generalmente validados son que el sistema sea adecuado, lineal y preciso; además de que el método sea lineal, preciso, exacto, específico reproducible, repetible, estable y robusto. (41)

2.9 Métodos estadísticos para establecer la comparación de los perfiles de disolución.

El análisis de los resultados de disolución se evalúa de acuerdo a los datos obtenidos durante el desarrollo, ya que va a depender del número de observaciones evaluadas, la variación que hay entre cada observación, el porcentaje disuelto mínimo y los intervalos de tiempo evaluados; para poder emplear el método que mejor se ajuste. De entre la variedad de métodos empleados esta: el Factor de similitud f_2 , análisis multivariado, análisis de varianza, análisis de covarianza, series de tiempo y rangos de Wilcoxon. (42, 43, 44 y 45)

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad las formas farmacéuticas sólidas que se reconstituyen para formar una suspensión de aplicación parenteral requieren cumplir con especificaciones como control de calidad, dentro de las cuales una prueba importante durante el proceso de fabricación es la disolución; la prueba de disolución permite tener evidencia del comportamiento de la liberación *in vitro* de los activos; ya que cambios en el proceso de fabricación o en el mezclado de los activos involucrados, pueden aumentar o disminuir la liberación del fármaco (s).

Dentro de las formas farmacéuticas sólidas evaluadas en su disolución se tienen los sistemas de liberación modificada y dentro de los activos que utilizan más estos sistemas están las hormonas naturales como progesterona y estradiol; los cuales son empleados ampliamente, solos o combinados en anticonceptivos, promotores del crecimiento y en los últimos años en esquemas de terapia de reemplazo hormonal.

Hoy en día en CAFET se ha desarrollado una metodología para evaluar el perfil de disolución a microesferas de estradiol y progesterona que se presentan como mezcla de los activos y de forma individual, sin embargo esta metodología tarda aproximadamente de 7 a 10 días en caracterizar el 80% de fármaco disuelto (método largo de disolución) por lo cual se presentó la necesidad de evaluar el perfil de disolución en menor tiempo para obtener resultados confiables y reproducibles con fines de control de calidad (método rápido o acelerado). Por lo cual el objetivo de este trabajo requiere de diseñar un perfil de disolución que permita caracterizar y acelerar el perfil de disolución; así como discriminar entre lotes de microesferas de estradiol: colesterol, microesferas de estradiol: colesterol+progesterona y progesterona empleando el aparato IV celdas de flujo continuo.

Se requiere que el método desarrollado sea de bajo costo, sencillo con una obtención de resultados rápidos y que además cuente con un método analítico lo suficientemente robusto, específico y que sirva para el propósito diseñado.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

- Obtener un método de disolución que permita evaluar de manera rápida la disolución de dos hormonas solas o en combinación para caracterizar el 80% disuelto de los activos y de esta manera emplearlo con fines de control de calidad.

4.2. Objetivos particulares:

- Diseñar y desarrollar un método de disolución acelerado empleando el equipo IV de disolución de la USP para microesferas de estradiol y progesterona como activos independientes o combinados.

- Identificar en el desarrollo del método de disolución las variables que influyen en la disolución de la forma farmacéutica de microesferas.

- Con el método de disolución desarrollado lograr caracterizar el 80% de fármaco disuelto en 24 horas.

- Reducir el tiempo de realización de un perfil de disolución.

- Emplear un método de cuantificación validado, para evaluar las muestras provenientes de perfiles de disolución.

5. HIPÓTESIS

Al desarrollar un perfil de disolución acelerado que sea repetible, reproducible, robusto y capaz de discriminar entre diferentes lotes aplicado a microesferas de estradiol y progesterona, se podrá minimizar el tiempo de análisis, costo y el impacto ecológico.

6. METODOLOGÍA

Ver la figura No. 9 donde se observa el diagrama esquemático de la estrategia de trabajo.

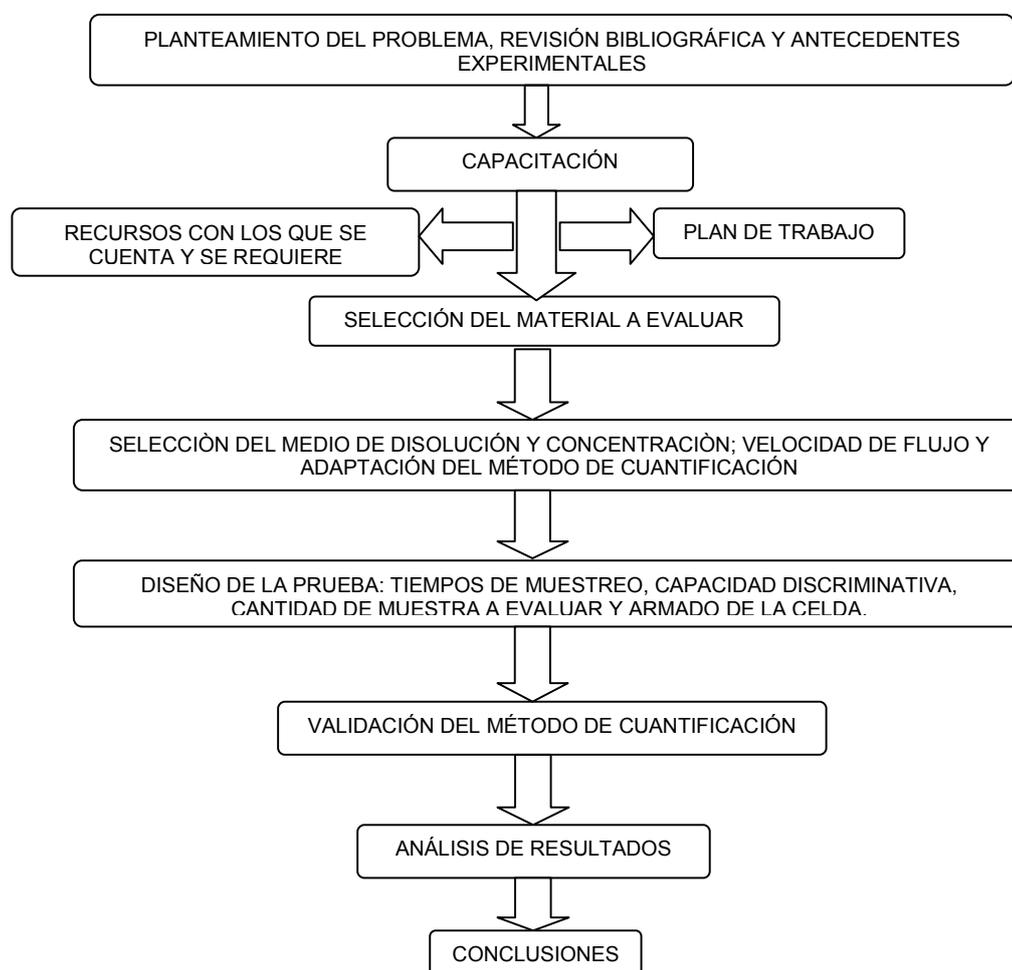


Figura No. 9: Diagrama esquemático de la estrategia que se siguió.

7. DESARROLLO EXPERIMENTAL

De acuerdo con la necesidad de aplicación y los antecedentes de un método de disolución largo para microesferas de estradiol y progesterona que emplea Tween 80 como medio de disolución a una concentración de 0.3% p/v utilizando el aparato IV de la USP a un flujo de 16mL/min, se requirió desarrollar el método de disolución acelerado empleando el aparato IV de la USP, para fines de control de calidad en el proceso de fabricación de microesferas de liberación modificada para estradiol, progesterona y la combinación de ambos activos.

El método debe ser útil para acelerar el perfil de disolución de microesferas de estradiol y progesterona solos o en combinación de los dos activos y que obtenga resultados similares con un perfil largo de los mismos activos; además de que sirva para evaluar algún cambio en el proceso de fabricación.

Los criterios regulatorios y legales, tanto nacionales como internacionales que se utilizaron en el desarrollo del método son:

- Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA-1993
- FDA, Agosto 1997 Guidance for Industry: Dissolution testing of immediate release oral dosage forms.
- FDA, Septiembre 1997 Guidance for Industry Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application on In Vitro/ In Vivo Correlations
- USP. <1092> The dissolution procedure: development and validation. Pharmacopeial Forum. Jan-Feb 2004; 31 (1): 351-363.

Equipos

Tabla No. 4. Equipo empleado para pruebas de disolución.

EQUIPO	MARCA	MODELO
Disolutor aparato IV de USP	Sotax	CP 7-37 ^V 115-230
Disolutor aparato IV de USP	Sotax	CE 70
Bomba para DIS010	Sotax	CE 7smart ^V 115
Bomba para DIS006	Sotax	CY7-50

Tabla No. 5. Equipo empleado para la cuantificación de los perfiles de disolución.

EQUIPO	MARCA	MODELO/ TIPO
Automuestreador	Waters	717P
Detector de fluorescencia	Waters	2475
Detector de U.V.	Waters	2487 Dual λ absorbance detector
Horno	Waters	Temperature control Module
Columna cromatográfica	Phenomenex	Luna Fenyl-hexyl 50 mm x 2 mm

Computadora Dell PC 5451 con programa Empower Pro 2002

Material

Frascos de vidrio de 40 L, 20 L y 4 L
Matraz Erlenmeyer de 125 mL, 250 mL, 500 mL, 1 L y 2 L
Vasos de precipitados de 250 mL
Garrafones contenedores de fase móvil
Tambo de plástico contenedor de medio de disolución de 200L
Probeta graduada de 500 mL, 1L y 2L

Reactivos

Agua purificada
Agua grado HPLC
Metanol HPLC marca Fermont
Acetonitrilo HPLC marca Fermont
Tween 60 materia prima marca Canamex lote B11W41
Tween 80 materia prima marca Canamex lote A27M70

Sustancia de referencia (SR)

Nombre: Estradiol sustancia de referencia secundaria
Pureza: 99.9%
Nombre: Progesterona sustancia de referencia secundaria
Pureza: 100.1%

Formulaciones

Microesferas de estradiol: colesterol
Microesferas de progesterona
Microesferas de estradiol: colesterol + progesterona
Vehículo para dispersar microesferas
En la tabla No. 6 se enlistan los lotes evaluados, la mezcla de microesferas y la procedencia de los lotes evaluados; la denominación ME indica microesferas.

Tabla No. 6. Lotes empleados en el desarrollo del método de disolución acelerada.

DESCRIPCIÓN	LOTE	PROCEDENCIA
ME Estradiol: colesterol (1:1)	ME2005038	Planta piloto
ME Estradiol: colesterol (1:1)	ME2004134	Planta piloto
ME Estradiol: colesterol (1:1)	DISOLUCIÓN ALTA ME2006257	Laboratorio de microesferas CAFET
ME Estradiol: colesterol (1:1)	DISOLUCIÓN BAJA ME2006260	Laboratorio de microesferas CAFET
Materia prima de estradiol USP	L00024600	AKZO Nobel Diosynth
ME de progesterona	ME2006203	Planta piloto
ME Estradiol: colesterol (1:1) + progesterona	ME2005112	Planta piloto
ME Estradiol: colesterol (1:1)	ME 2005142	Planta piloto

7.1 Desarrollo del método de disolución

El inicio del desarrollo del método de disolución tomó como base un método de disolución existente para microesferas de estradiol, denominado como disolución largo que el cual tenía las características siguientes:

Aparato: IV de disolución de la USP
Velocidad de flujo: 16 mL/min
Temperatura: $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$
Filtros: GF/D y GF/F
Sistema: Abierto
Mallas: de 0.16 mm y 0.45 mm
Perlas de vidrio de 1mm de diámetro

Adicionalmente se realizaron algunos perfiles de disolución de microesferas de estradiol probando una gama de tensoactivos que comprendió: Lauril sulfato de sodio, Tween 80 y Tween 60 en una variedad de concentraciones; así mismo se evaluó diferentes velocidades de flujo. Con esta información y los datos teóricos de HLB para cada uno de los tensoactivos; se seleccionó el que se emplearía como medio de disolución y la influencia de la velocidad de flujo en el perfil de disolución.

(16)

Como resultado de estas evaluaciones se seleccionó al Tween 60 como tensoactivo que se emplearía para preparar el medio de disolución y basándose en datos de concentración crítica micelar para solubilizar estrona, fue posible comenzar con el desarrollo del nuevo método de disolución realizando experimentos para determinar la concentración de Tween 60 necesaria para el nuevo método de disolución acelerado. (9)

Con la información obtenida del método de disolución largo, el método de cuantificación y la selección del medio de disolución; se realizaron los experimentos para desarrollar el método de disolución acelerado y el método de cuantificación que determinó la concentración de estradiol y progesterona en perfiles de disolución que empleó Tween 60 como medio de disolución.

El método de cuantificación comprendió el intervalo de concentración de 2 a 800 ng/mL de estradiol y en el intervalo de concentración de 20 a 8000 ng/mL para progesterona, que siguió las condiciones cromatográficas que se mencionan a continuación:

Fase Móvil:	Acetonitrilo/Agua (30:70)
Velocidad de flujo:	0.65 mL/min
Volumen de inyección:	80 microlitros
Detección:	UV a 254 nm para progesterona Fluorescencia $\lambda_{\text{Excitación}}$ 281 nm, $\lambda_{\text{Emisión}}$ 305, GAIN 1 y EUFS 10000 para estradiol
Temperatura de horno:	35.5°C
Tiempo de corrida:	14.5 minutos

Columna:	Luna Phenomenex Phenyl- Hexyl de 50 x 2.0 mm, tamaño de partícula de 3.0 micras
Guarda columna:	Phenomenex Phenyl 4.0 x 2.0 mm
Modo de integración:	Áreas
Respuesta:	Áreas de estradiol y progesterona

El nuevo método de disolución fue desarrollado con base a la evaluación de las siguientes características:

- Concentración del tensoactivo en el medio de disolución.

A partir de las evaluaciones con diferentes tensoactivos Tween 60, Lauril sulfato de sodio y Tween 80, se seleccionó el tensoactivo con las mejores características de disolución, tomando en cuenta el porcentaje disuelto en 24h y la cinética de disolución.

Posteriormente se evaluaron diferentes concentraciones el tensoactivo seleccionado (Tween 60) disminuyendo la concentración del tensoactivo de 1.4% p/v, 0.8% p/v, 0.4% p/v y 0.5% p/v hasta obtener un perfil que lograra evidenciar gráficamente el perfil de disolución en el que en aproximadamente 24h se alcanzará el 80% disuelto de estradiol, proveniente de las microesferas de estradiol: colesterol.

- Robustez de la concentración del Tween 60 en el medio de disolución.

Después de seleccionar la concentración del medio de disolución 0.5% p/v, se determinó la robustez a cambios intencionados en la concentración de Tween 60 en el medio de disolución, aumentando y disminuyendo 2.5% respecto a la concentración nominal de 0.5% p/v escogida, es decir un 0.0125%.

- Tiempos de muestreo.

La selección de los tiempos de muestreo fue realizada tomando como base que se requería tener un porcentaje disuelto alto en poco tiempo (mayor a 80% disuelto en 24h). Para esto se seleccionaron tiempos de muestreo que permitieran la caracterización de la cinética de los perfiles. Con base a los primeros perfiles realizados se establecieron los siguientes tiempos de muestreo 1h, 2h, 4h, 8h y 24h. En la selección de los tiempos de muestreo se tomo en cuenta las recomendaciones tanto de la de la NOM-177-SSA1-1998 como de la USP <1092> Pharmacopeial Previews. (2 y 14)

- Reproducibilidad entre equipos.

Se evaluó realizando perfiles de disolución en diferentes equipos de disolución celdas de flujo continuo, pertenecientes al laboratorio CAFET, en diferentes días y empleando el mismo lote de microesferas de estradiol: colesterol, empleando Tween 60 al 0.5% como medio de disolución.

- Perfil de disolución en materia prima de estradiol.

Se realizó el perfil de disolución a la materia prima con la que se fabricaron las microesferas de estradiol: colesterol (1:1), para determinar si el mezclado de las microesferas modificaba el proceso de disolución de estradiol.

- Efecto de la cantidad de muestra depositada.

Se evaluó realizando el perfil de disolución con diferentes cantidades de microesferas de estradiol: colesterol a partir de la cantidad de material y dosis de estradiol a utilizar en jeringas como presentación final del producto. Posteriormente las cantidades depositadas en celda, se incrementaron al doble y en el caso de progesterona al triple.

- Capacidad discriminativa del método.

Se evaluó al realizar perfiles de disolución empleando diferentes lotes de microesferas de estradiol: colesterol con velocidades de disolución denominados alto y bajo, determinadas previamente con el método de disolución largo.

7.2 Procedimiento para la realización de perfiles de disolución.

7.2.1 Adecuación del equipo de disolución. (Prueba de entrega de flujo)

El medio de disolución es preparado en recipientes con capacidad para 40 litros, en los cuales se introduce tubería que conduce el medio de disolución a la bomba. La tubería es conecta por medio de un código de colores en los cabezales de entrada a la bomba de pistones y esta a su vez tiene tuberías de salida que conectan con el equipo disolutor conservando el mismo código de conexión. El equipo disolutor tiene conectada tubería de salida para conducir el medio de disolución a los recipientes colectores.

