

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

POSGRADO DE CIENCIAS E INGENIERÍA



“Síntesis de geles de metacrilato de o-carboxiarilo: Estudio simultaneo de la liberación de salicilamida e hidrólisis por CLAR”

T E S I S

que presenta para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS

TIRSO ALBERTO GUERRERO ARREOLA

**DIRECTORES DE TESIS:
DRA. KARLA ALEJANDRA ESPINOZA DUEÑAS
DR. JOSÉ MANUEL CORNEJO BRAVO**

TIJUANA, B. C

AGOSTO DE 2011

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

FOLIO No. 052

Tijuana, B. C., a 1 de agosto de 2011

C. TIRSO ALBERTO GUERRERO ARREOLA
Pasante de: Maestro en Ciencias
Presente

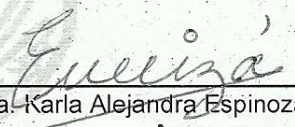
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS


Es propuesto, por los CC. Dres. Karla Alejandra Espinoza Dueñas y José Manuel
Cornejo Bravo.

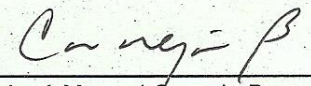
Quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente,
referido al tema: "Síntesis de geles de metacrilato de o-carboxiarilo: Estudio simultaneo
de la liberación de salicilamida e hidrólisis por CLAR"

el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- RESUMEN
- II.- ANTECEDENTES
- III.- EXPERIMENTAL
- IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- BIBLIOGRAFIA


Dra. Karla Alejandra Espinoza Dueñas
Asesor


Q. Noemí Hernández Hernández
Sub-Director Secretario


Dr. José Manuel Cornejo Bravo
Asesor


Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

Agradecimiento Institucional

Trabajo realizado en los laboratorios de Química Orgánica y Biofarmacia de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería UABC con apoyo de la XIII Convocatoria Interna de Apoyo a Proyectos de Investigación UABC y en SBL Pharmaceuticals S. de R. L. de C. V.

Agradecimientos

A mi amiga Adriana “Chumi”, que por tantos años nos hemos reído juntos y ahora como mi esposa me da más motivos para sonreír.

A mis Padres; Tirso y Rosario, por darme esa niñez llena de amor e inculcarme los valores que me han hecho llegar hasta donde estoy.

A mi hermano Oscar que tanto admiro, por seguir siendo un ejemplo para mí.

A la Dra. Karla Alejandra Espinoza Dueñas directora de tesis, por confiar en mí.

Al Dr. José Manuel Cornejo Bravo codirector de tesis, por dirigir gran parte de este trabajo y confiarme este segundo proyecto.

Contenido

Agradecimiento Institucional	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido	v
Lista de abreviaturas y símbolos	ix
Lista de figuras	xi
Lista de tablas.....	xiii
Resumen	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Objetivo general	3
1.2.1 Objetivos específicos.....	4
1.3 Metas	4
1.4 Hipótesis.....	4
Antecedentes.....	5
2.1 Sistemas de liberación	5
2.1.1 Sistemas de liberación convencional.....	6
2.1.2 Sistemas de liberación sostenida	6
2.2 Polímeros sensibles al pH.....	8
2.3 Metacrilatos de carboxiarilo	8
2.4 Salicilamida	9
2.4.1 Mecanismo de acción	10
2.4.2 Farmacocinética.....	10
2.4.3 Indicaciones y posología	10
2.5 Cromatografía líquida de alta resolución.....	11

2.5.1	Tipos de cromatografía.....	11
2.5.1.1	Cromatografía fase reversa	12
2.6	Validación de métodos cromatográficos	13
Experimental	18
3.1	Síntesis de monómero (ácido 2-metacriloiloxibenzoico).....	18
3.2	Optimización de la reacción para síntesis del ácido metacriloiloxibenzoico (AMOB) 19	19
3.3	Obtención de los geles a base de AMOB.	20
3.4	Prueba de Hidrólisis	21
3.5	Prueba de de hinchamiento (Q) contra el tiempo (t)	22
3.6	Preparación de las soluciones amortiguadoras con fuerza iónica de 0.05.....	22
3.7	Pruebas de hinchamiento con respecto al pH.....	24
3.8	Determinación de Q.....	24
3.9	Diseño del método analítico	25
3.9.1	Preparación de la fase móvil.....	25
3.9.2	Preparación del estándar.....	26
3.9.3	Condiciones cromatográficas	26
3.9.4	Adecuabilidad del sistema.....	27
3.10	Validación de método analítico	27
3.10.1	Linealidad	27
3.10.2	Intervalo.....	27
3.10.3	Exactitud (recobro).....	27
3.10.4	Estudio de retención del filtro	27
3.10.5	Precisión	28
3.10.5.1	Repetitividad.....	28
3.10.5.2	Precisión intermedia	28

3.10.6	Selectividad (Especificidad).....	28
3.10.7	Estudio de estabilidad de las soluciones.....	28
3.10.8	Determinación de la adecuabilidad del sistema.....	28
3.11	Cuantificación de ácido salicílico hidrolizado contra el pH.....	29
3.12	Cargado de los geles.....	29
3.13	Prueba de liberación de fármaco e hidrolisis.....	29
Resultados y Discusión.....		31
4.1	Síntesis de monómero (ácido 2-metacrilóiloxibenzoico).....	31
4.2	Optimización de la reacción.....	31
4.3	Prueba de de hinchamiento (Q) contra el tiempo (t).....	31
4.4	Pruebas de hinchamiento con respecto al pH.....	34
4.5	Validación de método analítico.....	36
4.5.1	Linealidad:.....	36
4.5.2	Intervalo.....	39
4.5.3	Exactitud (recobro):.....	41
4.5.4	Estudio de retención del filtro:.....	44
4.5.5	Precisión.....	45
4.5.5.1	Repetitividad.....	45
4.5.5.2	Precisión intermedia.....	46
4.5.6	Selectividad (especificidad).....	48
4.5.7	Estudio de estabilidad de las soluciones.....	48
4.5.8	Determinación de la adecuabilidad del sistema.....	50
4.6	Cuantificación de ácido salicílico hidrolizado contra el pH.....	50
4.7	Cargado de los geles.....	53
4.8	Prueba de liberación de fármaco e hidrólisis.....	54
Conclusiones.....		59

Referencias	60
Bibliografía consultada.....	61
Anexo I: Glosario de términos	62
Anexo II: Cromatogramas y Espectros.....	65
Anexo III: Procedimiento experimental recomendado y criterios de aceptación para métodos categoría III (disolución)	77