Posteriormente se enciende el equipo disolutor para incrementar a $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ la temperatura del baño de disolución, previamente llenado de agua purificada. Ver figura No. 10 donde se indica el equipo y ubicación de los aditamentos.



Figura No. 10: Ubicación del armado del equipo de disolución del aparato IV de la USP. (46)

Después se colocan las celdas dentro de la chaqueta que se introduce en el disolutor, donde deben quedar perfectamente colocadas para ser sujetadas por el mismo equipo. Enseguida se inicia el funcionamiento de la bomba para suministrar medio de disolución a través de tuberías y celdas por un tiempo de 30 minutos, el medio colectado se recircula.

Se identifican y pesan 6 matraces Erlenmeyer de 125 mL, se suspende el suministro de medio de disolución y se coloca cada matraz en la respectiva tubería de salida del medio de disolución que debió haber pasado por las celdas. Se inicia el suministro de medio de disolución y se comienza a contar el tiempo de cinco minutos a partir de la primera gota de medio de disolución que cae a los matraces colectores y transcurrido el tiempo exacto, se suspende el suministro de medio de disolución. El peso del matraz con medio de disolución se resta al peso del matraz vacío respectivamente y se divide entre los cinco minutos para obtener la velocidad de flujo que presenta cada celda de disolución; la cual debe encontrarse entre 15.2 y 16.8 mL/min.

7.2.2. Preparación de las celdas para microesferas de estradiol

La celda de disolución está constituida por un cono en la parte inferior, donde se coloca una perla de rubí en el ápice del cono, sobre esta se colocan perlas de vidrio de 1mm de diámetro hasta llenar el cono; arriba se coloca una malla w 0.45 mm, un filtro GF/D, una malla w 0.16 mm y unir la parte cónica con el cilindro de la celda.

Pesar en la celda la cantidad equivalente a 3 mg de estradiol de un lote que contenga microesferas de estradiol: colesterol (1:1).

Después de pesar la muestra, llenar la parte cilíndrica de la celda con 2 g de perlas de vidrio de 1 mm de diámetro y colocar en el borde superior del cilindro una malla del número w 0.16 mm / d 0.12 mm, un filtro GF/D, un filtro GF/F y finalmente un anillo en forma de "o" (o-ring); ver figura No. 11.

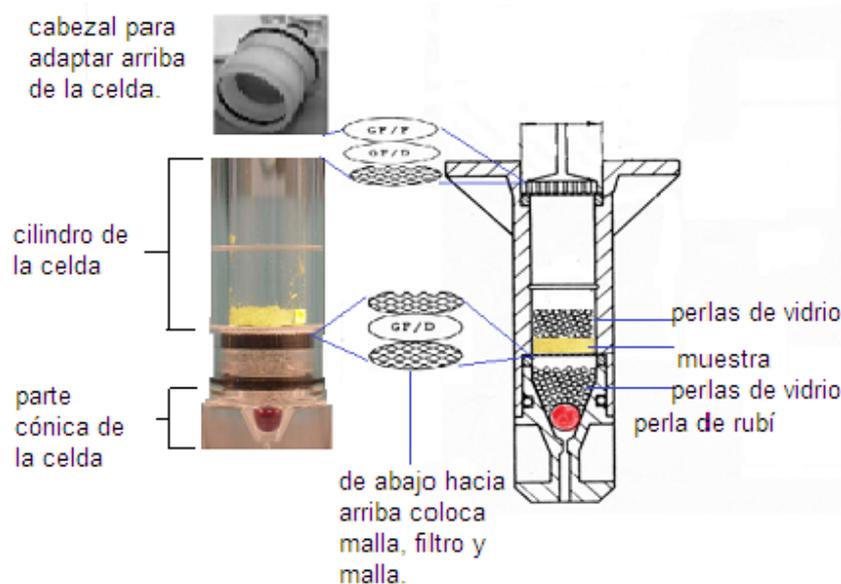


Figura No. 11: Partes del armado de la celda de disolución. (20 y 46)

Adaptar el cabezal sobre el cilindro de la celda y acoplar cada celda en la chaqueta para introducirla al equipo de disolución.

Dirigir la tubería de salida de cada celda a su respectivo matraz colector, hacer pasar agua del baño de las celdas a 37°C a través de la chaqueta de calentamiento. Iniciar la prueba de disolución y el conteo de tiempo desde el primer goteo en el matraz colector.

Medir el volumen colectado en cada intervalo de tiempo y tomar una alícuota de 10 mL que sirve para analizar por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Se calcula el flujo entregado por cada celda a los respectivos tiempos de muestreo, dividiendo el volumen entregado por la celda entre el tiempo de cada intervalo de tiempo colectado para evaluar el cumplimiento de la velocidad de flujo especificada a lo largo de la disolución.

7.2.3. Preparación de las celdas para microesferas de progesterona.

Se realiza el armado de la celda de igual forma que para estradiol, solo que la cantidad de muestra depositada dentro de la celda es el equivalente a 90 mg de progesterona.

7.2.4. Preparación de las celdas para microesferas de estradiol: colesterol (1:1) + progesterona.

Se realiza el armado de la celda de igual forma que para estradiol, solo que la cantidad de muestra depositada dentro de la celda es de 97.3 mg de estradiol: colesterol + progesterona de un lote que contenga microesferas de estradiol: colesterol + progesterona dosis (1:30).

7.2.5. Cálculos para la evaluación del perfil de disolución.

Después de obtenidas las muestras en cada intervalo de muestreo del perfil de disolución, estas se inyectaron por cromatografía de líquidos de alta resolución junto con una curva patrón y puntos control a lo largo de la corrida cromatográfica, de la cual se obtuvieron como respuesta áreas.

El valor del área obtenida se interpoló en la ecuación de la recta, generada por la curva patrón y de esta forma se obtuvo la concentración de la muestra en ng/mL, como se indica en la ecuación 12.

$$C_m = (R_M - b) / m \quad (12)$$

Donde:

C_m es la concentración de la muestra en ng/mL

R_M es la respuesta de la muestra en área

b es la ordenada al origen de la regresión lineal obtenida de la curva de calibración

m es la pendiente de la regresión lineal obtenida de la curva de calibración.

- a) Cálculo del porcentaje disuelto de estradiol en una muestra de microesferas de estradiol: colesterol (1:1)

Para calcular los miligramos disueltos de estradiol en una muestra de microesferas de E₂:Col (1:1), en microesferas de E₂:Col (1:1) + P₄ o en microesferas de P₄ en cada intervalo de tiempo, se empleó la siguiente fórmula de cálculo, ecuación 13:

$$\text{mg disueltos}_t = (C_m * F_d * V) / 1000000 \quad (13)$$

Donde:

Los miligramos disueltos a un determinado tiempo (mg disueltos_t) son los miligramos disueltos de estradiol o de progesterona en un intervalo de tiempo de muestreo.

C_m es la concentración de la muestra en ng/mL de estradiol o de progesterona

V es el volumen del medio de disolución colectado y medido en cada intervalo de muestreo (mL)

F_d es el factor de dilución, sólo en caso de realizar dilución, que aplica en los dos primeros tiempos de muestreo (Valores del factor de dilución 5, 4 y 2 según la dilución empleada: 1:5, 1:4 o 1:2).

El cálculo del porcentaje disuelto en cada intervalo de tiempo se determinó con la fórmula 14:

$$\% \text{ disuelto} = (C_d / C_t) * 100 \quad (14)$$

Donde:

C_d es la cantidad disuelta en mg

C_t es el contenido teórico depositado en la celda que se calcula con la fórmula 15 para microesferas de E₂:Col (1:1); con la fórmula 16 para microesferas de E₂:Col (1:1) + P₄. Para microesferas de P₄ se emplea el valor de 90.

$$C_t = P_m * 0.4133 * 1000 \quad (15)$$

$$C_t = P_m * 0.07455 * 0.4133 * 1000 \quad (16)$$

Donde:

P_m es el peso de la cantidad de microesferas de estradiol: colesterol depositadas en la celda en gramos

El factor 0.4133 es la fracción molar de estradiol en la muestra de microesferas de E₂: Col (1:1)

El factor 0.007455 es la fracción molar de estradiol en la mezcla de microesferas de E₂:Col (1:1)+P₄

Se calculó el promedio del porcentaje disuelto de las celdas evaluadas a cada tiempo, a estos datos se les determinó la desviación estándar, coeficiente de variación, así como los valores máximos y mínimos para cada intervalo de tiempo. Se representó gráficamente los por cientos disueltos del perfil de disolución incluyendo su desviación estándar.

Se analizaron los resultados del desarrollo del método de disolución mediante comparación de los perfiles de disolución empleando el factor de similitud (f₂) y series de tiempo, en los casos donde los datos no permitían emplear f₂ para obtener conclusiones del desarrollo del método.

7.3 Método de cuantificación

Se utilizó un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para el análisis de las muestras de disolución el cual fue previamente validado y los parámetros que le fueron validados son los siguientes:

- Sistema
 - Adecuación del sistema
 - Linealidad
 - Precisión

- Método
 - Linealidad
 - Exactitud
 - Repetibilidad
 - Precisión intermedia

- Estabilidad analítica de las muestras
 - Temperatura ambiente
 - Refrigeración (2-8° C)

- Especificidad a colesterol y vehículo (excipientes)

- Robustez
 - Cambio de fase móvil
 - Cambio de temperatura
 - Cambio de velocidad de flujo

8. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

8.1 Resultados y análisis de resultados del método cromatográfico utilizado para la cuantificación de estradiol y progesterona en muestras provenientes de los perfiles de disolución.

ADECUACIÓN DEL SISTEMA

La adecuación del sistema se evaluó inyectando por quintuplicado una solución de concentración equivalente a 200 ng/mL de estradiol y 2000 ng/mL de progesterona. Con la respuesta obtenida (áreas) se calculó el coeficiente de variación de las respuestas; el cual fue menor al 2.0% tanto para estradiol como para progesterona, lo cual indica que el sistema empleado funcionó apropiadamente durante cada determinación. Esta determinación se realizó en cada parámetro evaluado para la validación del método analítico.

LINEALIDAD DEL SISTEMA.

En la determinación de la linealidad del sistema se evaluó preparando curvas patrón de estradiol y progesterona por triplicado a partir de pesadas independientes; con las respuestas obtenidas (áreas) que se muestran en las tablas No. 7 y 8, se realizó un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados, utilizando como variable independiente "X" a la concentración de estradiol y progesterona y como variable dependiente "Y" a la respuesta (áreas) de los compuestos mencionados; donde hay una relación lineal entre la concentración y la respuesta, en los intervalos de concentración de 2 a 800 ng/mL para estradiol y de 20 a 8000 ng/mL para progesterona. Con los datos se obtuvo la ecuación de la recta que relaciona la concentración con la respuesta, los intervalos de confianza para la pendiente y ordenada al origen tanto para estradiol como progesterona, como se muestran en la parte inferior de cada tabla.

Tabla No. 7. Resultados de la evaluación de linealidad del sistema para estradiol.

IDENTIFICACIÓN MUESTRA	CONCENTRACIÓN ng/mL	RESPUESTA AREA	CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA ng/mL	%ERROR
P1-1	2.0	8806	2.0	-0.5
P1-2	2.0	8881	2.0	0.4
P1-3	2.0	8784	2.0	-0.7
P2-1	5.0	21538	5.0	-0.2
P2-2	5.0	21965	5.1	1.8
P2-3	5.0	21605	5.0	0.1
P3-1	10.0	42949	10.0	0.3
P3-2	10.0	42940	10.0	0.3
P3-3	10.0	42883	10.0	0.2
P4-1	25.0	104943	24.6	-1.5
P4-2	25.0	106770	25.1	0.3
P4-3	25.0	106133	24.9	-0.3
P5-1	50.0	213731	50.3	0.5
P5-2	50.0	213656	50.2	0.5
P5-3	50.0	211970	49.8	-0.3
P6-1	200.0	850501	200.3	0.1
P6-2	200.0	850327	200.2	0.1
P6-3	200.0	849781	200.1	0.0
P7-1	400.0	1704860	401.5	0.4
P7-2	400.0	1687038	397.3	-0.7
P7-3	400.0	1699137	400.2	0.0
P8-1	800.0	3403433	801.6	0.2
P8-2	800.0	3391862	798.9	-0.1
P8-3	800.0	3396100	799.9	0.0

ECUACIÓN DE LA RECTA

$$y = 4245.3141 x + 356.9673$$

$$r^2 = 0.9999$$

INTERVALO DE CONFIANZA AL 95 % $gI = 22$ PARA LA PENDIENTE

Límite Superior = 4250.6743
 Límite Inferior = 4239.9538

Tabla No. 8. Resultados de la evaluación de linealidad del sistema para progesterona.

IDENTIFICACIÓN MUESTRA	CONCENTRACIÓN ng/mL	RESPUESTA AREAS	CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA ng/mL	%ERROR
P1-1	20.0	6526	19.7	-1.3
P1-2	20.0	6542	19.8	-1.1
P1-3	20.0	6648	20.1	0.6
P2-1	50.0	16174	50.2	0.5
P2-2	50.0	15852	49.2	-1.5
P2-3	50.0	16128	50.1	0.2
P3-1	100.0	31947	100.1	0.1
P3-2	100.0	31923	100.0	0.0
P3-3	100.0	31949	100.1	0.1
P4-1	250.0	79652	251.0	0.4
P4-2	250.0	79903	251.8	0.7
P4-3	250.0	78760	248.1	-0.7
P5-1	500.0	159914	504.7	0.9
P5-2	500.0	158281	499.6	-0.1
P5-3	500.0	158300	499.6	-0.1
P6-1	2000.0	639049	2019.7	1.0
P6-2	2000.0	634169	2004.3	0.2
P6-3	2000.0	628122	1985.2	-0.7
P7-1	4000.0	1277391	4038.1	1.0
P7-2	4000.0	1239593	3918.6	-2.0
P7-3	4000.0	1272055	4021.3	0.5
P8-1	8000.0	2553632	8073.5	0.9
P8-2	8000.0	2514021	7948.3	-0.6
P8-3	8000.0	2526117	7986.5	-0.2

ECUACIÓN DE LA RECTA

$$y = 316.2610 \quad x + \quad 283.4840$$

$$r^2 = 0.9998$$

INTERVALO DE CONFIANZA AL 95 % $gl = 22$ PARA LA PENDIENTE

Límite Superior = 317.6800

Límite Inferior = 314.8421

Donde el coeficiente de determinación (r^2) es mayor a 0.98, el error relativo por la regresión de los puntos no es mayor al 2.0% y el intervalo de confianza al 95% de la pendiente no incluye al cero para ambos compuestos.

PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL SISTEMA.

Los resultados de la precisión del sistema para estradiol y progesterona fueron obtenidos a partir de la preparación por sextuplicado de un punto de la curva (200 ng/mL para estradiol y 2000 ng/mL para progesterona) y se midió la respuesta analítica (áreas) obteniendo los cálculos descritos en la tabla No. 9 donde el coeficiente de variación de la respuesta no fue mayor al 2.0% para los dos activos, por lo que se concluye que el sistema es preciso.

Tabla No. 9. Resultados de los cálculos realizados para los datos evaluados en la precisión del sistema para estradiol y progesterona.

LECTURA No.	CONCENTRACIÓN DE ESTRADIOL ng/mL	RESPUESTA DE ESTRADIOL	CONCENTRACIÓN DE PROGESTERONA ng/mL	RESPUESTA DE PROGESTERONA
*P6-1	200.0	833740	2000.0	620072
*P6-2	200.0	833098	2000.0	620339
*P6-3	200.0	832842	2000.0	620675
*P6-4	200.0	831069	2000.0	620509
*P6-5	200.0	831980	2000.0	619411
*P6-6	200.0	831988	2000.0	625041
	n =	6	n =	6
	PROMEDIO =	832453	PROMEDIO =	621008
	D.E. =	957.0	D.E. =	2025
	C.V. (%) =	0.1	C.V. =	0.3

LINEALIDAD DEL MÉTODO.

La linealidad del método se evaluó, al determinar la relación que existe entre la concentración adicionada (ng/mL) de estradiol y/o progesterona (X) y la concentración cuantificada de estradiol y/o progesterona (Y) (ng/mL), preparando tres concentraciones de soluciones, cada una por triplicado a partir de pesadas independientes. En las tablas No. 10 y 11 se muestran los datos de los resultados obtenidos para la linealidad del método tanto para estradiol como progesterona respectivamente; con los que se realizó el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados, utilizando como variable independiente "X" a la concentración adicionada y como variable dependiente "Y" a la concentración cuantificada para estradiol o progesterona; también se presenta para cada tabla la ecuación de la recta y los resultados estadísticos, donde se observa que el coeficiente de determinación (r^2) es mayor a 0.98 lo cual indicó la asociación de estas dos variables.

En las tablas No. 12 y 13 se reportan los porcentajes cuantificados por nivel y global para estradiol y progesterona. El intervalo de confianza de la ordenada al origen, para el estradiol como progesterona, incluye el cero. El intervalo de confianza para la pendiente de estradiol y progesterona incluye la unidad y el coeficiente de variación para la regresión fue menor al 2.0%.