Lista de abreviaturas y símbolos

#	Número
%	Por ciento
°	Grados
µg	Microgramos
µm	Micrómetros
AIBN	Azoisobutironitrilo
AMOB	Ácido metacrilóil <i>o</i> -benzoico
Ar	Aromático
C	Centígrados
c-A15	Copolímero de ácido metacrilóil <i>o</i> -benzoico con un proporción del 15 de ácido acrílico
c-A30	Copolímero de ácido metacrilóil <i>o</i> -benzoico con un proporción del 30 de ácido acrílico
CaCO ₃	Carbonato de calcio
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
CV	Coefficiente de variación
DMAP	Dimetilamino piridina
DMSO	Dimetil sulfóxido
FT-IR	Espectroscopia infrarroja con transformadas de Fourier
g	Gramos
h	Horas
HCl	Ácido clorhídrico
HEMA	2-Hidroxietil metacrilato
L	Litros
M	Molaridad
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar

N	Normalidad
NaCl	Cloruro de sodio
NaNO₃	Nitrato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetros
<i>o</i>	orto
OMS	Organización Mundial de la Salud
p-AMOB	Polímero de ácido metacrilóil o-benzoico
p-AMOBE	Polímero de ácido metacrilóil o-benzoico con una cantidad de 3.7% de entrecruzante.
pH	Concentración de iones hidronio
pka	logaritmo de k_a
Q	Factor de hinchamiento
rpm	Revoluciones por minuto
t	Tiempo
TEA	Trietilamina
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultra violeta
W	Peso

Lista de figuras

Figura 1.1. Metacrilato de carboxiarilo.	3
Figura 2.1. Representación de un gel sensible.	7
Figura 2.2. Metacrilato de carboxiarilo.	9
Figura 2.3. Salcilamida.....	10
Figura 3.1. Ácido 2-metacriloiloxibenzoico.....	18
Figura 3.2. Estructura de monómero AMOB.	19
Figura 4.1. Respuesta de Q contra pH para la serie p-AMOB.	33
Figura 4.2. Respuesta de Q contra pH para la serie p-cA15.....	33
Figura 4.3. Q contra pH para la serie p-cA30.....	34
Figura 4.4. Q contra pH serie p-AMOB.	35
Figura 4.5. Q contra pH serie c-A15.	35
Figura 4.6. Q contra pH serie c-A30.	36
Figura 4.7. Gráfica de linealidad de ácido salicílico.	39
Figura 4.8. Gráfica de linealidad de salcilamida.	39
Figura 4.9. Gráfica del intervalo de linealidad para ácido salicílico.	44
Figura 4.10. Gráfica del intervalo de linealidad para salcilamida.	44
Figura 4.11. Grafica % hidrolizado Vs tiempo de p-AMOB.....	52
Figura 4.12. Gráfica % hidrolizado Vs tiempo de c-A15.....	52
Figura 4.13. Gráfica % hidrolizado Vs tiempo de c-A30.....	53
Figura 4.14. Gráfica % hidrolizado Vs tiempo para las cuatro serie de geles a pH 1.2.	55
Figura 4.15. Gráfica % hidrolizado Vs tiempo para las cuatro serie de geles a pH 6.8.	56
Figura 4.16. Gráfica % hidrolizado Vs tiempo para las cuatro serie de geles a pH 7.4.	56
Figura 4.17. Gráfica % fármaco liberado Vs tiempo para las cuatro serie de geles a pH 1.2. ...	57
Figura 4.18. Gráfica % fármaco liberado Vs tiempo para las cuatro serie de geles a pH 6.8. ...	57
Figura 4.19. Gráfica % fármaco liberado Vs tiempo para las cuatro serie de geles a pH 7.4. ...	58
Figura I.1. Cromatograma de fase móvil.....	66
Figura I.2. Cromatograma de amortiguador gástrico pH 1.2.....	67
Figura I.3. Cromatograma de amortiguador intestinal pH 6.8.....	68
Figura I.4. Cromatograma de amortiguador intestinal pH 7.4.....	69

Figura I.5. Cromatograma típico	70
Figura I.6. Espectro RMN de C13 AMOB.....	71
Figura I.7. Espectro de H ¹ RMN AMOB.....	72
Figura I.8. Espectro IR de AMOB.....	73
Figura I.9. m/z AMOB.	74
Figura I.10. IR ácido salicílico.	75
Figura I.11. m/z ácido salicílico.	76

Lista de tablas

Tabla 2.1. Características del desempeño analítico.....	14
Tabla 2.2. Categoría de métodos USP.....	16
Tabla 3.1. Rendimiento de reacción vs relación molar de Ac. Salicílico.....	19
Tabla 3.2. Rendimiento vs tiempo de adición.	20
Tabla 3.3. Nomenclatura y porcentaje de reactivos utilizados para la síntesis de los geles.....	20
Tabla 3.4. Cantidad de reactivos utilizados para la síntesis de los geles.....	21
Tabla 3.5. Especies respecto a pH.	22
Tabla 3.6. Cantidades por litro de solución para la preparación de amortiguadores.....	24
Tabla 3.7. Condiciones cromatográficas	26
Tabla 3.8. Secuencia de la inyecciones.	26
Tabla 4.1. Rendimiento de reacción Vs relación molar de Ac. Salicílico.....	32
Tabla 4.2. Rendimiento Vs tiempo de adición.	32
Tabla 4.3. Respuesta de Q contra t.	32
Tabla 4.4. Linealidad de la valoración de ácido salicílico.....	37
Tabla 4.5. Linealidad de la valoración de salicilamida	38
Tabla 4.6. Intervalo del método de ácido salicílico.....	40
Tabla 4.7. Intervalo del método de salicilamida.....	41
Tabla 4.8. Exactitud del método de ácido salicílico.....	42
Tabla 4.9. Exactitud del método de salicilamida.....	43
Tabla 4.10. Estudio de filtrado para ácido salicílico.	45
Tabla 4.11. Estudio de filtrado para salicilamida.	45
Tabla 4.12. Repetitividad para ácido salicílico.....	46
Tabla 4.13. Repetitividad para salicilamida.	46
Tabla 4.14. Precisión intermedia para ácido salicílico (Repetitividad analista 2).....	47
Tabla 4.15. Precisión intermedia para salicilamida (Repetitividad analista 2).	48
Tabla 4.16. Estabilidad de la solución estándar para ácido salicílico.....	49
Tabla 4.17. Estabilidad de la solución estándar para salicilamida.	49
Tabla 4.18. Estabilidad de la solución muestra ácido salicílico.	49
Tabla 4.19. Estabilidad de la solución muestra salicilamida.....	50

Tabla 4.20. Adecuabilidad del sistema.....	50
Tabla 4.21. Porcentaje disuelto de p-AMOB.	51
Tabla 4.22. Porcentaje disuelto de c-A15.....	51
Tabla 4.23. Porcentaje disuelto de c-A30.....	51
Tabla 4.24. Cantidad de fármaco cargado.	53
Tabla 4.25. Porcentaje hidrolizado.	54
Tabla 4.26. Porcentaje de fármaco liberado.	55

Capítulo 1

Resumen

1.1 Antecedentes

Las formas farmacéuticas se diseñan con el objetivo de administrar fármacos de manera segura, que por otros medios no se podría lograr, debido a que las concentraciones que suelen administrarse son bajas por la potencia de los fármacos. Otras razones importantes son la protección de principio activo ya sea del ambiente o el propio sistema gástrico, obtener la acción óptima del fármaco, o para poder administrarlos de manera adecuada.