El promedio del porcentaje recuperado por nivel y global se encontró entre 98.0-102.0%. El coeficiente de variación global del porcentaje recuperado fue menor al 2.0%.

El análisis por mínimos cuadrados para estradiol y progesterona indican que hay una relación lineal entre la concentración adicionada (ng/mL) y la concentración recuperada (ng/mL).

Tabla No. 10. Resultados de la linealidad del método para estradiol donde se relaciona la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

ng/mL RECUPERADOS EN CADA NIVEL		
IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA	ng/mL ADICIONADOS	ng/mL RECUPERADOS
MA-A-D1-1	2.0	2.0
MA-A-D1-2	2.0	2.0
MA-A-D1-3	2.0	2.0
MB-A-D1-1	100.0	98.5
MB-A-D1-2	100.0	99.6
MB-A-D1-3	100.0	98.4
MC-A-D1-1	800.0	795.3
MC-A-D1-2	800.0	803.6
MC-A-D1-3	800.0	791.5

ECUACIÓN DE LA RECTA.

$$y = 0.9964x + -0.3744$$

$$r^2 = 0.9999$$

$$C.V. = 1.1$$

INTERVALO DE CONFIANZA 95 % $gl = 7$ PARA LA ORDENADA AL ORIGEN Y LA PENDIENTE
ORDENADA AL ORIGEN PENDIENTE

t Tablas	2.365	2.365
Límite Superior =	3.0708	1.0038
Límite Inferior =	-3.8197	0.9890

Tabla No. 11. Resultados de la linealidad del método para progesterona donde se relaciona la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

ng/mL RECUPERADOS EN CADA NIVEL		
IDENTIFICACIÓN MUESTRA	ng/mL ADICIONADOS	ng/mL RECUPERADOS
MA-AD1-1	20.0	20.3
MA-AD1-2	20.0	20.3
MA-AD1-3	20.0	20.1
MB-AD1-1	1000.0	1012.3
MB-AD1-2	1000.0	992.8
MB-AD1-3	1000.0	998.6
MC-AD1-1	8000.0	8038.6
MC-AD1-2	8000.0	7927.9
MC-AD1-3	8000.0	8045.3

ECUACIÓN DE LA RECTA.

$$y = 1.0004 x + 0.4691$$

$$r^2 = 0.9999$$

$$C.V. = 1.2$$

INTERVALO DE CONFIANZA 95 % $gI = 7$ PARA LA ORDENADA AL ORIGEN Y LA PENDIENTE

	<u>ORDENADA AL ORIGEN</u>	<u>PENDIENTE</u>
t Tablas	2.365	2.365
Límite Superior =	37.2927	1.0084
Límite Inferior =	-36.3545	0.9925

Tabla No. 12. Resultados de linealidad, exactitud y repetibilidad del método para estradiol.

	2 ng/mL	100 ng/mL	800 ng/mL
RÉPLICA	POR CIENTO RECUPERADO		
1	100.1	98.5	99.4
2	98.9	99.6	100.4
3	99.0	98.4	98.9
n =	3	3	3
PROMEDIO =	99.3	98.8	99.6
D. E. =	0.7	0.7	0.8
C.V. =	0.7	0.7	0.8
n =	9		
PROMEDIO =	99.3		
D. E. =	0.7		
C.V. =	0.7		

INTERVALO DE CONFIANZA AL 95%, $gI = 8$ PARA EL POR CIENTO RECUPERADO

Límite Superior =	99.8	%
Límite Inferior =	98.7	%

TABLA No. 13. Resultados de linealidad, exactitud y repetibilidad del método para progesterona.

	2 ng/mL	100 ng/mL	800 ng/mL
RÉPLICA	POR CIENTO RECUPERADO		
1	101.6	101.2	100.5
2	101.3	99.3	99.1
3	100.5	99.9	100.6
n =	3.0	3.0	3.0
PROMEDIO =	101.1	100.1	100.0
D. E. =	0.6	1.0	0.8
C.V. =	0.6	1.0	0.8
n =	9		
PROMEDIO =	100.4		
D. E. =	0.9		
C.V. =	0.9		

INTERVALO DE CONFIANZA AL 95%, $gI = 8$ PARA EL POR CIENTO RECUPERADO

Límite Superior =	101.1	%
Límite Inferior =	99.7	%

Los datos obtenidos para la linealidad del método, fueron empleados para realizar los cálculos de exactitud y repetibilidad del método, como se presenta en las tablas No. 12 y 13.

EXACTITUD DEL MÉTODO.

En la Tabla No. 12 y 13 se reportan los porcentajes recuperados en las tres replicas, para los tres niveles de concentración evaluados dentro del intervalo de concentración 2-800 ng/mL de estradiol y 20-8000 ng/mL de progesterona. También se observa que el porcentaje recuperado para los dos activos se encontró dentro del intervalo 98.0 y 102.0 %; por lo que se garantizó la cercanía de los resultados obtenidos del análisis con el método validado y el valor verdadero.

REPETIBILIDAD DEL MÉTODO.

En los resultados presentados en las tablas No. 12 y 13 para la repetibilidad se observa que el coeficiente de variación del porcentaje cuantificado por nivel de concentración y global, para estradiol y progesterona fue menor al 2.0%; el intervalo de confianza al 95% para el porcentaje cuantificado se encontró dentro del intervalo de 98.0 y 102.0% y el coeficiente de variación del porcentaje recuperado fue menor al 2.0%; lo cual indica que hay una concordancia entre los resultados para los tres niveles de concentración evaluados por un mismo analista.

PRECISIÓN INTERMEDIA.

Para la evaluación de la precisión intermedia dos analistas aplicaron el método analítico en dos días diferentes, analizando por día y por analista tres niveles de concentración; cada nivel por triplicado. En la tabla No. 14 y 15 incisos a, b y c se observan los resultados para estradiol y progesterona respectivamente, donde se muestran los porcentajes cuantificados por nivel de concentración, promedio y coeficiente de variación para el análisis cuantificado individual y global de los dos analistas en dos días. El coeficiente de variación del porcentaje cuantificado para los análisis individuales y global fue menor al 2.0% para los dos activos, por lo cual el método se considera reproducible entre días y analistas para estradiol y progesterona.

TABLA No. 14. Resultados para la reproducibilidad de estradiol en sus tres niveles de concentración, dos analistas en dos días.

a) NIVEL DE CONCENTRACIÓN 2 ng/mL para estradiol

NIVEL (ng/mL)	ANALISTA A		ANALISTA B	
	PORCIENTO CUANTIFICADO			
	DIA1	DIA2	DIA 1	DIA 2
2,0	100.1	99.9	100.2	99.9
2,0	101.4	101.0	100.4	99.3
2,0	99.7	98.6	100.2	101.3
n	3.0	3.0	3.0	3.0
PROMEDIO	100.4	99.8	100.3	100.2
D.E.	0.9	1.2	0.1	1.0
C.V.	0.9	1.2	0.1	1.0
n	12.0			
PROMEDIO	100.2			
D.E.	0.8			
C.V.	0.8			

b) NIVEL DE CONCENTRACIÓN 100 ng/mL para estradiol

NIVEL (ng/mL)	ANALISTA A		ANALISTA B	
	PORCIENTO CUANTIFICADO			
	DIA1	DIA2	DIA 1	DIA 2
100.0	100.7	100.4	100.8	100.4
100.0	99.6	99.1	100.4	100.3
100.0	99.6	98.8	100.1	98.0
n	3.0	3.0	3.0	3.0
PROMEDIO	100.0	99.4	100.5	99.5
D.E.	0.6	0.9	0.4	1.3
C.V.	0.6	0.9	0.4	1.3
n	12.0			
PROMEDIO	99.8			
D.E.	0.9			
C.V.	0.9			

c) NIVEL DE CONCENTRACIÓN 800 ng/mL para estradiol

NIVEL (ng/mL)	ANALISTA A		ANALISTA B	
	PORCIENTO CUANTIFICADO			
	DIA1	DIA2	DIA 1	DIA 2
800.0	100.6	100.5	100.5	100.1
800.0	100.6	100.9	100.2	99.7
800.0	99.7	100.9	100.3	100.7
n	3.0	3.0	3.0	3.0
PROMEDIO	100.3	100.8	100.4	100.2
D.E.	0.5	0.2	0.2	0.5
C.V.	0.5	0.2	0.2	0.5
n	12.0			
PROMEDIO	100.4			
D.E.	0.4			
C.V.	0.4			

TABLA No. 15. Resultados de reproducibilidad para progesterona en sus tres niveles de concentración, dos analistas en dos días.

a) NIVEL DE CONCENTRACIÓN 20 ng/mL para progesterona

NIVEL (ng/mL)	ANALISTA A		ANALISTA B	
	PORCIENTO CUANTIFICADO			
	DIA1	DIA2	DIA 1	DIA 2
20.0	100.1	100.9	101.0	99.2
20.0	100.1	99.5	99.6	100.5
20.0	101.3	99.7	99.8	101.7
n	3.0	3.0	3.0	3.0
PROMEDIO	100.5	100.0	100.1	100.5
D.E.	0.7	0.8	0.8	1.2
C.V.	0.7	0.8	0.8	1.2
n	12.0			
PROMEDIO	100.3			
D.E.	0.8			
C.V.	0.8			

b) NIVEL DE CONCENTRACIÓN 1000 ng/mL para progesterona

NIVEL (ng/mL)	ANALISTA A		ANALISTA B	
	PORCIENTO CUANTIFICADO			
	DIA1	DIA2	DIA 1	DIA 2
1000.0	100.1	98.9	99.9	100.8
1000.0	100.6	98.4	100.6	99.3
1000.0	98.9	99.9	99.5	99.6
n	3.0	3.0	3.0	3.0
PROMEDIO	99.9	99.0	100.0	99.9
D.E.	0.9	0.7	0.6	0.8
C.V.	0.9	0.7	0.6	0.8
n	12.0			
PROMEDIO	99.7			
D.E.	0.8			
C.V.	0.8			

c) NIVEL DE CONCENTRACIÓN 8000 ng/mL para progesterona

NIVEL (ng/mL)	ANALISTA A		ANALISTA B	
	PORCIENTO CUANTIFICADO			
	DIA1	DIA2	DIA 1	DIA 2
8000.0	100.3	99.3	100.1	100.0
8000.0	99.6	100.3	100.9	100.6
8000.0	100.6	101.1	99.8	100.6
n	3.0	3.0	3.0	3.0
PROMEDIO	100.2	100.2	100.3	100.4
D.E.	0.5	0.9	0.6	0.4
C.V.	05	0.9	0.6	0.4
n	12.0			
PROMEDIO	100.3			
D.E.	0.5			
C.V.	0.5			

ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA

Para la evaluación de estabilidad de la muestra se prepararon muestras de estradiol y progesterona de manera independiente como se indicó en la prueba de linealidad del método; se almacenaron en condiciones de temperatura ambiente y refrigeración para ser analizadas a 24h, 48h y 72h de su preparación.

Se obtuvo el promedio del porcentaje cuantificado para las condiciones de estabilidad seleccionadas, la diferencia absoluta del promedio para el porcentaje cuantificado, en las condiciones de almacenamiento probadas, respecto al promedio del porcentaje cuantificado en el análisis inicial; el cual, no fue mayor al 2.0% para los tres niveles de concentración, por lo tanto las muestras fueron estables a temperatura ambiente y en refrigeración de 2-8°C hasta 72 horas para estradiol y progesterona.

ESPECIFICIDAD.

La especificidad se evaluó al inyectar las soluciones que contenían vehículo y colesterol con el método propuesto. En las figuras 12, 13 y 14 se muestran los cromatogramas correspondientes a la especificidad, donde se observa que el colesterol y vehículo que puede estar presente en la formulación para dispersar las microesferas, no interfirieron en la cuantificación de estradiol y progesterona, al no presentar señal alguna que interfiera con las señales cromatográficas para los dos activos de interés.

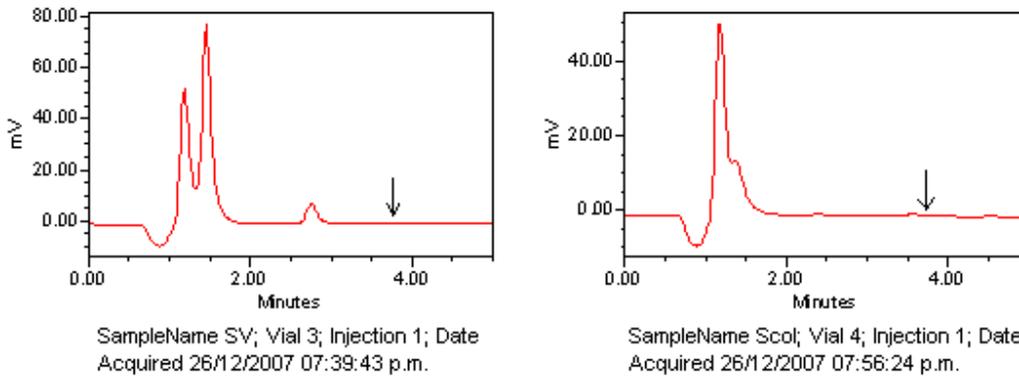


FIGURA No. 12 Cromatogramas correspondientes a la especificidad para la detección de estradiol con las soluciones vehículo (SV) y colesterol (Scol). La flecha indica el tiempo de retención de estradiol.

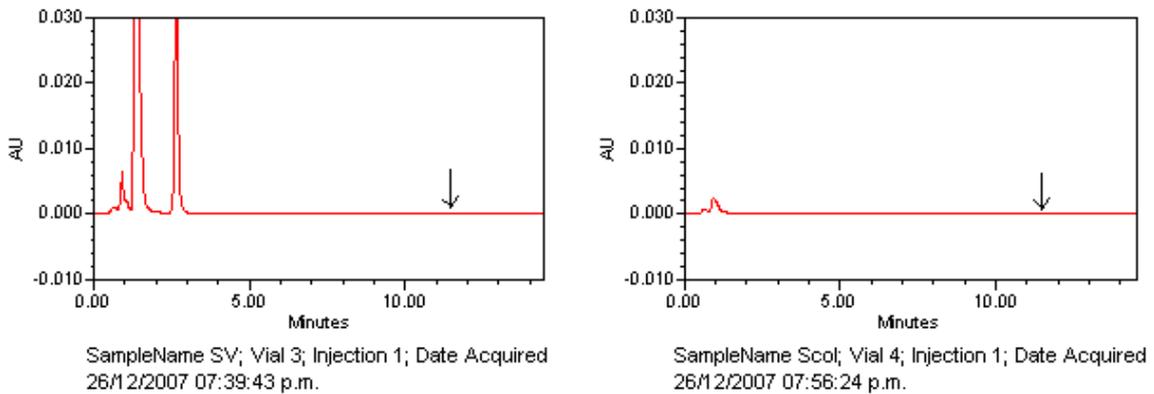


FIGURA No. 13. Cromatogramas correspondientes a la especificidad para la detección de progesterona con las soluciones vehículo (SV) y colesterol (Scol). La flecha indica el tiempo de retención de progesterona

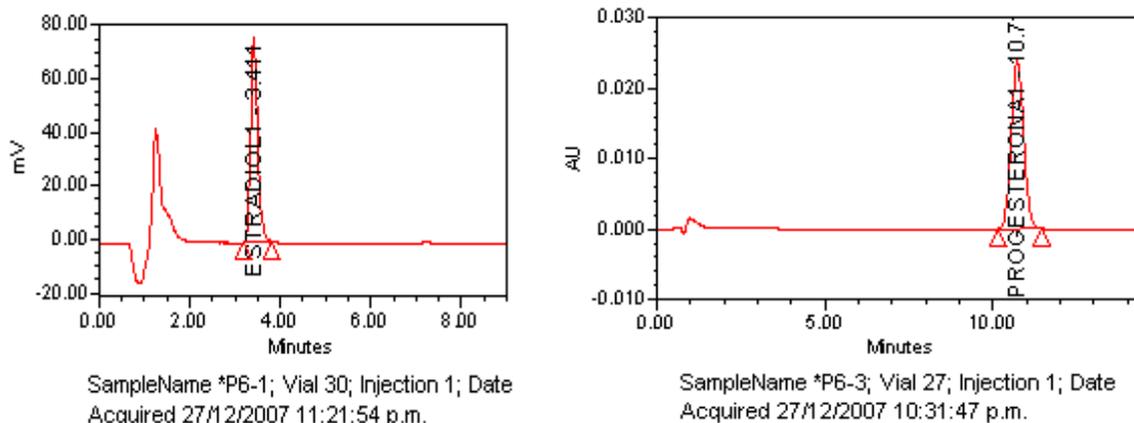


FIGURA No. 14. Cromatogramas típicos de estradiol y progesterona.

ROBUSTEZ

Para la determinación de la robustez se evaluó la condición normal o inicial de operación con el método analítico analizando tres niveles de concentración y tres replicas y se modificaron las condiciones de temperatura de la columna, flujo y fase móvil; obteniendo la diferencia absoluta de la media aritmética para cada condición respecto a la condición normal. El método fue robusto al cambio de flujo a 0.68 mL/min para estradiol y progesterona donde las concentraciones probadas cuantificaron dentro del intervalo de 98.0-102.0%, el coeficiente de variación para cada nivel de concentración fue menor al 2.0% y la diferencia absoluta de la media aritmética de la condición de prueba respecto a la condición normal no fue mayor al 2.0%. También fue robusto para en cambio de flujo a 0.62 mL/min sólo para progesterona cumpliendo con los mismos criterios de aceptación que la condición de flujo 0.68 mL/min.

En las condiciones donde se evaluó cambio de fase móvil, y temperatura de la columna, el método no fue robusto, ya que no cumple con el porcentaje cuantificado dentro del 98.0-102.0% por tanto la diferencia absoluta de la condición de prueba respecto a la condición original no fue menor o igual a 2.0%.

8.2. Resultados tomados de evaluaciones experimentales previas al desarrollo del método de disolución acelerada, que sirvieron de base para el desarrollo del método.

8.2.1. Evaluación del medio de disolución y velocidad de flujo.

A) Selección del medio de disolución.

Para la selección del medio de disolución se realizó un perfil de disolución de 8h en el aparato IV de USP con un sistema abierto; empleando una muestra de microesferas de estradiol: colesterol (1:1) [ME E₂: Col (1:1)] del lote ME 2005142; en cada celda se evaluaron los siguientes medios de disolución:

- a) Celda 1: Lauril sulfato de sodio (25g) + Tween 60 (240g) en 20L a una velocidad de flujo de 32 mL/min.
- b) Celda 2: Tween 80 al 1.2% (360g) en 30L a una velocidad de flujo de 32 mL/min.
- c) Celda 3: Tween 80 al 2.4% (720g) en 30L a una velocidad de flujo de 16 mL/min.
- d) Celda 4: Tween 80 al 2.4% (720g) en 30L a una velocidad de flujo de 32 mL/min.
- e) Celda 5: Tween 60 al 1.2% flujo de 16 mL/min.
- f) Celda 6: Tween 60 al 2.4% flujo de 32 mL/min.
- g) Celda 7: Tween 80 al 1.2% flujo de 16 mL/min.

Estos tensoactivos se seleccionaron ya que estudios reportados indican que para compuestos con baja solubilidad se recomienda el empleo de tensoactivos, los cuales pueden mejorar la solubilidad ya que modifican el estado interfacial sólido líquido y comúnmente son aceptables surfactantes iónicos o no iónicos, incluyendo el Lauril sulfato de sodio y Tween entre muchos otros tensoactivos. ⁽³⁾

De acuerdo a los resultados presentados en la gráfica No. 1 y en la tabla No 16 el medio de disolución seleccionado Tween 60 en sus diferentes concentraciones evaluadas, presentó un incremento significativo en la velocidad de disolución, alcanzando porcentajes disueltos más altos respecto a Tween 80 y a Lauril sulfato de sodio + Tween 60 en sus diversas concentraciones evaluadas.

Por lo tanto se decidió tomar al Tween 60 como medio de disolución ya que provee el más alto porcentaje de fármaco disuelto, lo cual permite tener en menor tiempo un perfil de disolución.

B) Selección de la velocidad de flujo.

La evaluación de la velocidad de flujo fue determinada en una bomba con la capacidad de modificar la velocidad de flujo de 16 mL/min y 32mL/min; ya que al modificar la velocidad de flujo, cambia la agitación hidrodinámica de las

microesferas en el medio de disolución, de acuerdo al tamaño y forma de la microesfera, la velocidad de flujo fue optimizada. (20)

Como se observa en la gráfica No. 1 no hay impacto cambiando la velocidad de flujo de 16 a 32 mL/min cuando se emplea Tween 80 en sus diferentes concentraciones; sin embargo al emplear Tween 60 hay un evidente incremento en la velocidad de disolución que se presenta por el aumento en la concentración de Tween 60 y por el aumento de la velocidad de flujo de 16 a 32 mL/min.

Se escogió una velocidad de flujo de 16 mL/min debido a que es el flujo mayormente utilizado en los métodos de disolución que utilizan el aparato IV de disolución y además se requería un medio de disolución que tuviera una velocidad de disolución alta, pero que permitiera al mismo tiempo tener la capacidad discriminativa entre formulaciones; en el caso del medio de disolución probado en la celda 6: Tween 60 al 2.4%p/v a flujo de 32 mL/min, el porcentaje disuelto es muy alto y existía la posibilidad de tener problemas de discriminación entre formulaciones.

Gráfica No. 1: Medio de disolución y velocidad de flujo.

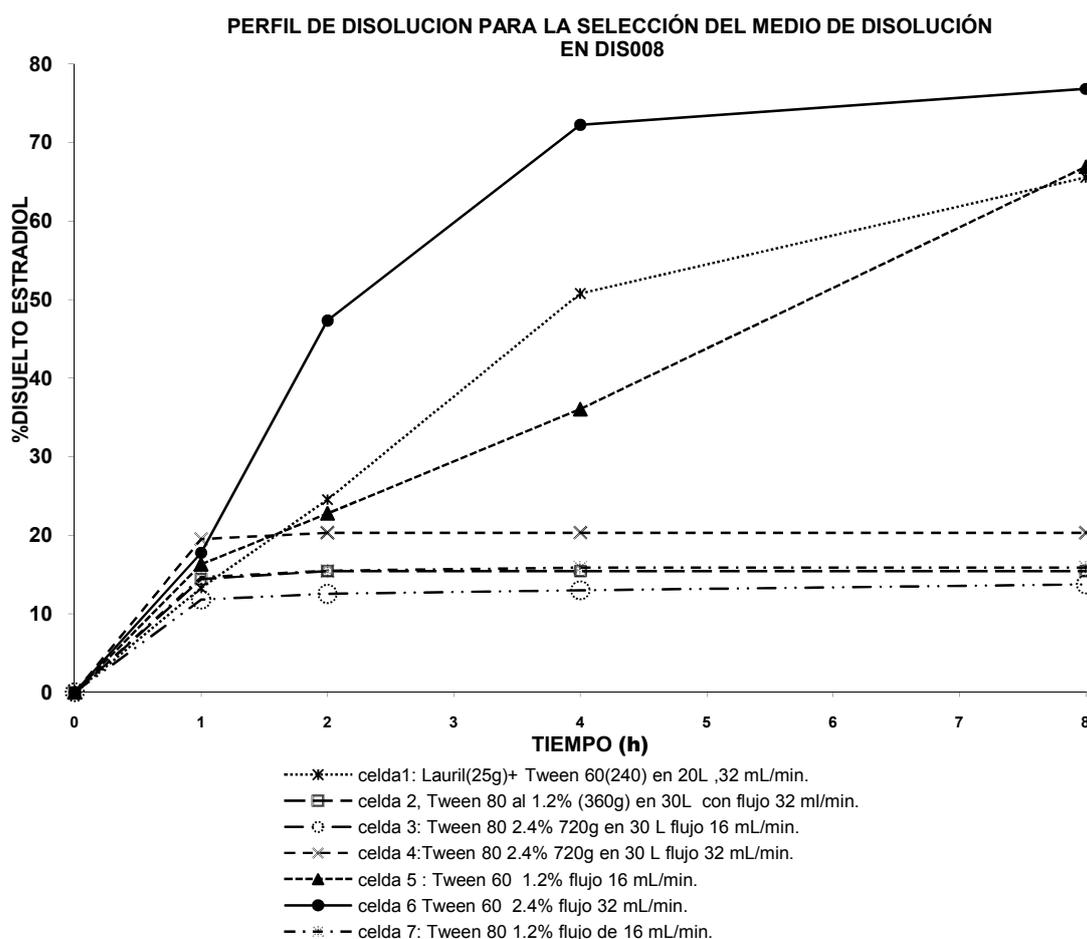


Tabla No. 16. Resultados de los porcentajes disueltos para cada tensoactivo evaluado en las celdas de acuerdo a la gráfica No. 1.

TIEMPO (h)	C E L D A (% DISUELTO)						
	1	2	3	4	5	6	7
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	13,3	14,4	11,8	19,5	16,3	17,8	14,6
2	24,5	15,4	12,5	20,3	22,8	47,3	15,5
4	50,8	15,4	13,0	20,3	36,0	72,2	15,9
8	65,6	15,4	13,7	20,3	66,9	76,8	15,9

8.3. Resultados del desarrollo del método de disolución acelerado.

8.3.1. Evaluación de la concentración de Tween 60 en el medio de disolución.

Para la determinación de la concentración apropiada de Tween 60 en el medio de disolución, se emplearon microesferas de estradiol: colesterol ME E₂: Col (1:1) lote ME2004134, usando el aparato IV de la USP en un sistema abierto, a una velocidad de flujo de 16 mL/min, con 6 celdas para cada determinación; realizando cambios en la concentración de Tween 60 de 1.4% p/v, 0.8% p/v, 0.4% p/v y 0.5% p/v.

En el desarrollo del método de disolución se sugiere el empleo de tensoactivos en la disolución de fármacos de baja solubilidad como es el caso del estradiol, dependiendo de la concentración seleccionada, los tensoactivos pueden funcionar como agentes humectantes y alcanzar la máxima solubilidad en el valor de concentración crítica micelar; la evaluación de la concentración del tensoactivo puede realizarse de manera gradual incrementando la concentración del medio de disolución. (14 y 24)

Como se observa en la gráfica No. 2 y tabla No. 17, hay un incremento en la velocidad de disolución conforme aumenta la concentración de Tween 60, sin embargo para concentraciones de 0.8% p/v y 1.4% p/v en 4h ya existe un 85% disuelto de estradiol; por lo tanto se consideró que un porcentaje disuelto tan alto no permitiría discriminar entre lotes, debido a la rapidez con que se disuelve el material analizado y a que fueron muy cercanos los porcentajes disueltos a estas dos concentraciones. Para la concentración de Tween 60 al 0.4% p/v, el porcentaje disuelto de estradiol no alcanza el 80% disuelto en 24h; sin embargo a concentración de 0.5% p/v, en 24h se logró disolver aproximadamente 89.5% por lo cual esta concentración fue la seleccionada.

Gráfica No. 2: Evaluación del efecto de la concentración de Tween 60 sobre la disolución de microesferas de estradiol.

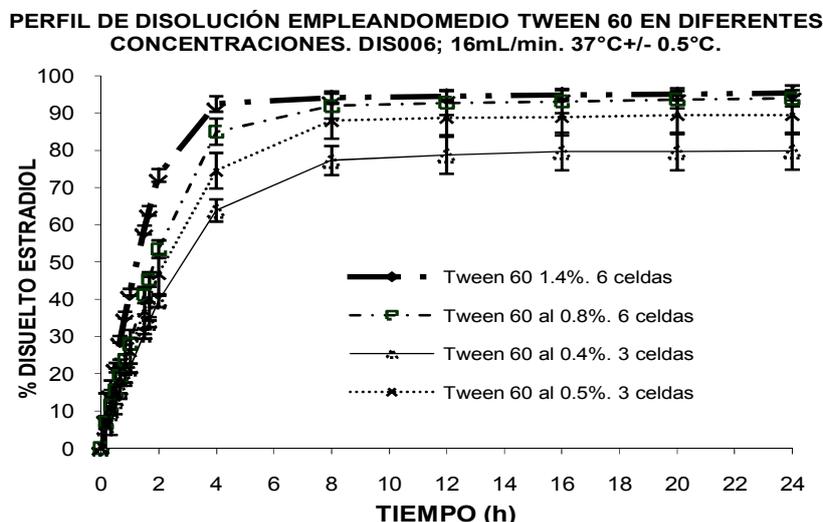


Tabla No. 17. Tabla de porcentajes disueltos a diferentes concentraciones de Tween 60.

TIEMPO (h)		% DISUELTO DE ESTRADIOL															
		0	0,166	0,333	0,500	0,660	0,833	1,00	1,5	1,66	2,0	4,0	8,0	12,0	16,0	20,0	24,0
% TWEEN 60	1,4%	0,0	8,3	15,1	22,2	29,2	35,7	41,8	58,6	63,7	73,3	92,4	94,1	94,5	94,9	94,9	95,4
	0,8%	0,0	6,9	11,4	15,5	19,4	23,6	28,1	41,1	45,3	53,4	85,0	91,9	92,7	93,1	93,6	93,8
	0,4%	0,0	5,5	9,5	12,7	15,8	18,7	21,5	30,6	33,7	39,5	63,8	77,2	78,7	79,6	79,6	79,8
	0,5%	0,0	6,2	10,8	14,7	18,5	22,3	26,0	36,8	40,1	46,8	74,5	87,9	88,8	88,9	89,5	89,5

8.3.2. Evaluación de la robustez del método a cambios en la concentración de Tween 60.

Con el medio de disolución y la concentración del medio, el aparato de disolución y velocidad de flujo seleccionados como adecuados durante el desarrollo del método, se determinó la robustez en la preparación de los medios de disolución sobre la disolución de las microesferas de estradiol.

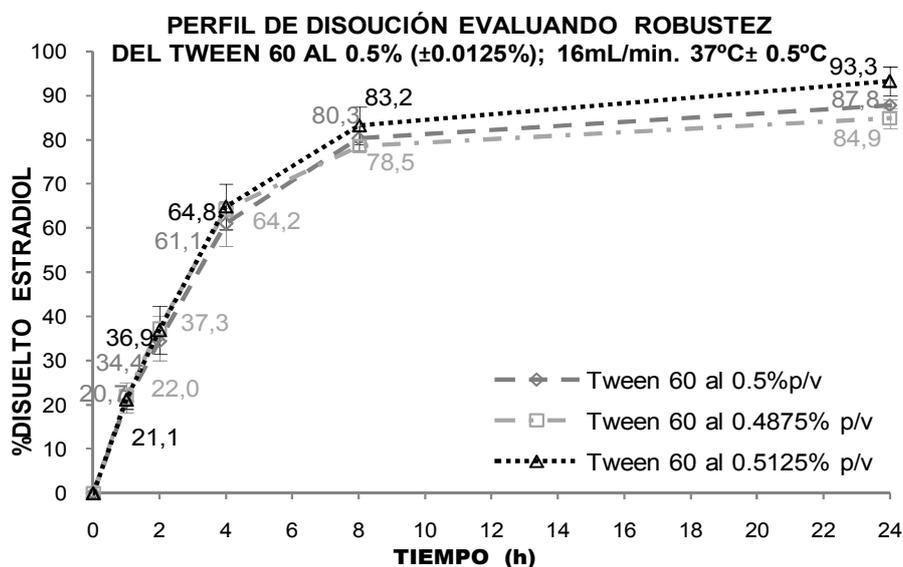
Esta determinación se hizo realizando variaciones intencionales en la concentración de tensoactivo respecto a la concentración ya seleccionada, para esto se tomó una variación de $\pm 0.0125\%$ respecto a la concentración de 0.5% p/v de Tween 60, inicialmente seleccionada.

La evaluación de la robustez se evaluó realizando perfiles de disolución con una duración de 24h en un sistema abierto, empleando microesferas de estradiol: colesterol (1:1) E₂:Col (1:1) del lote ME2005038. Cabe destacar que los perfiles en

los en los que se evaluó la concentración de 0.4875% p/v y 0.5125% p/v se realizaron en disolutor DIS010 y el perfil realizado con Tween 60 al 0.5% se realizó en DIS006; cada prueba comprendió 3 celdas. El motivo por el cual las evaluaciones de robustez no se realizaron en un solo equipo, fue debido a la disponibilidad de los demás equipos de disolución para trabajar.

Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica No. 3 y fueron comparados mediante el cálculo del factor de similitud, obteniendo que los perfiles en el intervalo de concentraciones (0.4875-0.5125%) para el medio de disolución Tween 60 son similares. Para la concentración de 0.4875% de Tween 60 se obtuvo un valor similitud de 78.5 y para la concentración de 0.5125% un valor de similitud de 72.2. Demostrándose así la robustez del método desarrollado a los cambios en la concentración en el medio de disolución.

Gráfica No. 3: Robustez en la concentración de Tween 60



En la tabla No. 18 se muestran los resultados de los porcentajes disueltos y coeficientes de variación por tiempo de muestreo para la concentración de Tween 60 evaluada correspondiente a la gráfica No. 3.

Tabla No. 18. Porcentajes disueltos obtenidos en la prueba de robustez del método a los cambios de concentración del medio de disolución.