La liberación de fármacos de una forma farmacéutica oral sólida es importante cuando hablamos de la disponibilidad biológica o biodisponibilidad de fármacos. La biodisponibilidad se refiere a *la proporción del fármaco inalterado o su metabolito activo que se absorbe a la circulación general después de la administración de un medicamento y el tiempo que requiere para hacerlo* [1], es decir el fármaco disponible para ejercer un efecto terapéutico. En algunos casos la actividad biológica de los fármacos depende de la velocidad con la que son absorbidos por el organismo, por consecuencia la velocidad de disolución o liberación del fármaco puede afectar el comienzo, la intensidad o la duración del efecto terapéutico deseado.

Las formas farmacéuticas pueden tener diferentes características debido a los sistemas de liberación con el cual están formulados. Los sistemas de liberación inmediata son diseñados para liberar el fármaco inmediatamente después de la administración y así obtener una acción rápida y una absorción sistémica completa, sin embargo estos sistemas presenta desventaja asociada con la toma de múltiples dosis. Los sistemas de liberación modificada se han desarrollado para hacer liberaciones mas predecibles y precisas, es por eso que se les ha llamado sistemas de liberación controlada y han ofrecido grandes ventajas sobre los sistemas comunes de liberación de agentes con actividad biológica.

Los polímeros tales como los geles o hidrogeles son materiales que se han usado para desarrollar sistemas de liberación modificada. Los geles han sido de gran interés para los científicos de biomateriales, desde las investigaciones de Wichterle y Lim en 1960 acerca de

geles entrecruzados de hidroxietil metacrilato (HEMA) [2] que poseen un carácter hidrofílico y potencial para ser biocompatibles.

Los geles son materiales que tienen la característica de que al ser expuestos a un exceso de agua son capaces de absorber este líquido rápidamente y retener grandes volúmenes dentro de sus estructuras. Las estructuras de estos geles están unidos (entrecruzados) por enlaces químicos u otras fuerzas de cohesión como interacciones iónicas, puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas. Algunos de estos materiales tienen la capacidad de responder a estímulos externos ya sean físicos o químicos como pH, temperatura, campo eléctrico, iones, luz visible o UV, disolventes, reactantes.

La cuantificación de los principios activos cargados dentro de los sistemas de liberación es importante y se puede realizar por diferente técnica sin embargo, en la industria farmacéutica moderna la cromatografía de líquidos de alta resolución ha demostrado ser una herramienta muy útil durante el desarrollo, descubrimiento o producción de productos farmacéuticos. El objetivo de desarrollar métodos por esta técnica es el de obtener métodos de cuantificación más exactos.

El desempeño de un método es sumamente importante para tener la certeza de los resultados obtenidos durante la cuantificación de un compuesto, es por eso que la validación de los métodos cromatográficos es un punto importante en el desarrollo de la metodología. La validación es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) de la siguiente manera *“Es el acto documentado de probar que cualquier procedimiento, equipo, proceso, material, actividad o sistema conduce realmente al resultado esperado”* de aquí la importancia de cumplir con esta actividad. La *United States Pharmacopeia* (USP) ha definido la necesidad de validar los métodos cromatográficos, estableciendo parámetros y características para el desempeño analítico, y los estudios requeridos para este fin.

Los polielectrolitos hidrofílicos son un grupo particular de “geles inteligentes” que tienen características interesantes cuando se habla de liberación de fármacos dependiente de pH. Estos materiales tienen un equilibrio entre las repulsiones de las cargas y las interacciones hidrofóbicas. Cuando el material está no ionizado las propiedades hidrofóbicas predominan dando como resultado un bajo contenido de agua (estado “no hinchado”), un cambio en el pH del medio provoca cambios en los estados de ionización de los grupos lábiles al pH, permitiendo la repulsión electrostática. Esta repulsión supera las interacciones hidrofóbicas y

produce un aumento considerable en su contenido de agua (estado hinchado). Los cambios en el hinchamiento producen aumentos considerables en la difusividad de los solutos permitiendo un control en la liberación [3].

Licea A. *et. al* han reportado metodologías para sintetizar nuevos monómeros, derivados de ácido metacrílico conteniendo grupos fenólicos con diferentes sustituciones de grupos carboxílicos (Figura 1.1.) [4], esta metodología ha sido comparada con la reportadas previamente.

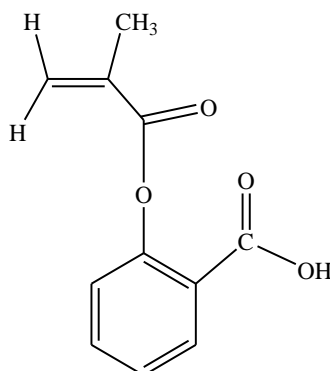


Figura 1.1. Metacrilato de carboxiarilo.

En este trabajo se propone desarrollar sistemas de liberación controlada a base de polímero anfifílicos con metacrilatos de carboxiarilo y copolimerizando con diferentes proporciones de un polímero hidrofílico como el ácido metacrílico para manejar los pH de transición de manera que mas convengan, estudiar la velocidad de liberación de un fármaco modelo (salicilamida) y evaluar la hidrólisis del polímero sintetizado a pH's fisiológicos de manera *in vitro* utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución.

1.2 Objetivo general

El objetivo de este trabajo es desarrollar sistemas de liberación controlada a base de polímeros anfifílicos derivados del ácido salicílico. Estudiar el efecto del pH en la transición del hinchamiento. Estudiar la liberación de un fármaco modelo (salicilamida) para evaluar el comportamiento en condiciones *in vitro* y la hidrólisis del grupo salcilito en medios con diferente pH, a partir de los geles de metacriloioloxi-o-benzoico, y geles copoliméricos de matacrliloxibenzoico y ácido acrílico.

1.2.1 Objetivos específicos

a) Sintetizar un monómero por esterificación de ácido metacrílico con ácido salicílico y utilizarlo como materia prima para la obtención de los geles.

b) Obtención de un gel anfifílico utilizando como base el material el monómero sintetizado, así como copolímeros con un monómero hidrofílico (ácido acrílico).

c) Estudiar el comportamiento del hinchamiento de los geles a diferentes valores de pH.

d) Estudiar la liberación de un fármaco (salcilamida) en tres valores de pH (1.2, 6.8 y 7.4).

e) Estudiar la hidrólisis de los grupos esterés en el gel sintetizado a diferentes pHs.

1.3 Metas

a) Obtener un monómero derivado del ácido salicílico.

b) Obtener geles en forma de disco en base al monómero sintetizado y geles copoliméricos.

c) Estudiar la transición al hinchamiento de los geles con diferentes valores de pH.

d) Estudiar la liberación de un fármaco modelo.

e) Estudiar la hidrólisis del polímero sintetizado a dos valores de pH fisiológicos.

1.4 Hipótesis

Los geles del ácido metacrililoil *o*-benzoico son sensibles al pH y pueden ser utilizados para la liberación de fármacos. La hidrólisis del grupo salicílico (ácido *o*-benzoico) permite la liberación simultánea de este fármaco.

Capítulo 2

Antecedentes

2.1 Sistemas de liberación

La necesidad de realizar formas farmacéuticas deriva de la importancia de administrar dosis pequeñas de fármacos con potencias altas a pacientes de tal manera que sean seguras. La mayoría de los fármacos son administrados en cantidades de miligramos que no pueden ser tomadas por un paciente, es por esto que se preparan formas farmacéuticas como tabletas o cápsulas utilizando diluyentes, dando como resultados unidades de dosis que pueden ser tomadas con las manos. Otras razones importantes son:

- La protección del principio activo de la atmósfera.
- La protección del principio activo del ambiente gástrico después de su administración.
- Para obtener una acción óptima del fármaco en aplicaciones tópicas.
- Para poder introducir el fármaco en orificios corporales.
- Para introducir el fármaco directo a circulación sanguínea.
- Para obtener la acción farmacológica optima a través de la inhalación.

Las variaciones en la actividad biológica de un fármaco pueden ser provocadas por la velocidad que se encuentra disponible en el organismo. En muchos casos la velocidad de disolución o el tiempo que el fármaco que tarda en disolverse en el sitio de absorción es el paso limitante del proceso de absorción. Cuando esto aplica las variaciones en la velocidad de disolución afectan la absorción. Por consecuencia la velocidad de disolución puede afectar el comienzo, intensidad y duración del efecto y controlar totalmente la biodisponibilidad del fármaco.

Para que un fármaco sea absorbido primero tiene que estar disuelto en el fluido del sitio de absorción. De esta manera un fármaco administrado, de manera oral, en una cápsula o comprimido se absorbe hasta que la partícula del fármaco es disuelta por el fluido en alguna parte de tracto gastrointestinal. La disolución es el proceso por el cual una partícula del fármaco es disuelta.

2.1.1 **Sistemas de liberación convencional**

Las formas farmacéuticas convencionales como sistemas de liberación inmediata están diseñadas para liberar el fármaco inmediatamente después de la administración para obtener una acción rápida y una absorción sistémica completa. Estos sistemas de liberación necesitan múltiples dosis diarias para obtener los efectos terapéuticos deseados. Las dosis múltiples a menudo no son convenientes para el paciente ya que resultan en la omisión de dosis y a su vez que el paciente no cumpla con el régimen de dosificación. Otra de sus desventajas se presenta en los niveles sanguíneos ya que cuando son tomadas múltiples dosis diariamente de formas farmacéuticas de liberación inmediata, existen picos y valles en los niveles sanguíneos terapéuticos asociados con la toma de cada dosis.

2.1.2 **Sistemas de liberación sostenida**

Con el desarrollo de la tecnología en el área de biomateriales se han desarrollado sistemas de liberación de fármacos más predecibles y precisos, con gran eficacia, obteniendo blancos más específicos evitando las desventajas de los sistemas de liberación inmediata. Estos sistemas se les ha llamado sistemas de liberación controlada y han ofrecido grandes ventajas sobre los sistemas comunes de entrega de agentes bioactivos. Los primeros sistemas de liberación controlada se diseñaban a base de recubrimientos de gelatina y azúcares con el fin de proteger la sustancia activa del medio ambiente o para enmascarar el sabor entre otras cosas, hoy en día tienen diferentes aplicaciones como el retraso, prolongación, mantenimiento y liberación sostenida de sustancias activas.

Los geles son materiales que al ser expuestos a un exceso de agua son capaces de absorber este líquido rápidamente y retener grandes volúmenes en sus estructuras. Estos materiales no se disuelven en agua y mantienen una red tridimensional; usualmente están compuestos por moléculas de polímeros hidrofílicos que están entrecruzados por enlaces químicos u otras fuerzas de cohesión como interacciones iónicas, puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas. Los hidrogeles se han clasificado en dos tipos: a) "físicos" que se componen de redes que están unidas por fuerzas moleculares tales como; iónicas, puentes de hidrógeno o fuerzas hidrofóbicas y b) los hidrogeles "químicos" que están formados por redes entrecruzadas con enlaces covalentes.

En las últimas décadas se han desarrollado polímeros que responden a cambios en una de sus propiedades (fase, forma, propiedades ópticas o mecánicas, velocidad de permeación, etc.), a estímulos externos ya sean físicos o químicos como pH, temperatura, campo eléctrico, iones, luz visible o UV, disolventes, reactantes, etc. (**Figura 2.1.**) [2].

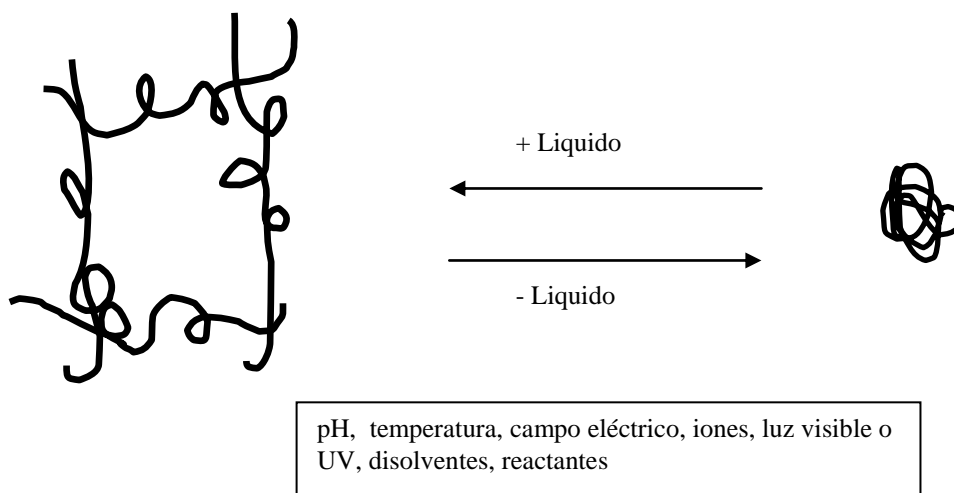


Figura 2.1. Representación de un gel sensible.

Los esfuerzos multidisciplinarios de la investigación sobre polímeros han desarrollado nuevos materiales con los que se diseñan nuevos sistemas de liberación. Estos se han utilizado en diferentes áreas como la agricultura, horticultura, comunicaciones, sellantes, desecantes industriales y en el área biomédica como biosensores, músculos artificiales, ingeniería de tejidos y como sistemas de liberación de fármacos [2,3].