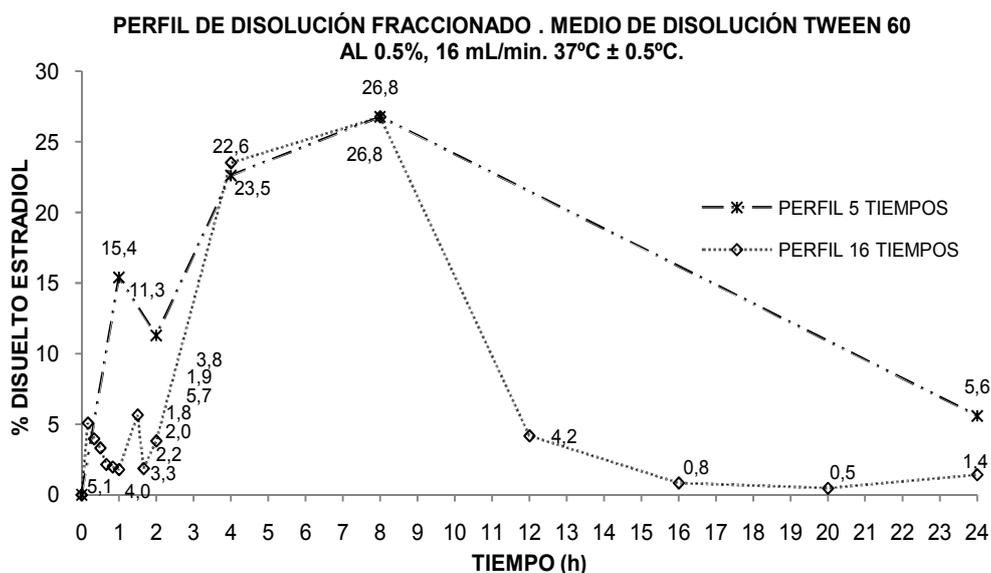
TWEEN 60 AL 0,5% p/v			TWEEN 60 AL 0,4875% p/v			TWEEN 60 AL 0,5125% p/v		
TIEMPO (h)	% DISUELTO	%C.V.	TIEMPO (h)	% DISUELTO	%C.V.	TIEMPO (h)	% DISUELTO	%C.V.
0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0	0,0	0,0
1,00	22,0	3,1	1,00	22,0	3,1	1,00	21,1	2,1
2,0	37,3	2,7	2,0	37,3	2,7	2,0	36,9	5,4
4,0	64,2	1,7	4,0	64,2	1,7	4,0	64,8	5,2
8,0	78,5	0,9	8,0	78,5	0,9	8,0	83,2	4,3
24,0	84,9	2,3	24,0	84,9	2,3	24,0	93,3	3,2

8.3.3. Selección de los tiempos de muestreo.

La selección de los tiempos de muestreo, se realizó debido a que los perfiles que se realizaron al inicio del desarrollo del método de disolución con Tween 60 al 0.5%, contemplaban 16 tiempos de muestreo, lo cual implicaba mayor tiempo en la cuantificación de muestras obtenidas en los perfiles de disolución y a que se recomienda emplear como mínimo 5 tiempos de muestreo que permitan caracterizar la fase ascendente y meseta del perfil de disolución. (2)

El perfil se obtuvo de graficar los porcentajes disueltos fraccionados de la disolución evaluado en Tween 60 al 0.5% en ME E₂:Col + P₄ en aparato IV de USP con 16 tiempos de muestreo; resultando así el tiempo al cual se presentaban los principales picos de liberación de estradiol a partir de las microesferas y que sirvieron para caracterizar gráficamente un perfil de disolución acumulado que evidenciaba la parte ascendente y meseta en la curva de disolución.

Gráfica No. 4: Evaluación de los tiempos de muestreo.



En la gráfica No. 4 se observa el perfil de disolución fraccionado, donde se compara el perfil de disolución que consistía en 16 tiempos de muestreo respecto a un perfil con 5 tiempos de muestreo.

El análisis sólo se enfocó en seleccionar los tiempos de muestreo para los resultados de estradiol; debido a que era el activo de la formulación que presentaba menor velocidad de disolución respecto a progesterona; por lo tanto se requería evidenciar esos cambios significativos en el fármaco con velocidad de disolución menor y emplearlo para los dos activos; ya que para progesterona no presentaba gran diferencia respecto al perfil de disolución obtenido con Tween 80 al 0.3% como medio de disolución, porque la progesterona es más soluble que el estradiol.

En la gráfica No. 5 y tabla No. 19 se observan los datos de la comparación entre los tiempos de muestreo de un mismo perfil de disolución para los datos fraccionados y acumulados.

Gráfica No. 5: Evaluación de la comparación entre los tiempos de muestreo para un perfil de disolución acumulado y uno fraccionado para microesferas de E₂: Col (1:1) + P₄.

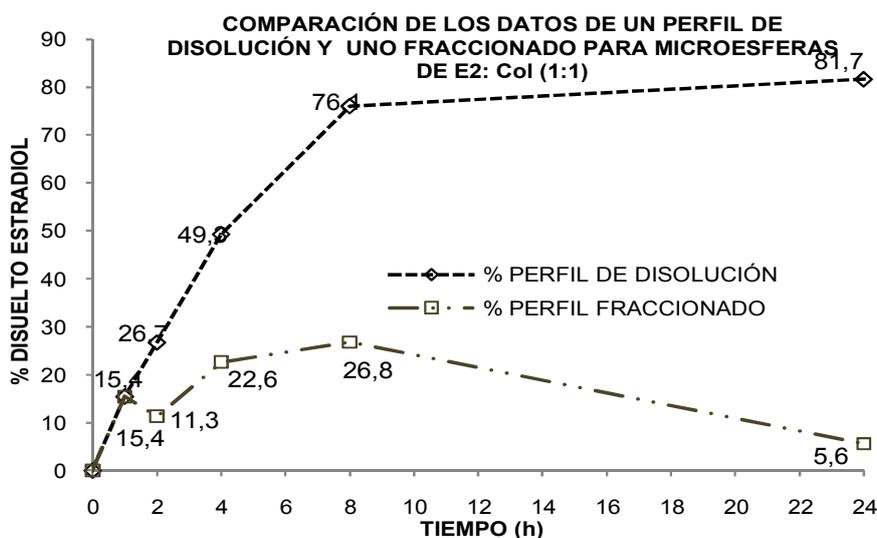


Tabla No. 19: Resultados de perfiles de disolución de microesferas de estradiol: colesterol + progesterona para selección de tiempos de muestreo.

PORCENTAJE DISUELTOS ACUMULADOS DE ESTRADIOL EN UNA MEZCLA DE ESTRADIOL:COLESTEROL+PROGESTERONA			
TIEMPO (h)	C E L D A		
	1	2	3
0	0.0	0.0	0.0
0.166			5.1
0.333			9.1
0.500			12.4
0.660			14.5
0.833			16.5
1.00	15.4	13.6	18.3
1.5			24.0
1.66			25.8
2.0	26.7	25.3	29.7
4.0	49.3	47.7	53.2
8.0	76.1	75.7	79.9
12.0			84.1
16.0			84.9
20.0			85.4
24.0	81.7	81.5	86.8

8.3.4. Evaluación del efecto de la forma farmacéutica de microesferas en la disolución.

La determinación del efecto de la forma farmacéutica (microesferas) se determinó para contrastar una muestra de materia prima de estradiol respecto a una muestra de microesferas de E₂: Col (1:1); con lo cual se podía evidenciar que la combinación de E₂: Col (1:1) y el proceso de fabricación que se sigue para obtener la microesfera es el que provoca el control de la liberación de principio activo.

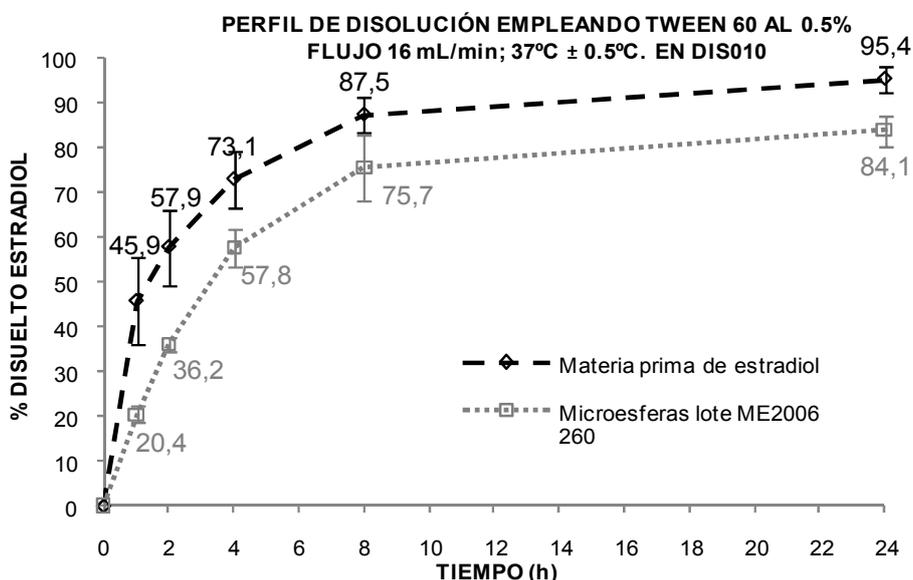
La prueba se realizó empleando el medio de disolución Tween 60 al 0.5%, flujo de 16 mL/min en un sistema abierto, con una duración de 24h. El material empleado fue una materia prima de Estradiol USP que se micronizó a un tamaño de partícula entre 33-63 micras, mismo tamaño al que se encuentran las microesferas de E₂: Col (1:1) de la formulación con la que se comparó. El número de celdas evaluadas con la materia prima fueron 6 y para las microesferas se emplearon 3 celdas. La comparación se realizó en disolutor DIS010.

En la gráfica No. 6 se muestra el control en la velocidad de disolución desde los primeros tiempos de muestreo en las microesferas de E₂: Col (1:1) respecto a la materia prima de E₂ y en la tabla No. 20 se muestran los porcentajes disueltos de cada prueba evaluada.

Tabla No. 20. Resultados de los porcentajes disueltos para la comparación de la materia prima de estradiol respecto a microesferas de E₂: Col (1:1).

ME E ₂ :Col (1:1) lote ME 2006 260			Materia prima de estradiol		
Tiempo(h)	%Promedio	%C.V.	Tiempo(h)	%Promedio	%C.V.
0,0	0,0	0,0	0	0,0	0,0
1,0	20,4	1,9	1,0	45,9	9,5
2,0	36,2	1,6	2,0	57,9	8,4
4,0	57,8	4,2	4,0	73,1	6,3
8,0	75,7	7,2	8,0	87,5	4,1
24,0	84,1	3,4	24,0	95,4	3,1

Gráfica No. 6: Evaluación del efecto de la forma farmacéutica microesferas en la disolución.



8.3.5. Evaluación de la reproducibilidad intraequipo.

La prueba se realizó para demostrar que las condiciones seleccionadas para el método desarrollado permitían obtener resultados reproducibles en un mismo equipo y que las variaciones obtenidas en los resultados podían ser atribuidas al material que se estaba probando en la disolución.

Para esta determinación se realizaron perfiles de disolución en cada uno de los equipos de disolución celdas de flujo continuo con los que se trabajó; bajo las condiciones que se establecieron como adecuadas durante este desarrollo.

Para la prueba se empleo microesferas de E₂: Col (1:1) del lote ME2005038 que fue evaluada por el mismo analista en el DIS006 y DIS007 (Claves del disolutor); para el DIS010 se empleo microesferas de E₂: Col (1:1) del lote ME2006260.

Con los perfiles de disolución obtenidos en cada equipo se realizó la comparación de estos por medio del cálculo del factor de similitud o el método series de tiempo, obteniendo lo siguiente:

Resultados de reproducibilidad intraequipo en el DIS 006.

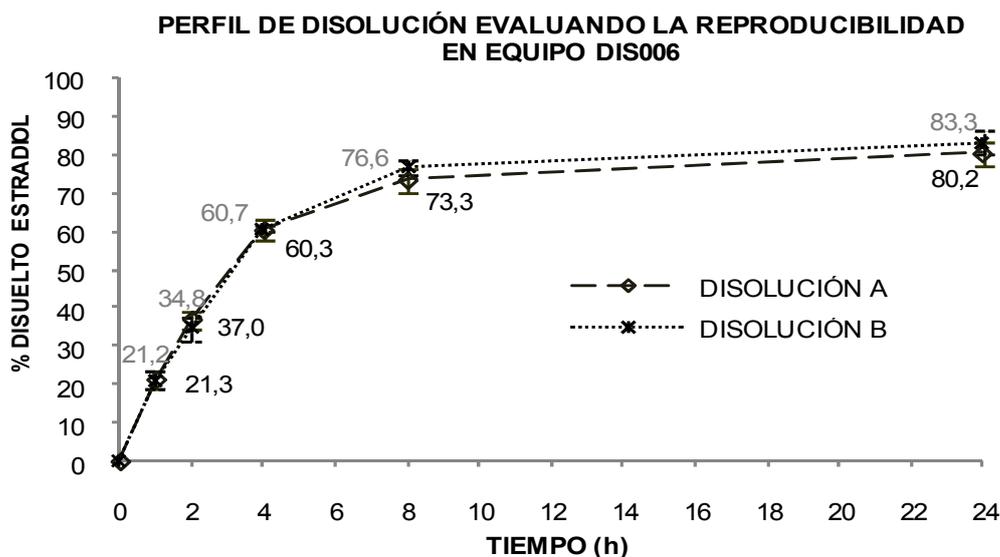
Se realizaron dos perfiles de disolución para estradiol; consistentes cada uno de 3 celdas. Los resultados de disolución obtenidos para se muestran en la gráfica No. 7 y tabla No. 21.

Para realizar la evaluación de la reproducibilidad entre los perfiles obtenidos en el equipo DIS006; se realizó el cálculo del factor de similitud. El valor del factor de similitud para los datos del perfil de disolución de microesferas de estradiol fue 80.4 indicando que son similares los perfiles; además se observó que existe baja variabilidad en los resultados.

Tabla No. 21. Resultados de los porcentajes disueltos de la reproducibilidad en DIS006 para estradiol.

TIEMPO	DISOLUCIÓN A		DISOLUCIÓN B	
	% DISUELTO	C.V. (%)	% DISUELTO	C.V. (%)
0	0,0	0,0	0,0	0,0
1,0	21,3	2,2	21,2	2,2
2,0	37,0	2,2	34,8	3,1
4,0	60,3	2,9	60,7	0,9
8,0	73,3	3,1	76,6	1,8
24,0	80,2	3,1	83,3	3,0

Gráfica No. 7: Reproducibilidad en equipo DIS006 para estradiol



Resultados de reproducibilidad intraequipo DIS 007.

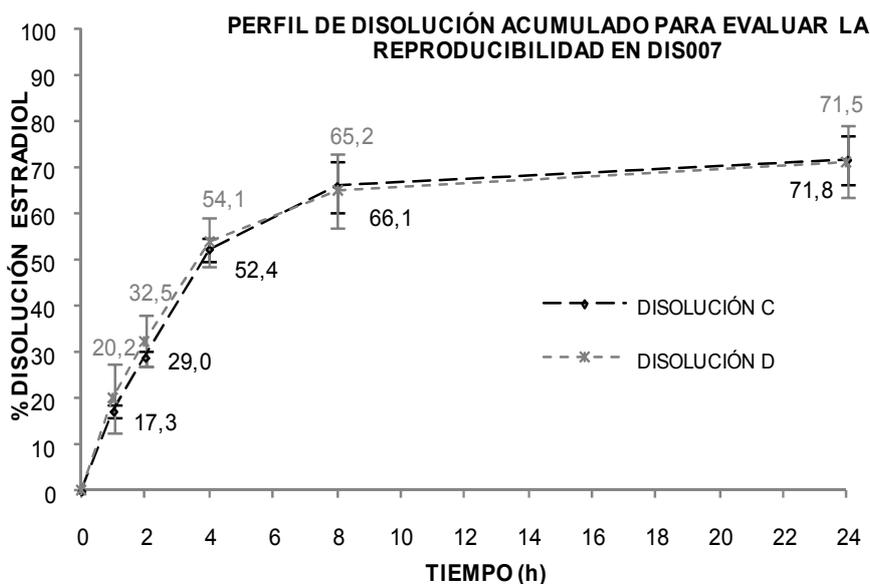
Se realizaron dos perfiles de disolución consistentes cada uno de 3 celdas. Los perfiles de disolución obtenidos se muestran en la gráfica No. 8 y en la tabla No. 22, donde se presentan los resultados numéricos de los perfiles de disolución. Para realizar la evaluación de la reproducibilidad entre los perfiles obtenidos en el equipo DIS007, se realizó la comparación de los datos por el método series de tiempo debido a que en los últimos tres tiempos de muestreo, los porcentajes disueltos presentaban coeficientes de variación mayores al 10%; motivo por el cual no era válido realizar la comparación por medio del factor de similitud.

Los datos de la comparación de los perfiles indicaron que son similares los perfiles de disolución con un valor establecido de Q del 70% en un intervalo de confianza del 95% (límite inferior de 86.70% y límite superior de 115.40%) obteniendo un resultado inferior de 99.52 % y superior de 114.35%.

Tabla No. 22. Resultados de los porcentajes disueltos de la reproducibilidad en DIS007

DISOLUCIÓN C			DISOLUCIÓN D		
TIEMPO (h)	% DISUELTO	C.V.	TIEMPO (h)	% DISUELTO	C.V.
0	0,0	0,0	0	0,0	0,0
1,0	17,3	7,6	1,0	20,2	4,3
2,0	29,0	5,4	2,0	32,5	5,5
4,0	52,4	5,2	4,0	54,1	12,2
8,0	66,1	8,2	8,0	65,2	17,2
24,0	71,8	7,6	24,0	71,5	16,5

Gráfica No. 8: Reproducibilidad en equipo DIS007.