La entrega de medicamentos en sitios específicos como el colon es ventajosa en el tratamiento de enfermedades de intestino grueso como síndrome de colon irritable, colitis, enfermedad de Cronh, cáncer de colon o infecciones intestinales. En estas enfermedades es necesario mantener altas concentraciones de fármaco en el intestino, utilizando sistemas de liberación tradicionales esto no es posible, ya que el fármaco queda expuesto al ambiente fisiológico del tracto gastrointestinal alto, en el que por diferentes mecanismos la disponibilidad del fármaco es alterada y no se permite que llegue de manera adecuada al sitio de acción, disminuyendo su efecto terapéutico. Los sistemas de liberación en sitios específicos como el colon son difíciles de diseñar por la posición anatómica de este órgano. Polímeros a base de HEMA y ácido metacrílico; polietilenglicol y otros polímeros han sido utilizados para la liberación de fármacos en colon [4,5], se ha observado que la combinación de los materiales

y el cambio en las proporciones del copolímero, afectan las propiedades de hinchamiento, dando la posibilidad de ajustar los geles de la manera más conveniente.

2.2 Polímeros sensibles al pH

Los hidrogeles que responden a estímulos como la temperatura han sido estudiados ampliamente para controlar la liberación de fármacos y macromoléculas en pulsos [7].

Los polielectrolitos hidrofílicos son un grupo particular de “geles inteligentes” que tienen características interesantes cuando se habla de liberación de fármacos dependiente de pH. Estos materiales tienen un equilibrio entre las repulsiones de las cargas y las interacciones hidrofóbicas. Cuando el material está no ionizado las propiedades hidrofóbicas predominan dando como resultado un bajo contenido de agua (estado “no hinchado”), un cambio en el pH del medio provoca cambios en los estados de ionización de los grupos lábiles al pH, permitiendo la repulsión electrostática este repulsión supera las interacciones hidrofóbicas y produce un aumento considerable en su contenido de agua (estado hinchado). Los cambios en el hinchamiento producen aumentos considerables en la difusividad de los solutos permitiendo un control en la liberación [5,3].

Cuando se investigan las aplicaciones de los polímeros en base a su respuesta al pH, ajustar el pH crítico al cual ocurre la transición se vuelve un factor importante, debido a que las diferencias del pH en los fluidos corporales pueden ser usados como detonadores de la liberación en un sitio específico, por ejemplo el tracto gastrointestinal.

El intervalo de pH en el que ocurre una transición reversible, puede ser regulada seleccionando una sección de la molécula con un pKa que coincida con el intervalo de pH que se desea [8] o incorporando una sección hidrofóbica en el esqueleto del polímero. Lo último que se ha estudiado es la copolimerización de ácido o bases débiles o bases con monómeros no ionizables como los n-alquil metacrilatos [5,9]. La introducción de dominios hidrofóbicos y grupos ionizables en el mismo monómero también ha sido propuesta para modificar la transición al pH [9].

2.3 Metacrilatos de carboxiarilo

Licea A. *et al* han reportado metodologías para sintetizar nuevos monómeros, derivados de ácido metacrílico conteniendo grupos fenólicos con diferentes sustituciones de

grupos carboxílicos (**Figura 2.2.**) [4], esta metodología ha sido comparada con la reportadas previamente.

La síntesis de estos monómeros se basa en la alta reactividad de la N,N'-dimetilaminopiridina como catalizador de la acilación, el paso clave en esta reacción es la formación de la sal de N-acilpiridinonio como un par iónico altamente activo con el metacrilato, mientras la trietilamina actúa neutralizando el ácido metacrílico formado simultáneamente. El grupo acilo formado es activado por deslocalización de cargas y es fácilmente atacado por un nucleófilo. Los anhídros carboxílicos son mejores para estas acilaciones que los cloruros de acilo correspondiente.

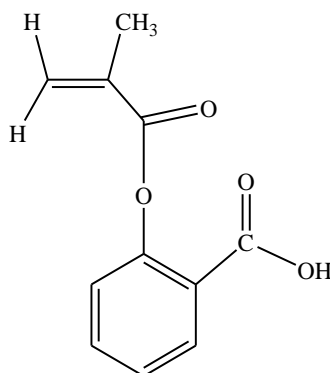


Figura 2.2. Metacrilato de carboxiarilo.

2.4 Salicilamida

Salicilamida es el nombre común de la o-hidroxi benzamida (Figura 2.3.), es un fármaco de libre venta con propiedades analgésicas y antipiréticas. Sus usos terapéuticos son similares a los de la aspirina y es utilizada en combinación con aspirina y cafeína para terapia contra el dolor. Con un peso molecular de 137.13 g/mol, DL50 en rata de 1, 890 mg/Kg, punto de fusión de 140 °C, pKa 15.45 y solubilidad en agua de 7.82 g/L.

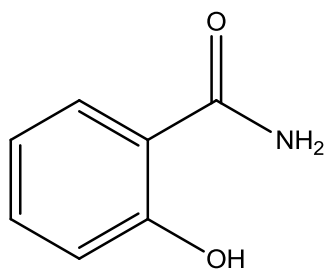


Figura 2.3. Salcilamida

2.4.1 **Mecanismo de acción**

No se conoce muy bien el mecanismo de acción de la salcilamida ya que este fármaco no es hidrolizado a salicilato y por lo tanto no tiene efectos en la síntesis de las prostaglandinas. Por otra parte, la salcilamida tiene un cierto efecto depresor sobre el sistema nervioso central y un efecto sedante propio que la diferencian de los salicilatos tradicionales.

2.4.2 **Farmacocinética**

Después de su administración oral, la salcilamida se absorbe muy bien en el tracto digestivo, siendo su biodisponibilidad próxima del 95%. Las concentraciones máximas en el plasma se obtienen 1 hora después de su administración. El fármaco se une a las proteínas del plasma pero en proporciones menores que los salicilatos. Se distribuye rápidamente en todos los compartimentos corporales con un volumen de distribución superior al de los salicilatos. El tiempo de vida media se sitúa entre las 1 y 2 horas.

La salcilamida se elimina en forma de conjugados, sobre todo sulfatos y glucurónidos. Los primeros se forman durante el proceso de absorción intestinal, dependiendo de las dosis administradas y de la forma de administración. Los glucurónidos se forman en el hígado donde la salcilamida es hidroxilada primero a gentisimida, conjugándose seguidamente. Los metabolitos glucurónidos y sulfatos se eliminan en un 95-99% por vía renal. Sólo el 1% de la dosis administrada se elimina como salcilamida libre.

2.4.3 **Indicaciones y posología**

La salicilamida se administra por vía oral, casi siempre asociada a otros fármacos. Como analgésico se han administrado dosis de 500 mg a 2 g tres veces al día. Como anti-inflamatorio, se han llegado a administrar hasta 10 g. al día. La salicilamida es un fármaco relativamente débil y se administra siempre en combinación con otros fármacos con los que se potencia su acción. En combinación con vitamina C y antihistamínicos, la salicilamida forma parte de algunos preparados antigripales

2.5 Cromatografía líquida de alta resolución

En la industria farmacéutica moderna la cromatografía de líquidos de alta resolución es la herramienta más utilizada durante el desarrollo, descubrimiento o producción de productos farmacéuticos nuevos. El objetivo es desarrollar métodos de cuantificación más robustos para alcanzar la optimización de los métodos ajustando los parámetros necesarios obteniendo de esta manera cromatografías más rápidas y cuantificaciones más exactas.

La cromatografía se basa en la fuerza de transporte de un líquido (fase móvil) que contiene una mezcla de analitos, a través de un material poroso (fase estacionaria) resultando en diferentes tiempos de migración de los componentes de la mezcla de analitos. Esta característica se debe a que los analitos están dispersos en la fase móvil presentando una migración uniforme con interacciones entre la fase móvil y la fase estacionaria lo que dará la discriminación entre los analitos.

La naturaleza tanto de la fase estacionaria como de la fase móvil junto con el modo de transporte a través de la columna, es lo que define las características del tipo de cromatografía.

2.5.1 Tipos de cromatografía

La fase móvil puede ser líquida o gas por lo cual podemos clasificarla en Líquida (CL) o Gas (CG). Aparte de estos métodos existen otros dos tipos de CL que se clasifican por la manera de transporte a través de la fase estacionaria que puede ser por fuerza capilar en la Cromatografía de Capa Fina (TLC) o flujo electroosmótico como en la electrocromatografía capilar (CEC).

La otra manera de clasificar es en base a las características de la fase estacionaria, en la CG puede ser líquida o sólida con la que distinguimos Gas-Líquido y Gas-Sólido.

La CL también se presenta con las mismas características en fase estacionaria, siendo la más conocida es la fase Líquido-Sólido, la cual se compone por una fase estacionaria polar (CaCO_3 o sílice porosa) y una fase móvil no polar, o una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar la cual cambian las interacciones polares entre analito y fase estacionaria a interacciones hidrofóbicas, a esta última se le denomina “fase reversa” por ser la contraria a la primera desarrollada “fase normal”.

Otro tipo de cromatografía que se basa en la interacción iónica del analito con la fase estacionaria es la llamada cromatografía de intercambio iónico, la cual se caracteriza por la interacción de analito con los contraiones enlazados en la fase estacionaria.

La cromatografía de exclusión por tamaño no presenta interacciones entre el analito y ninguna de las fases y la separación se basa en la dimensión física (tamaño).

La cromatografía de interacción iónica se sitúa entre la cromatografía de fase reversa y la cromatografía de intercambio iónico. La introducción de iones anfifílicos o liofílicos en la fase móvil provoca su adsorción en la fase estacionaria resultando en una cromatografía de pseudo intercambio iónico. Los compuestos anfifílicos son generalmente compuestos con una cadena alquílica relativamente larga y un gran grupo cargado al final de su cadena. Estas sustancias son surfactantes y contiene una gran carga localizada. En el sistema cromatográfico estas moléculas se localizan en la interface entre la fase estacionaria y la fase (eluyente) orgánica/agua. La parte cargada permanece en dirección hacia el eluyente y la parte hidrofóbica es adsorbida por la fase estacionaria. Este tipo de cromatografía es ventajosa cuando se necesitan separar compuesto muy hidrofílicos o no pueden ser retenidos en la columna cromatográfica por otros medios como el cambio del pH en la fase móvil, la polaridad del componente orgánico o la fase estacionaria. La desventaja es que algunos modificadores pueden fijarse permanentemente en la fase estacionaria.

2.5.1.1 Cromatografía fase reversa

La cromatografía líquida de alta resolución ha sido una técnica muy útil para la separación de moléculas y ampliamente utilizada para el desarrollo de métodos para la separación de fármacos.

La cromatografía líquida en fase reversa permite separar moléculas en base a su polaridad. El principio de la cromatografía en fase reversa se basa en que la fase estacionaria

es de partículas de sílica químicamente modificadas con hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos de diferentes tipos. Esto convierte a la fase estacionaria en una matriz no polar. Por lo tanto, para este tipo de cromatografías se emplean mezclas de solventes polares, tales como agua, acetonitrilo, acetato de etilo, acetona y alcoholes alifáticos.

Las moléculas se retienen en la columna en virtud de las interacciones hidrofóbicas que establecen con la sílica modificada. Aunque, las interacciones hidrofóbicas son en general bastante débiles, son también a menudo muy numerosas y para eluir las moléculas es casi siempre necesario disminuir la polaridad del disolvente; para ello se puede substituir el agua de la fase móvil con un solvente orgánico cuya concentración se va aumentando gradualmente.

2.6 Validación de métodos cromatográficos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la validación de la siguiente manera “*Es el acto documentado de probar que cualquier procedimiento, equipo, proceso, material, actividad o sistema conduce realmente al resultado esperado*” de aquí la importancia de cumplir con esta actividad. La *United States Pharmacopeia* (USP) ha definido la necesidad de validar los métodos cromatográficos estableciendo parámetros y características para el desempeño analítico, y los estudios requeridos para este fin. La USP ha dividido los métodos en cuatro categorías de acuerdo a sus necesidades de validación.

Las categorías de métodos USP se refiere a los tipos más comunes de análisis, que son requeridos para la validación.

Las características de desempeño analítico se refieren a las características por las que un método analítico define su desempeño como una técnica analítica. La USP identifica estas características como exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad e intervalo e indica que estas deben ser evaluadas durante la validación del método. Además frecuentemente son requeridas pruebas adicionales como la prueba de robustez, adecuabilidad del sistema, estudios de degradación forzada, estudios de estabilidad, estudios de retención del filtro y la eficiencia de extracción, las definiciones de cada término y como son determinados durante la validación se presentan en la **Tabla 2.1**.

Tabla 2.1. Características del desempeño analítico.