Resultados de reproducibilidad intraequipo DIS 010.

La evaluación del DIS010 se realizó con dos perfiles de disolución consistentes cada uno de 3 celdas con microesferas de E₂: Col (1:1) del lote ME2006260.

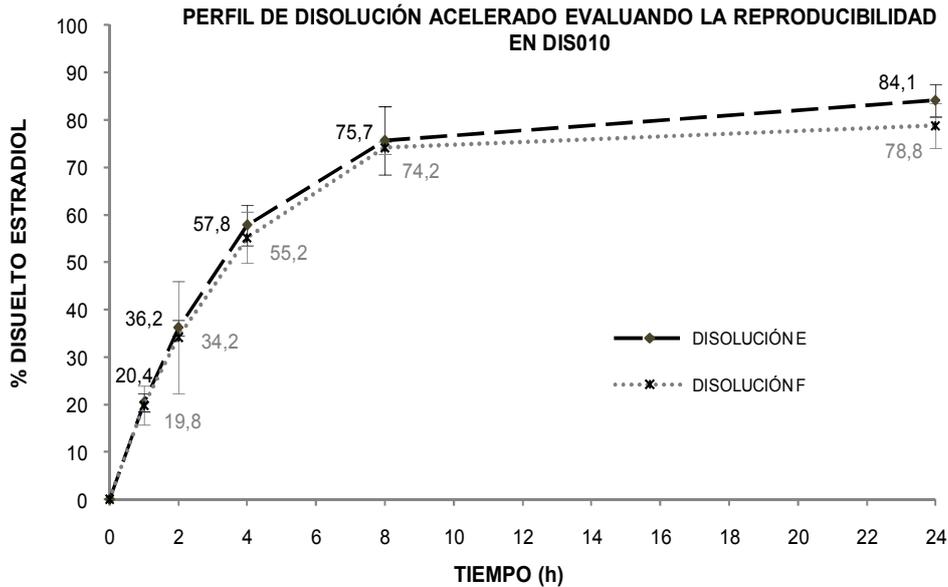
La gráfica No. 9 y en la tabla No. 23 se muestra el comportamiento de los perfiles de disolución y los resultados numéricos.

Para realizar la evaluación de la reproducibilidad entre los perfiles obtenidos en equipo DIS010, se utilizó el método series de tiempo el cual indicó que los perfiles son similares con un valor de Q del 70% en un intervalo de confianza del 95% (límite inferior de 86.70% y límite superior de 115.40%) obteniendo un resultado inferior de 93,59% y superior de 98,05%; por lo tanto estos resultados permitieron calcular la variabilidad presente en este equipo así como en los otros dos equipos evaluados. (47 y 48)

Tabla No. 23. Resultados de los porcentajes disueltos de la reproducibilidad en DIS010.

TIEMPO (h)	DISOLUCIÓN E		DISOLUCIÓN F	
	% DISUELTO	% C.V.	% DISUELTO	% C.V.
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1,0	20,4	1,9	19,8	4,1
2,0	36,2	1,6	34,2	11,8
4,0	57,8	4,2	55,2	5,4
8,0	75,7	7,2	74,2	1,3
24,0	84,1	3,4	78,8	4,7

Gráfica No. 9: Reproducibilidad en equipo DIS010.

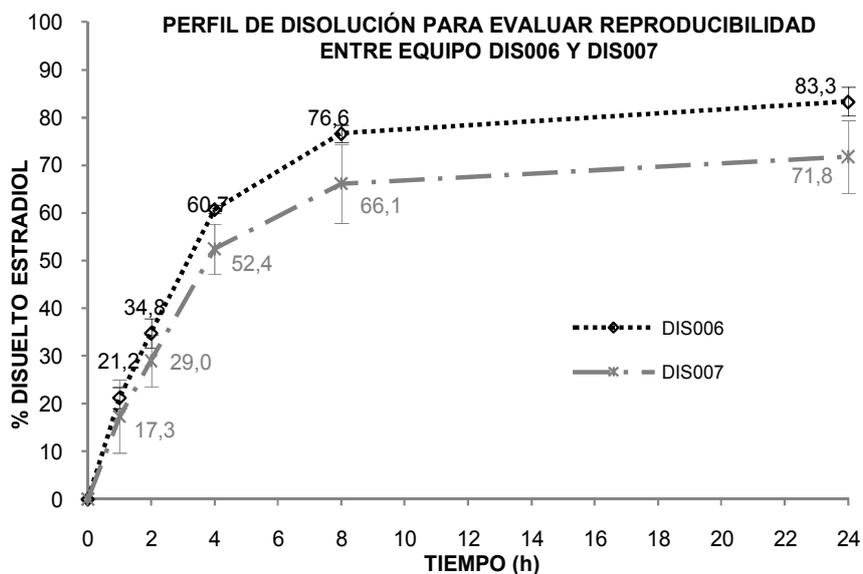


8.3.6. Evaluación de la reproducibilidad interequipo.

Se determinó la reproducibilidad entre los equipos DIS006 y DIS007, para identificar si existía diferencia en los datos obtenidos entre estos disolutores.

Para la comparación de los perfiles de disolución obtenidos en los equipos DIS006 y DIS007 se tomaron los resultados de la evaluación de reproducibilidad intra equipo, haciendo dos comparaciones con los datos de cada perfil evaluado; donde la primera comparación fue entre la disolución B (DIS006) y disolución C (DIS007), y la segunda comparación fue entre la disolución A (DIS006) y disolución D (DIS007) donde se evaluaron microesferas de E₂: Col (1:1) lote ME2005038. Los resultados de los perfiles de disolución comparados se muestran en las gráficas No. 10, 11 y los datos para las comparaciones fueron tomados de las tablas No. 21 y 22 (disolución A y B) (disolución C y D) respectivamente.

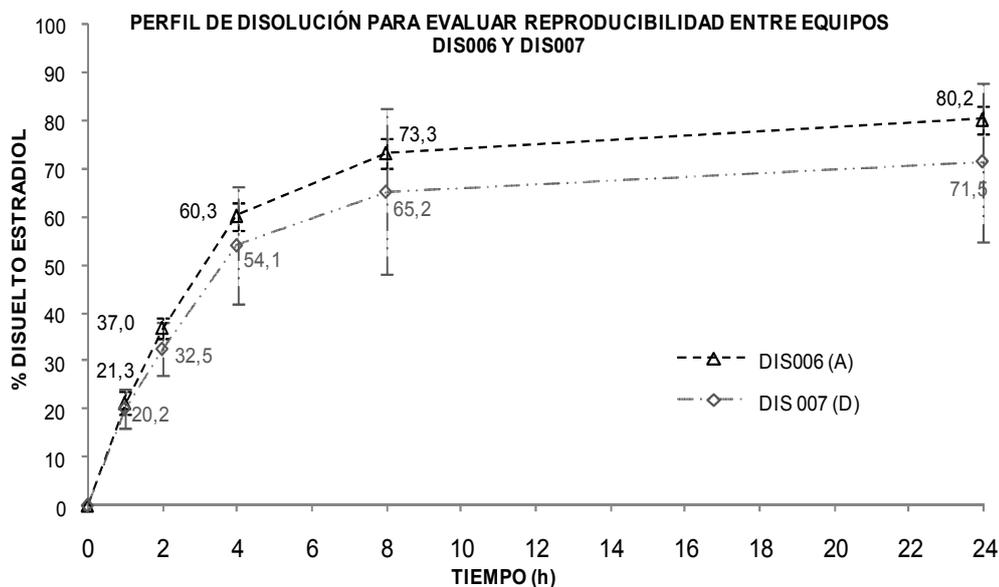
Gráfica No. 10: Reproducibilidad entre equipos DIS006 y DIS007 entre disolución B y disolución C.



En la comparación de resultados se utilizó el método series de tiempo, el cual indica que no son similares los perfiles para la gráfica No. 10 y 11, donde se utiliza los siguientes valores como límites: Q del 70% en un intervalo de confianza del 95% (límite inferior de 86.70% y límite superior de 115.40%) obteniendo para la comparación de la gráfica 10, un intervalo inferior de 82.98% y superior de 86.43% y para la gráfica No. 11 el intervalo fue para límite inferior 86.33% y superior 93.53%. Observando que conforme incrementa el tiempo del desarrollo del perfil, también aumenta la diferencia entre los porcentajes disueltos de cada comparación; además de que no existe una reproducibilidad entre equipo DIS006 y DIS007 lo cual indica que no es confiable realizar perfiles de disolución en DIS007 tomando como criterio la variabilidad que presentan los resultados, que aplica para este desarrollo del método. La falta de reproducibilidad es probable

que fuese por manipulación del equipo; ya que el DIS007 al ser un modelo con mayor antigüedad se manejaba de forma manual y de manera independiente cada celda; comparado con los disolutores DIS006 y DIS010.

Gráfica No. 11: Reproducibilidad entre equipos DIS006 y DIS007 empleando datos de disolución A y disolución D.



Es importante señalar que no se realizó la reproducibilidad interequipo entre el DIS010 y DIS006 debido a la disponibilidad del DIS010 para trabajar.

Con los datos anteriormente descritos, se logró desarrollar un método de disolución para microesferas de E₂: Col (1:1) para producto en proceso, evaluándose la forma farmacéutica; aún no se evaluaba en el producto terminado cuya presentación era la mezcla de microesferas de estradiol: colesterol con microesferas de progesterona.

Las siguientes pruebas fueron enfocadas a la evaluación de la disolución en la forma farmacéutica como producto terminado, que son microesferas de estradiol: colesterol mezcladas con microesferas de progesterona (E₂: Col (1:1) + P₄) en una dosis de 1mg de estradiol + 30 mg de progesterona.

8.3.7. Evaluación de la variación de la cantidad de muestra depositada en celda, tanto en ME E₂ (microesferas de estradiol) como ME P₄ (microesferas de progesterona).

La variación de la cantidad de microesferas depositada en la celda se evaluó para determinar el efecto de la cantidad de microesferas dentro de la celda de disolución; ya que una mayor cantidad de muestra podría dificultar la humectación y el movimiento de las microesferas dentro de la celda de disolución en el momento en que el medio de disolución entrara en contacto con las microesferas;

además de la formación de agregados de las mismas, lo cual puede tener un efecto en la velocidad de liberación⁽⁴⁹⁾.

8.3.7.1. Evaluación del efecto de la cantidad de muestra para microesferas de E₂: Col (1:1).

Para la evaluación en estradiol se emplearon microesferas de E₂: Col (1:1) del lote ME2005038 empleando el disolutor DIS006, bajo las condiciones de temperatura, flujo, tiempos de muestreo y medio de disolución establecidos durante el desarrollo del método de disolución.

Las cantidades de microesferas evaluadas fueron el equivalente a 3 y 6 mg de estradiol. La cantidad de 3 mg correspondía al equivalente de estradiol presente en 7.3 mg de microesferas de estradiol: colesterol (1:1), que permitía tener una buena sensibilidad para la cuantificación de estradiol en las muestras de disolución. En el caso de la cantidad equivalente a 6 mg de estradiol se estableció para poder ser pesada con precisión y exactitud. La evaluación del efecto de la cantidad de material sobre la disolución, se realizó en el mismo equipo empleando 3 celdas para cada condición.

Los resultados de los porcentajes disueltos de las dos determinaciones se muestran en la tabla No. 24 y en la gráfica No. 12 donde se indica el perfil de disolución; observando que para la cantidad de 6 mg se presenta un coeficiente de variación mayor respecto a la cantidad de 3 mg; lo cual se puede atribuir a las diferencias que pueden presentarse en humectación por la cantidad de microesferas colocadas dentro de las celdas.

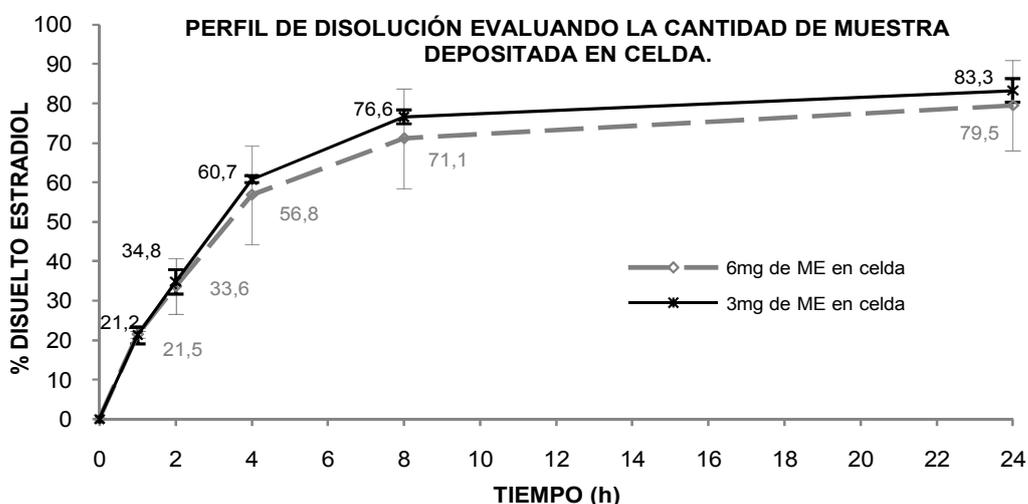
El análisis comparativo de los resultados se analizaron por un método llamado series de tiempo que permite calcular similitud entre perfiles cuando el C.V. es mayor al 10% en algunos tiempos de muestreo. Los resultados de la comparación indican que los perfiles son similares con un criterio de aceptación de Q= 70% en un intervalo de confianza de 95% (86.70% - 115.40%) obteniendo un resultado inferior de 92,47% y superior de 99,30%.

Con estos resultados se puede decir que aún cuando la cantidad equivalente a 3mg de estradiol está por debajo de la sensibilidad de la balanza empleada, no era posible modificar la cantidad de muestra a evaluar en el perfil de disolución por los resultados obtenidos en esta prueba; además de que la forma de pesar la muestra era tarando el peso de la celda y después se depositaba directamente la cantidad requerida de muestra dentro de la celda, lo cual limitaba el uso de una microbalanza; por lo tanto la cantidad de microesferas equivalente a 3mg de estradiol es adecuada para realizar el perfil de disolución cuando se compara con la cantidad de 6 mg, donde se observa mayor variabilidad en los resultados de los perfiles de disolución.

Tabla No. 24. Resultados de los porcentajes disueltos para la comparación de la cantidad de estradiol depositada dentro de la celda de disolución.

TIEMPO (h)	3mg de ME E ₂ :Col (1:1)		6mg de ME E ₂ :Col (1:1)	
	% DISUELTO	% C.V.	% DISUELTO	% C.V.
0	0,0	0,0	0,0	0,0
1,0	21,2	2,2	21,5	0,8
2,0	34,8	3,1	33,6	7,1
4,0	60,7	0,9	56,8	12,5
8,0	76,6	1,8	71,1	12,6
24,0	83,3	3,0	79,5	11,4

Gráfica No. 12: Cantidad de microesferas de estradiol depositadas dentro de la celda de disolución.



8.3.7.2. Evaluación del efecto de la cantidad de muestra para microesferas de progesterona (P₄).

Para la evaluación en progesterona se emplearon microesferas de P₄ del lote ME2006203 empleando el disolutor DIS006, bajo las condiciones de temperatura, flujo, medio y tiempos de muestreo establecidos durante el desarrollo del método de disolución.

Las cantidades de microesferas de progesterona evaluadas fueron 90, 200 y 300 mg, debido a las posibles presentaciones comerciales de microesferas de progesterona en forma individual o como mezcla con microesferas de estradiol:colesterol.

La primera prueba consistió en depositar 90 mg de ME P₄ en tres celdas del disolutor y en las otras tres celdas se colocó 200 mg de ME P₄, lo cual se sometió a disolución bajo las condiciones anteriormente descritas.

Los resultados de la comparación de los perfiles se muestran en la tabla No. 25 y en la gráfica No. 13, en donde se presenta el perfil de disolución para las dos cantidades sometidas a estudio, observándose una diferencia en los perfiles de las dos cantidades evaluadas; desde el inicio del perfil y hasta las 4h; sin embargo para las dos determinaciones se alcanzó en 24h un porcentaje disuelto muy cercano.

La comparación de estos dos perfiles se realizó por factor de similitud debido a que no hay resultados promedio con coeficientes de variación altos y por método series de tiempo debido al resultado obtenido por f_2 ; indicando con el cálculo de f_2 que los perfiles son similares con un valor de 53.2 sin embargo como el valor está muy próximo al límite donde no son similares; se evaluó también con el método series de tiempo indicando que no son similares los perfiles, con un criterio de aceptación de $Q = 70\%$ en un intervalo de confianza de 95% ($86.70\% - 115.40\%$) obteniendo un resultado inferior de 79.78% y superior de 102.46% . Se tomó como resultado el valor obtenido por el método series de tiempo debido a que el método hace una comparación individual entre cada tiempo de muestreo y posteriormente un análisis global a diferencia del análisis con factor de similitud que toma en cuenta el cálculo de los porcentajes disueltos en forma global.