Pruebas de validación	Determinación durante la validación
Exactitud (recobro)	Son muestras preparadas (placebos enriquecidos) normalmente cubriendo del 50% al 150% del valor nominal. Se calcula el recobro de cada muestra.
Precisión:	
Repetitividad (precisión del método)	Se analizan múltiples replicas de una muestra usando el método analítico. Se calcula el recobro.
Precisión intermedia	Un segundo analista repite el análisis en un día diferente usando diferentes condiciones y diferentes instrumentos. Se hace una comparación estadística con los primeros resultados.
Especificidad	Se analizan blancos, matrices (placebo) y compuestos relacionados para determinar la interferencia dada. También se determina el factor de respuesta relativa.
Límite de detección (LOD)	En procedimientos en los cuales se observe ruido en la línea base, el LOD se puede basar en el coeficiente de señal-ruido (3:1), que es expresado usualmente como concentración de analito presente en la muestra.
Limite de cuantificación (LOQ)	Para los procedimientos que muestran ruido en la línea base el LOQ es determinado con el cociente señal-ruido (10:1).
Linealidad	La linealidad puede ser establecida para todas las sustancias activas, conservadores e impurezas esperadas. Esta prueba se determina con estándares.
Intervalo	Se evalúa usando muestras (conocido como linealidad del método) enriquecidas y el intervalo especificado debe abarcar la concentración de fármaco en la muestra.

Continuación... Características del desempeño analítico.	
Determinación de adecuabilidad del sistema	Cuando es aplicable, estos parámetros son calculados grabados y evaluados en todo el curso de la validación.
Estudios de degradación forzada	Muestra del producto (placebo enriquecido) y sustancia activa son expuestos a luz, calor, ácido, base y agentes oxidantes para producir un 10%-30% de degradación del activo. Las muestras degradadas son analizadas para determinar si hay interferencia con el activo o compuestos relacionadas.
Estabilidad de las soluciones	La estabilidad es determinada comparando la respuesta y un perfil de impurezas a partir de un estándar viejo o muestra recientemente preparadas comparadas con sí misma en diferentes tiempos.
Estudio de retención del filtro	Muestra, blanco, y soluciones estándar son analizadas filtradas y sin filtrar. La comparación se hace de acuerdo al recobro.
Estudio de la eficiencia de extracción	Se investiga la eficiencia de extracción variando los tiempos de agitación o sonificación durante la preparación de la muestra del producto farmacéutico.

La definición cada categoría de la USP y las características correspondientes del desarrollo analítico y los requisitos adicionales de la validación son mostrados en la **Tabla 2.2**.

Tabla 2.2. Categoría de métodos USP

Prueba de Validación	Categoría				
	I Ensayo	II Prueba cuantitativa: Compuestos relacionados	II Prueba de límites: Compuestos relacionados	III Disolución	IV Identificación
Exactitud (recobro)	Si	Si	*	*	No
Precisión					
Repetitividad (precisión del método)	Si	Si	No	Si	No
Precisión intermedia	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
Límite de detección	No	Si	Si	*	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Intervalo	Si	Si	*	*	No
Prueba de robustez	Si	Si	No	*	No
Determinación de adecuabilidad del sistema	Si	Si	Si	Si	Si
Estudios de degradación forzada	Si	Si	No	No	No
Estabilidad de las soluciones	Si	Si	Si	Si	Si
Estudio de retención del filtro	Si	Si	Si	Si	Si
Estudio de eficiencia de extracción	Si	Si	*	No	*

*Puede ser requerido

Capítulo 3

Experimental

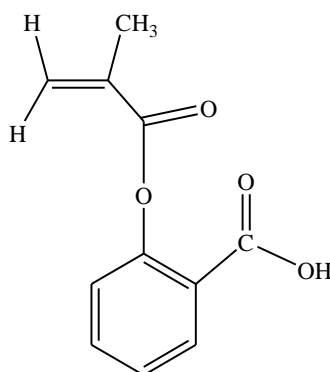


Figura 3.1. Ácido 2-metacrililoiloxibenzoico

3.1 Síntesis de monómero (ácido 2-metacrililoiloxibenzoico)

En la síntesis de este monómero se utilizó la adaptación de una técnica previamente reportada. [4]

Se ensambló un equipo compuesto por un matraz bola de 2 bocas de 500 ml al cual se le adaptó un termómetro y un septúm, el sistema se montó sobre un baño de hielo con NaCl. Se acondicionó el sistema bajo una atmósfera inerte de argón y se agregó el ácido salicílico, el catalizador 4-(dimetilamino) piridina y el diclorometano, se mantuvo en agitación hasta disolver, enseguida se agregó la trietilamina y se dejó que la temperatura disminuyera hasta 0°C, y posteriormente se agregó el anhídrido metacrílico por goteo lento con la ayuda de una bomba de adición manteniendo la temperatura por debajo de 0°C durante este intervalo de tiempo. La reacción se dejó con agitación continua a temperatura ambiente por 24 horas.

Para realizar la purificación del monómero, en un embudo de separación se hicieron 3 extracciones con HCl 2 N (100ml aprox.) para neutralizar el exceso de trietilamina y se recuperó la fase orgánica, la cual se dejó evaporar por una noche en el refrigerador. El sólido

obtenido se filtró al vacío y se le hicieron lavados intercalados con 150 ml de agua a 40°C y 150 ml de éter de petróleo. El producto se dejó secar por una noche.

3.2 Optimización de la reacción para síntesis del ácido metacrililoioxibenzoico (AMOB)

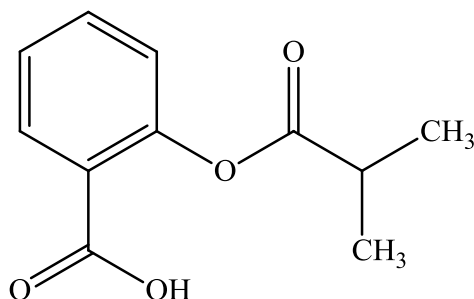


Figura 3.2. Estructura de monómero AMOB.

Para la optimización de la reacción se utilizaron 30ml de diclorometano y 12 ml de TEA como disolventes, 0.1014g (8.3×10^{-4} moles) de DMAP. Se variaron las cantidades de los reactivos (anhidro metacrílico-ácido salicílico) utilizando relaciones molares 1:1, 1:1.3, 1:1.6 (**Tabla 3.1.**).

Tabla 3.1. Rendimiento de reacción vs relación molar de Ac. Salicílico

Relación	Anhidro metacrílico (moles)	Ácido salicílico (moles)
1:1	6.72×10^{-3}	6.72×10^{-3}
1:1.3	6.49×10^{-3}	8.4×10^{-3}
1:1.6	6.49×10^{-3}	10.38×10^{-3}

Se tomo la relación molar en la que se obtuvo el mayor rendimiento y se hicieron reacciones variando los tiempos de adición en 1 y 3 horas (**Tabla 3.2.**).

Tabla 3.2. Rendimiento vs tiempo de adición.

Tiempo de adición (horas)	Anhidro metacrílico (moles)	Ácido salicílico (moles)
1	6.49×10^{-3}	10.38×10^{-3}
3	6.49×10^{-3}	10.38×10^{-3}

Los productos se caracterizaron, mediante técnicas ya reportadas de resonancia magnética nuclear (RMN) e infrarrojo (IR), y espectrometría de masas.