Con la comparación realizada se puede ver una diferencia en la velocidad de disolución que puede verse influenciada por el aumento de la cantidad de microesferas de progesterona depositadas dentro de la celda.

Gráfica No. 13: Evaluación de la cantidad de microesferas de progesterona depositadas dentro de la celda de disolución: 90 mg y 200 mg.

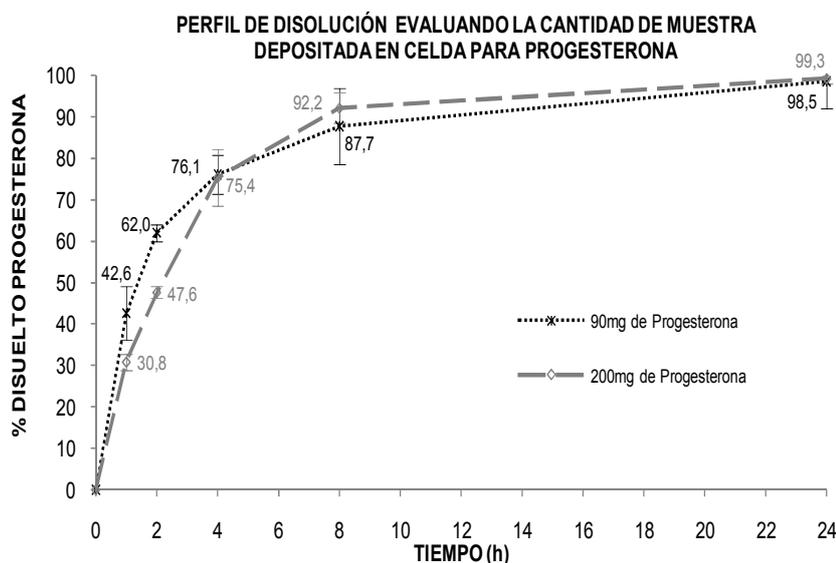


Tabla No. 25. Resultados de los porcentajes disueltos de la cantidad depositada dentro de la celda de disolución para progesterona evaluando 90mg y 200mg.

TIEMPO (h)	90 mg DE ME P ₄		200 mg DE ME P ₄	
	% DISUELTO	C.V. (%)	% DISUELTO	C.V. (%)
0	0,0	0,0	0,0	0,0
1,0	42,6	6,5	30,8	2,0
2,0	62,0	2,0	47,6	1,5
4,0	76,1	4,7	75,4	6,8
8,0	87,7	9,2	92,2	3,7
24,0	98,5	6,5	99,3	1,3

La segunda prueba consistió en depositar la cantidad de 90 mg de microesferas de progesterona P₄ en tres celdas de disolución y 300 mg de microesferas de progesterona P₄ en las tres celdas restantes, empleando el lote ME2006203; la prueba fue realizada bajo las mismas condiciones en las que se realizó la prueba con 200mg de microesferas de progesterona.

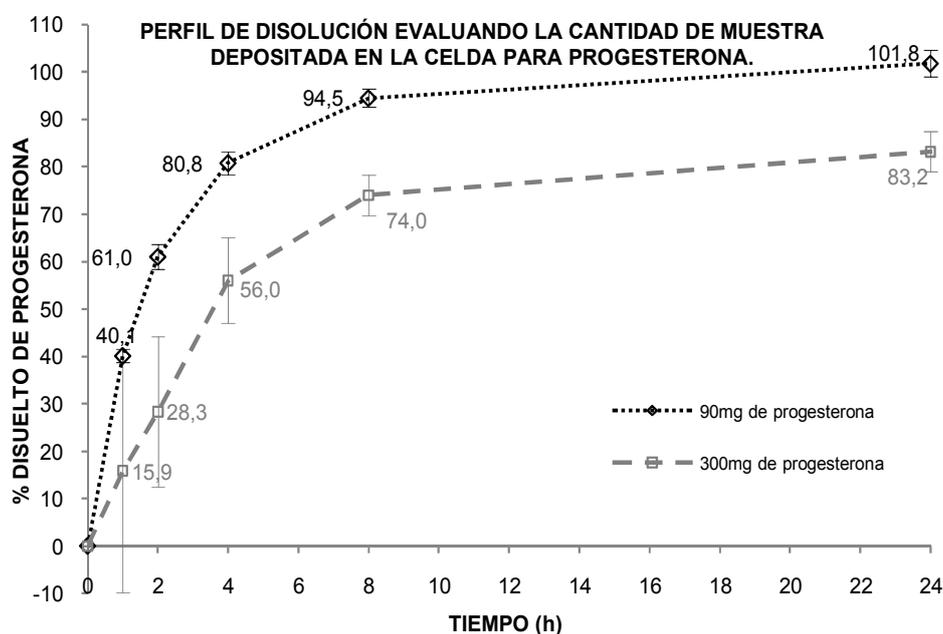
En la tabla No. 26 y gráfica No. 14 se puede observar que existe una disminución en la velocidad de disolución y un coeficiente de variación mayor cuando se depositan 300 mg respecto a 90 mg de ME P₄. La diferencia en la velocidad de disolución es probable que se vea influenciada por el aumento de la cantidad de microesferas de progesterona depositadas dentro de la celda, la forma en depositar el material dentro de la celda, así como la humectación del mismo con el medio de disolución.⁽⁴⁹⁾

Los resultados se compararon por series de tiempo; obteniendo que los perfiles no son similares con un valor de Q de 70% en un intervalo de confianza del 95% (86.70% - 115.40%) obteniendo un resultado inferior de 49.02% y superior de 77,09%.

Tabla No. 26. Resultados de los porcentajes disueltos de la cantidad depositada dentro de la celda de disolución para progesterona evaluando 90 mg y 300 mg.

TIEMPO (h)	90 mg ME P ₄		300 mg ME P ₄	
	% DISUELTO	C.V. (%)	% DISUELTO	C.V. (%)
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1,0	40,1	1,3	15,9	25,7
2,0	61,0	2,7	28,3	15,8
4,0	80,8	2,4	56,0	9,0
8,0	94,5	1,9	74,0	4,2
24,0	101,8	2,8	83,2	4,2

Gráfica No. 14: Evaluación de la cantidad de microesferas de progesterona depositadas dentro de la celda de disolución 90 mg y 300 mg.



8.3.8. Evaluación de la capacidad discriminativa del método de disolución en microesferas de E₂: Col (1:1).

Un método de disolución debe ser capaz de identificar cambios que estén relacionados con los activos de interés, por tal motivo fue necesario evaluar si el método desarrollado era capaz de discriminar entre lotes que presentaran diferentes características de fabricación que pudieran tener un efecto en la velocidad de disolución.

La evaluación se realizó con dos lotes de microesferas de estradiol E₂: Col (1:1), el lote ME2006257 denominado como alta disolución y el lote ME2006260 denominado como baja disolución. La evaluación se realizó solo a estradiol debido a que este activo al ser mezclado previamente con colesterol es el que realiza el cambio en la velocidad de disolución como se evaluó en el punto 8.3.4; ya que las microesferas de progesterona sin colesterol se combinan con la mezcla de estradiol: colesterol.

Los lotes utilizados para esta evaluación ya habían sido evaluados en su disolución por medio de un método de disolución considerado como largo, el cual utiliza como medio de disolución Tween 80 al 0.3%.

El porcentaje disuelto obtenido, con el método de disolución largo fue de 79.0% para el lote ME2006257 y para el lote ME2006260 fue de 10.5% en un perfil de disolución de 24h para cada lote respectivamente.

La prueba fue llevada a cabo en el DIS010, utilizando las condiciones seleccionadas durante el desarrollo del método, no se usó el DIS006 debido a la disponibilidad para trabajar en los equipos de disolución.

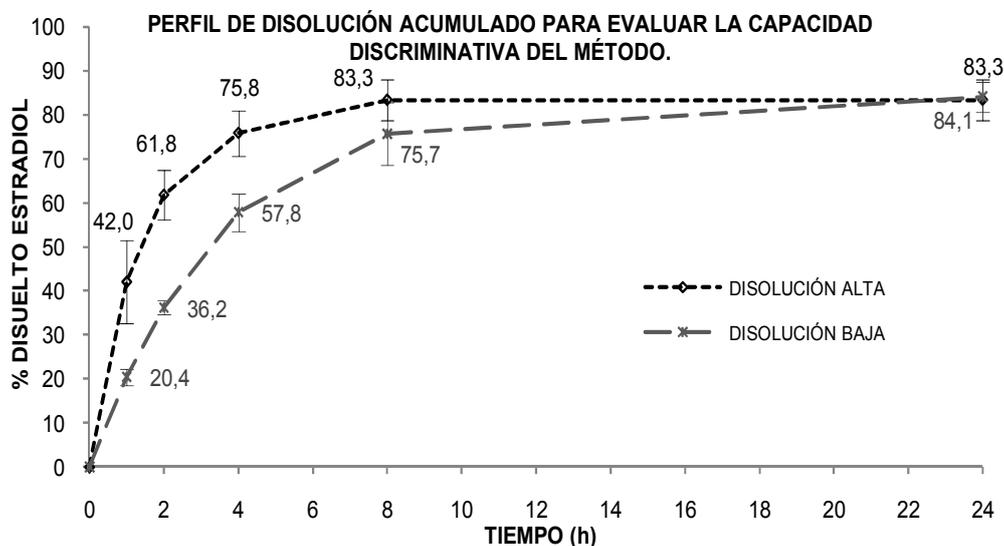
Los resultados del porcentaje disuelto acumulado respecto al tiempo, para microesferas de estradiol; se muestran en la tabla No. 27 y en la gráfica No. 15. Los perfiles obtenidos demuestran que en los primeros tiempos de muestreo se presenta una diferencia significativa en el porcentaje disuelto, corroborándose los resultados de velocidad de disolución previamente caracterizados con el método de disolución largo y posteriormente alrededor de las 24 horas de iniciado el perfil el porcentaje disuelto para los dos lotes probados es similar.

Los resultados de los perfiles de disolución se compararon por factor de similitud obteniendo un valor de 38.0, con lo cual se indica que los perfiles no son similares y que el método es capaz de discriminar entre lotes con diferentes velocidades de disolución.

Tabla No. 27. Resultados de los porcentajes disueltos en la evaluación de la capacidad discriminativa del método.

TIEMPO (h)	DISOLUCIÓN ALTA		DISOLUCIÓN BAJA	
	% DISUELTO	C.V. (%)	% DISUELTO	C.V. (%)
0	0,0	0,0	0,0	0,0
1,0	42,0	9,4	20,4	1,9
2,0	61,8	5,6	36,2	1,6
4,0	75,8	5,2	57,8	4,2
8,0	83,3	4,6	75,7	7,2
24,0	83,3	4,6	84,1	3,4

Gráfica No. 15: Evaluación de la capacidad discriminativa del método.



8.3.9. Evaluación de la disolución del estradiol en la mezcla de microesferas de estradiol colesterol (1:1) + progesterona dosis (1:30), con el método de disolución propuesto.

Se evaluó el método de disolución propuesto en la mezcla de microesferas para la dosis que se presenta como producto terminado, empleando microesferas de estradiol: colesterol E₂: Col (1:1) + P₄ dosis (1:30), empleando el lote ME2005112.

Para la evaluación de esta prueba se realizaron dos perfiles de disolución, bajo las siguientes condiciones: aparato IV de la USP, medio de disolución Tween 60 al 0.5% p/v, velocidad de flujo 16 mL/min \pm 5%, temperatura 37°C \pm 0.5°C, sistema abierto; con la duración del perfil de 24h y los tiempos de muestreo establecidos previamente. El equipo empleado fue el DIS006 y se realizó con seis celdas cada determinación.

La cantidad de microesferas de estradiol: colesterol (1:1) + progesterona que se empleó en cada celda fue 0.0974g de la mezcla; lo cual equivalía a 3mg de estradiol y 90mg de progesterona.

Para fines de comparación se identificaron los resultados del primer perfil de disolución para estradiol como G y para progesterona como I, para la segunda disolución se denominó al perfil de disolución de estradiol como H y para progesterona como J.

Se realizaron los cálculos correspondientes para obtener el porcentaje disuelto; como se muestran en la tabla No. 28 para estradiol, así como la gráfica No 16. Con los datos obtenidos se calculó la similitud de los perfiles mediante f_2 , obteniendo un valor de 44.5, lo cual indica que los perfiles no son similares.

Es importante notar que aún cuando se trata de las mismas condiciones, lote, disolutor y analista; existe una diferencia significativa en el perfil de disolución denominado como G, ya que presentó un menor porcentaje disuelto respecto al perfil de disolución denominado como H para estradiol por lo tanto este resultado indica que con la mezcla de microesferas de estradiol y progesterona no se pueden obtener resultados reproducibles lo cual puede ser atribuible a que es mayor la cantidad de muestra que se introduce en la celda al evaluar el perfil de disolución en una mezcla de estradiol: colesterol (1:1) + progesterona; además de que el comportamiento de la muestra al entrar en contacto con el medio de disolución es diferente entre celda y celda (las condiciones de movimiento de la mezcla de microesferas dentro de la celda), a la competencia que se puede presentar dentro de la celda por el activo que se encuentra en mayor proporción y que es ligeramente más soluble un activo que el otro, a las proporciones de mezclado que se encuentran los activos; por tanto el que está en menor proporción tiende a presentar mayor variabilidad.

Gráfica No. 16: Perfil de disolución de microesferas de estradiol: Col (1:1)+ progesterona evaluando el comportamiento de estradiol.

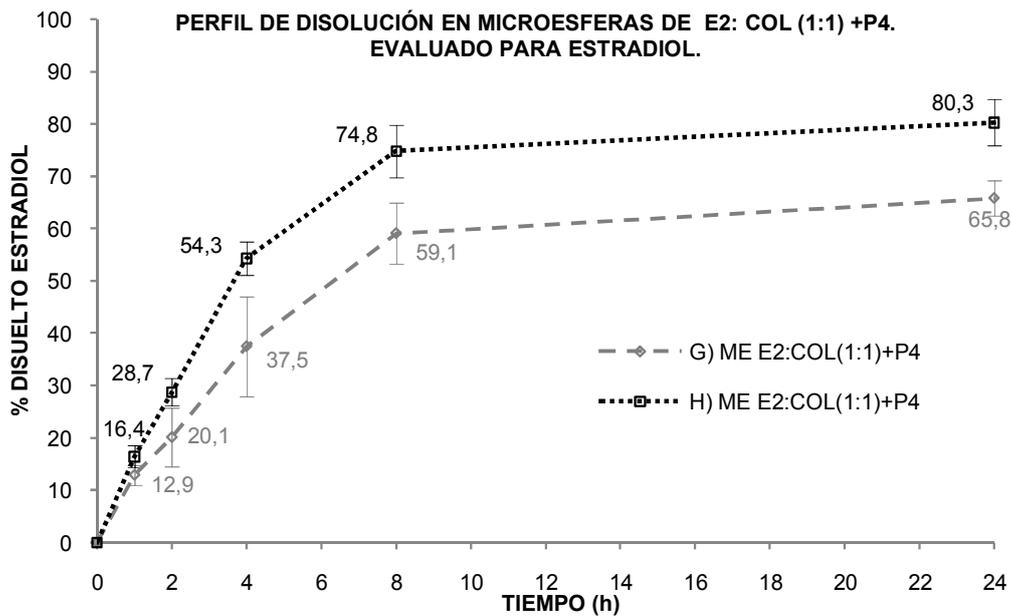


Tabla No. 28. Resultados de los porcentajes disueltos para estradiol en la mezcla de microesferas de estradiol y progesterona.

TIEMPO(h)	PORCENTAJE DISUELTO DE ESTRADIOL			
	G) ME E ₂ : Col (1:1)+P ₄		H) ME E ₂ : Col (1:1)+P ₄	
	% DISUELTO	C.V. (%)	% DISUELTO	C.V. (%)
0	0,0	0,0	0,0	0,0
1,0	12,9	1,9	16,4	2,1
2,0	20,1	5,6	28,7	2,6
4,0	37,5	9,6	54,3	3,2
8,0	59,1	5,8	74,8	5,1
24,0	65,8	3,3	80,3	4,5

8.3.10. Evaluación de la disolución de la progesterona en la mezcla de microesferas de estradiol colesterol (1:1) + progesterona dosis (1:30), con el método de disolución propuesto.

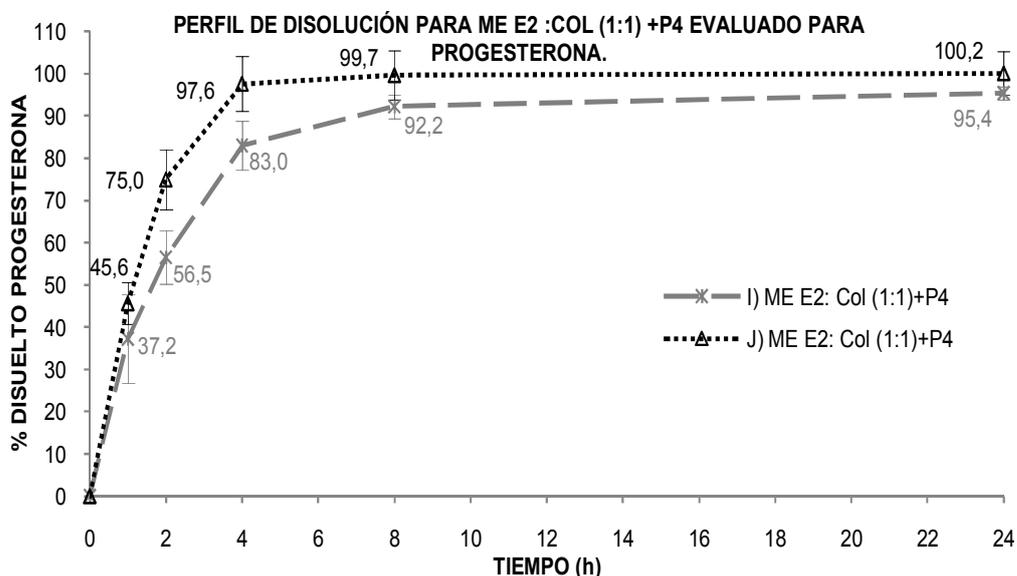
La determinación se realizó en las mismas condiciones descritas en el punto 8.3.9, obteniendo los datos presentes en la tabla No. 29 y gráfica No. 17 donde se presenta el perfil de disolución considerando el porcentaje cuantificado respecto al tiempo.

Los resultados se compararon por series de tiempo; obteniendo que los perfiles no son similares con un valor de Q de 70% en un intervalo de confianza del 95% (86.70% - 115.40%) obteniendo un resultado inferior de 111.46% y superior de 123.53%.

Tabla No. 29. Resultados de los porcentajes disueltos para la evaluación de la mezcla en microesferas de estradiol y progesterona.

TIEMPO(h)	PORCIENTO DISUELTO DE PROGESTERONA			
	I) ME E ₂ : Col (1:1)+P ₄		J) ME E ₂ : Col (1:1)+P ₄	
	% DISUELTO	C.V. (%)	% DISUELTO	C.V. (%)
0	0,0	0,0	0,0	0,0
1,0	37,2	10,5	45,6	5,0
2,0	56,5	6,3	75,0	7,1
4,0	83,0	5,9	97,6	6,5
8,0	92,2	2,8	99,7	5,7
24,0	95,4	1,5	100,2	5,2

Gráfica No. 17: Perfil de disolución de microesferas de estradiol: Col (1:1)+ progesterona evaluando el comportamiento de progesterona.



Como se observa en las gráficas No. 16 y 17, los porcentajes disueltos de microesferas para estradiol y progesterona se ven afectados en la velocidad de disolución posiblemente por la cantidad de mezcla de microesferas, lo cual disminuye el movimiento dentro de la celda de disolución. Otra razón es la competencia que puede existir entre los esteroides debido a la diferencia de solubilidades entre los activos presentes ya que la progesterona es más soluble respecto al estradiol, como sugieren Ping Li y Luwei Zhao, donde citan este efecto; al señalar, que cuando dos esteroides se encuentran en solución a diversas concentraciones de Tween 80, existe una competencia de solubilidad entre estos dos esteroides provocando que uno disuelva más rápido que el otro. (50)

Con los puntos anteriormente evaluados se logró obtener las condiciones que permiten realizar un perfil de disolución para microesferas de estradiol en combinación de colesterol proporción (1:1), para microesferas de progesterona bajo las condiciones descritas en la tabla No. 30.

El método es robusto a cambios de concentración del medio de disolución cuando se realizan variaciones de $\pm 0.0125\%$ en el peso de Tween 60.

Es discriminatorio al poder diferenciar entre una materia prima micronizada de estradiol respecto a microesferas de estradiol: colesterol (1:1).

Se evaluó la reproducibilidad intraequipo para los aparatos de disolución IV de la USP (DIS006, DIS007 y DIS010), encontrando que existía reproducibilidad intraequipo utilizando microesferas de estradiol: colesterol (1:1).

La reproducibilidad interequipo entre el DIS006 y DIS007 presento diferencias al comparar los porcentajes disueltos de los perfiles de disolución originando la falta de reproducibilidad. La obtención de perfiles de disolución bajos en DIS007 se atribuye a una falla en la operación; sin embargo para fines del desarrollo del método, no se uso el aparato; sin embargo para futuros análisis se podría solicitar una verificación correctiva para evaluar la posible falla y posteriormente realizar la reproducibilidad interequipo.

Para el equipo DIS010 no se realizó la reproducibilidad interequipo, ya que fue aparato de reciente adquisición y a que el uso de los equipos debía cumplir con verificaciones periódicas; por tanto cada equipo contaba con una programación de uso lo cual ocasionaba usar los que estaban disponibles.

TABLA No. 30. Condiciones para realizar la prueba de disolución.

CONDICIÓN	ESPECIFICACIÓN
Tipo de celda	Celda de 12 mm de diámetro de flujo continuo para polvos
Filtros	GF/D y GF/F
Medio de disolución	Tween 60 al 0.5%
Temperatura	37°C.
Velocidad de flujo	16 mL/min
Tiempos de Muestreo (n)	1, 2, 4, 8 y 24h
Sistema	Abierto
Malla	w 0.16 mm/ d 0.12 mm y w 0.45 mm/ d 0.2 mm
Perlas de vidrio	Aproximadamente 2g – 2.5g de perlas de vidrio de 1mm de diámetro.

Las variaciones de la cantidad de microesferas depositadas dentro de la celda en la cantidad evaluada, tanto de estradiol como de progesterona; indicó que pueden afectar en gran manera la velocidad de disolución aun cuando se trate del mismo

lote, provocando variaciones muy grandes entre celda y celda en un perfil (gráfica No. 12 para estradiol; 13 y 14 para progesterona)

El método permitió discriminar entre dos lotes con diferentes velocidades de disolución para microesferas de estradiol: colesterol (1:1), para el caso de microesferas de progesterona no se evaluó, ya que esta no se mezcla con colesterol para modificar la disolución.

9. CONCLUSIÓN

El desempeño del perfil de disolución acelerado en microesferas de estradiol y progesterona, empleando el aparato IV celdas de flujo continuo, Tween 60 al 0.5% como medio de disolución a un flujo de 16 mL/min \pm 5% y 37°C \pm 0.5°C con los tiempos de muestreo 1h, 2h, 4h, 8h y 24h provee resultados satisfactorios para microesferas de estradiol: colesterol (1:1), para microesferas de progesterona y es discriminativo para microesferas de estradiol: colesterol (1:1); sin embargo no permite obtener resultados reproducibles para la mezcla en microesferas de estradiol: colesterol (1:1)+ progesterona (1:30).

10. SUGERENCIAS

Evaluar el impacto que tiene la pureza del Tween 60 en el perfil de disolución; ya que influye en la velocidad de disolución impactando en un 10% aproximadamente; ya que las micelas formadas por el tensoactivo pueden ser sensibles a impurezas y electrolitos, como lo refieren algunos autores.⁽⁵¹⁾

Para la evaluación de las microesferas de estradiol: colesterol + progesterona se recomienda realizar pruebas empleando las celdas de disolución de 22.6 mm de diámetro, ya que también podría influir las dimensiones de área donde se desempeña el proceso de disolución, lo cual podría ser una fuente de variación como se observo cuando se aumentaba la cantidad de muestra de microesferas de estradiol: colesterol y microesferas de progesterona que se depositaba en la celda; donde se presentó aumento en el coeficiente de variación de los resultados y disminución de la velocidad de disolución.

Evaluar perfiles de disolución donde se empleen mínimo 3 lotes de fabricación en los cuales se tengan condiciones controladas y reproducibles para el proceso de fabricación, tanto para los activos de forma individual, como para la mezcla de los dos.

Realizar perfiles de disolución evaluado de forma individual los activos con medios de disolución distintos (por ejemplo aumentando la concentración de Tween 60 en el medio de disolución) de manera que se pudieran obtener resultados reproducibles para la mezcla de estradiol: colesterol + progesterona.

La parte que se refiere a la reproducibilidad entre equipos es un punto que se podría mejorar realizando una verificación del desempeño del equipo, evaluando

un estándar de microesferas del cual se conozca su pureza y con un tamaño de partícula similar al de las microesferas, con lo cual se puede evaluar periódicamente los resultados obtenidos entre los aparatos IV de disolución y así se determinaría la reproducibilidad entre los equipos ya que aún no existe en farmacopea un método para calibrar el equipo.

11. BIBLIOGRAFIA.

- 1.** Wagner John G; Pernarowski, M; Biopharmaceutics and relevant pharmacokinetics; Illinois Hamilton Press. 1971: 98-119.
- 2.** NOM. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un producto es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse terceros autorizados que realicen las pruebas. Estados Unidos Mexicanos.
- 3.** Brown Cynthia K., et al. Acceptable Analytical Practices for Dissolution Testing of Poorly Soluble Compounds. Dissolution Technologies. Nov 2005: p. 6-12.
- 4.** Abdou H. Dissolution, Bioavailability & Bioequivalence, Mack Publishing Co Easton PA, EEUU p.10-36
- 5.** Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Octava edición. México: Secretaria de Salud, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos: 2004: p. 392-393, 1351,2133-2134.
- 6.** FDA, Agosto 1997 Guidance for Industry: Dissolution testing of immediate release oral dosage forms.
- 7.** FDA, Septiembre 1997 Guidance for Industry Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application on In Vitro/ In Vivo Correlations.
- 8.** Swarbrick James; Boylan C. James. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2002. p 717-718, 721, 724 y 726.
- 9.** Gennaro, A.R; Remington's. Pharmaceutical Sciences, 18ª edición. USA; Mack Publishing Company, 1990. p. 270-271, 589-602, 764-778.
- 10.** Florence Alexander T. Attwood David . Physicochemical principles of pharmacy. 4ª edición. Pharmaceutical Press, USA; 2006: p.12-17, 24-29, 122-125, 142-146, 168,178-179, 180-185, 202-227.
- 11.** Mansoor Amiji M; Beverly J. Sandmann. Applied Physical Pharmacy. Ed. Mc Graw Hill. USA. 2003: p.316-325.
- 12.** Manzano Yescas Oscar Arturo, Morales Delgado Marco Tulio. Formas farmacéuticas sólidas tabletas parte IV. Informaceutico. Vol 14 No. 1 Ene./Feb. 2007: p. 42-50
- 13.** Fliszar Kyle A., Forsyth Richard J, Zhong Li., Martin Gregory P. "Effects of Dissolved Gases in Surfactant Dissolution Media". Dissolution Technologies. Agosto 2005; p. 6-9.

- 14.** USP. <1092> The dissolution procedure: development and validation. Pharmacopeial Forum. Jan-Feb 2004; 31 (1): 351-363.
- 15.** Jennifer Dressman, Johannes Krämer. Pharmaceutical Dissolution Testing. New York. Taylor & Francis, 2005. p. 15-21, 39-43, 52-59, 62-65, 81-85, 89-95, 163-173, 205-225, 232
- 16.** Malmsten Martin. Surfactants and polymers Delivery. Drugs and the Pharmaceutical Science. Marcel Dekker, New York, 2002: p. 40-47, 56-61, 102-113 y 293-309.
- 17.** Brown Will. Apparatus 4 Flow Through Cell: Some Thoughts on Operational Characteristics. Dissolution Technologies. May 2005. No.2; Vol. 2. p. 23-25.
- 18.** USP 27 NF. The United States Pharmacopeia The National Formulary. 2004: p. 2307-2309.
- 19.** Krämer Johannes; Stippler Erika. Experiences with USP apparatus 4 calibration. Dissolution Technologies: Mayo 2005, No. 2, vol. 12: p. 33-39.
- 20.** Beyssac E.; Lavigne J. Dissolution study of active pharmaceutical Ingredients using the flow through apparatus USP 4. Dissolution Technologies; Mayo 2005. Núm.2, Vol.12; p.23-25.
- 21.** Kauffman Jon S. Qualification and validation of USP Apparatus 4. Dissolution Technologies; Mayo 2005. Núm.2 Vol.12; p. 28-30.
- 22.** 28 Suplemento 2 NF 23. The United States Pharmacopeia The National Formulary. USA. 2005: p. 3572-3583.
- 23.** Brown W and Marques M. Question and answer section. Dissolution Technologies. Nov 2005. Vol. 12 No. 4; p. 30.
- 24.** Noory Carol, Tran Nhan, Ouderkirk Larry, and Shah Vinod. Steps for development of a dissolution test for sparingly water-soluble drug products. Dissolution Technologies. Feb 2000. Vol 7 No. 1; p. 16-18.
- 25.** [http://depa.pquim.unam.mx/fqangeles/fisicoquimica/series/ATASerieUILPDF#search="agentes%20tensoactivos%20propiedades%20fisicoquímicas"](http://depa.pquim.unam.mx/fqangeles/fisicoquimica/series/ATASerieUILPDF#search=). [consultado agosto 2007]
- 26.** Clint John H. Surfactant aggregation. Editorial Blackie Glasgow and London. USA: 1992; p. 82-121.
- 27.** Porter M.R.; Handbook of surfactants. Editorial Blackie Glasgow and London. USA: 1991; p. 116-129.

- 28.** Rowe Raimond C, Seskey Paul J. and Oween Siân C. Handbook of pharmaceutical excipients. 5ª edición. Editorial Pharmaceutical Press.; USA. 2006:580-584
- 29.** Salamone Joseph C. Polymeric materials enciclopedia. Vol. 3 D-E. Editorial CRP Press. New York: 1996; p. 2089-2090.
- 30.** Van Os Nico M. Nonionic surfactants organic chemistry. Surfactant Science series. Vol 72. New York :1998. p 142.
- 31.** Windholdz M comp. The Merk Index an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. USA. Merck & Co; Inc 12ª edición. 1986: p. 583, 585 y 1234.
- 32.** Clarke E.G.C. Isolation and identification of drugs. Editorial The Pharmaceutical Press. Gran Bretaña. 1969: p. 451,452 y 516.
- 33.** Thomson PLM. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. DEF50/México 2004. [1 pantalla]. Disponible en F:\anticonceptivos\2_p4.htm. [Consultado Mayo01, 2008].
- 34.** NOM. Norma Oficial Mexicana. NOM-035-SSA2-2002. Prevención y control de enfermedades en la perimenopausia y postmenopausia de la mujer. Criterios para brindar la atención médica. Estados Unidos Mexicanos.
- 35.** JANSSEN-CILAG, EVOREL – EVORELCONTI [1 página en pantalla]. Disponible en <F:\anticonceptivos\EVOREL - EVORELCONTI.htm>. [Consultada: Mayo01, 2008.]
- 36.** U.S. Pat. No. 5643604 Date of Patent: Jul. 1, 1997 (Angeles Uribe et al.)
- 37.** Gibson Mark.. A practical guide from candidate drug selection to comercial dosage form. Pharmaceutical Preformulation and Formulation. USA: Taylor & Francis; 2000. p. 345
- 38.** Ford L. James and Timmins Peter. Pharmaceutical thermal analysis thecniques and applications. New York: Halsted Press; 1989. p. 190-20039.
- 39.** Guía de validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México A. C. edición 2002.
- 40.** Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.
- 41.** Guideline for Industry. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). November 2005.

- 42.** Lin Ju Huey; Liaw Shue-Jean. On The assessment of similarity of drug dissolution profiles a simulation study". Drug Information Journal, 1997. Vol. 31; p. 1273-1289.
- 43.** Saranadasa Hewa. "Defining similarity of dissolution profiles through Hotelling's T^2 statistics". Pharmaceutical Technology. Febrero 2001; p 46-54.
- 44.** Mauger John W; Chilko Daniel On the análisis of dissolution data. Drug Development and Industrial Pharmacy. Jun-Ago 1986. Vol 12 (7); p. 969-992.
- 45.** Chiang Pen Kok; Fun Wong Choy. application of similarity factor in development of controlled-release diltiazem tablet". Drug Development and Industrial Pharmacy. 2000. Vol. 26(7); p. 723-730
- 46.** Manual de servicio del CE7 smart 8000e en archivo electrónico elaborado el 30ENE2007 por P. Mindel.
- 47.** Huey Lin Ju; Shue-Jean Liaw. On the assessment of similarity of drug dissolution profiles a simulation study. Drug Information Journal, Vol. 31, 1997; p. 1273-1289.
- 48.** Kok Chiang Pen; Choy Fun Wong. Application of similarity factor in development of controlled-release diltiazem tablet. Drug Development and Industrial Pharmacy. 2000. Vol. 26(7); p. 723-730.
- 49.** D'Souza Susan S., DeLuca Patrick P. Methods to assess *in Vitro* drug release from injectable polymeric particulate systems. Pharmaceutical Research, Vol. 23, No. 3, Marzo 2006; p. 460-474.
- 50.** Ping Li. Luwei Zhao. Cosolubilization of non-polar drugs in polysorbate 80 solutions. International Journal Pharmaceutics. Vol. 249, 2002; p. 211-217.
- 51.** Crison JR, Weiner ND, Amidon GL. Disolution media for *in vitro* testing of water-insoluble drugs: effect of surfactant purity and electrolyte on in vitro dissolution of carbamazepine in aqueous solutions of sodium lauryl sulfate.