3.3 Obtención de los geles a base de AMOB.

Se obtuvieron geles homopoliméricos de AMOB con dos proporciones de entrecruzante y geles copoliméricos de AMOB y diferentes proporciones de ácido acrílico. La composición de los geles se presenta en la tabla 3.3

Tabla 3.3. Nomenclatura y porcentaje de reactivos utilizados para la síntesis de los geles.

Reactivo	p-AMOB	c-A15	c-A30	p-AMOBE
AMOB	98.16%	83.43%	68.71%	96.3%
Dimetacrilato de etilenglicol	1.86%	1.86%	1.86%	3.7%
Ácido Acrílico	-	14.71%	29.43%	-

Nota: Los porcentajes están dados en porcentajes molares.

Para la obtención del polímero se usaron las cantidades que se especifican en la **Tabla 3.4.**

Tabla 3.4. Cantidad de reactivos utilizados para la síntesis de los geles

Reactivo	p-AMOB	c-A15	c-A30	p-AMOB
AMOB	5.3 g	4.99 g	4.6 g	5.19 g
AIBN	0.040105 g	0.040105 g	0.040105 g	0.040105 g
Dimetacrilato de etilenglicol	0.0922 ml	0.0922 ml	0.0922 ml	0.181 ml
DMSO	7 ml	7 ml	7 ml	7 ml
Ácido Acrílico	-	0.293 ml	0.658 ml	-

Además del monómero sintetizado se utilizó ácido acrílico como copolímero, azoisobutironitrilo como iniciador, dimetacrilato de etilenglicol como entrecruzante y dimetil sulfóxido como solvente. En un matraz schlenck se mezclaron la cantidad de reactivos correspondientes, se sometieron a agitación por 15 min, enseguida la mezcla se purgó 3 veces a presión reducida, utilizando argón y vacío de manera secuencial en un baño de hielo y sal. La mezcla se vertió en el sistema de placas de vidrio. La polimerización del gel se llevó a cabo dentro de una estufa a una temperatura de 60 °C por 24 h.

Transcurrido el tiempo se retiró el sistema de la estufa, se desarmó el sistema y se separaron las placas con cuidado para no romper el gel, este se separó de la placa de vidrio levantándolo con cuidado y se colocó en un cristizador con dimetilsulfoxido cambiándolo cada 8 horas por 24 horas, posteriormente se hicieron lavado con el mismo intervalo de tiempo con DMSO:Agua con proporciones de 75:25, 50:50, 25:75, los geles húmedos se cortaron en forma de disco con un horador de 8 mm de diámetro para finalizar con un lavado de agua 100% y se secaron al vacío a 40°C durante 24 h.

3.4 Prueba de Hidrólisis

Se colocó 2 g de gel p-AMOB en una solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 por 5 días, la solución se acidificó con HCl 2N, enseguida se hicieron extracciones con diclorometano, se obtuvo un sólido blanco se seco al vacío por 24 h. El sólido obtenido de la prueba de hidrólisis se caracterizó por las técnicas descritas anteriormente. FT-IR 3200-3000 (COOH), 1661.52 (C=O). m/z 137.97, 92.08 (pico base).

3.5 Prueba de de hinchamiento (Q) contra el tiempo (t)

Se prepararon 3 soluciones amortiguadoras con fuerza iónica de 0.1 y a pH 1.2, 6.8 y 7.4. Se rotularon viales con los valores de pH a utilizar y se colocaron en estos 15 ml del amortiguador correspondiente. Se peso un gel y se colocó en el vial previamente llenado con la solución amortiguadora, esto se realizó para las 3 series de geles, pAMOB, c-A15 y c-A30 . Se colocaron en un agitador a 50 rpm a 25 ° C y se tomaron muestras cada 15 min durante la primera hora y después cada 2, 4, 8, 16 y 24h. Se tomaron muestras de cada gel retirándolo del medio, se retiró el exceso de agua en la superficie del mismo con un papel absorbente, enseguida el material fue pesado y devuelto al vial correspondiente. Se calculó Q para las 3 series.

3.6 Preparación de las soluciones amortiguadoras con fuerza iónica de 0.05

Se seleccionó el acido débil con un pka aproximado al pH que se usará en el amortiguador (**Tabla 3.5**). Se calculo la relación de base/ácido necesaria para el pH indicado. Se consideró la concentración de las sales y los ácidos para generar una buena capacidad amortiguadora. La concentración de sales utilizada fue de 0.05 M

Tabla 3.5. Especies respecto a pH.

pH	Especie	pka
3	Acido fosfórico	2.15
4	Acido acético	4.74
5	Acido acético	4.74
6	Fosfato de sodio	7.09
7	Fosfato de sodio	7.09
8	Fosfato de sodio	7.09
9	Acido bórico	9.23
10	Carbonatos	10.33
11	Carbonatos	10.33

Para calcular la fuerza iónica se utiliza la formula:

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_1^i C_i Z_i^2 \quad (3.1)$$

μ =fuerza iónica

C_i =concentración de la especie

Z_i =carga de la especie ionizada

$$\mu_{Total} = \mu_1 + \mu_2 + \mu_3 \dots \quad (3.2)$$

Para calcular el pKa corregido por efecto de la fuerza iónica se usa la ecuación de Debye-Hückel:

$$pk'a = pka + \frac{0.51(2z-1)\sqrt{\mu}}{1+\sqrt{\mu}} \quad (3.3)$$

Para calcular la proporción de ácido y sal para prepara un amortiguador con cierto pH se usa la ecuación de Henderson-Hasselback [12]:

$$pH = pka + \log \frac{[sal]}{[acido]} \quad (3.4)$$

Para calcular la cantidad de sal-ácido en un buffer y ajustar su fuerza iónica se calculó el pka del ácido de acuerdo a la fuerza iónica, el factor sal/ácido, la μ que aporta la sal o el ácido y se ajustar la μ con NaCl (**Tabla 3.6**).

Tabla 3.6. Cantidades por litro de solución para la preparación de amortiguadores.

pH	Especies	Acido(g)	Sal(g)	NaCl(g)
3	CH ₃ COOH/CH ₃ COONa	2.93	0.1637	5.76
4	CH ₃ COOH/CH ₃ COONa	2.42	1.3158	5.26
5	CH ₃ COOH/CH ₃ COONa	0.8701	4.83	3.75
6	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	6.033	0.8913	2.18
7	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	2.55	3.7647	0.1145
8	H ₃ BO ₃ /Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	2.8689	1.3614	5.6
9	H ₃ BO ₃ /Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	1.7374	8.332	4.56
10	NaHCO ₃ /Na ₂ CO ₃	2.011	2.76	2.0988
11	NaHCO ₃ /Na ₂ CO ₃	0.3537	4.85	0.3687

3.7 Pruebas de hinchamiento con respecto al pH

Se prepararon 9 diferentes soluciones amortiguadoras a pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 con fuerza iónica de 0.1 con las cantidades mencionadas en la **Tabla 3.6**. Se rotularon viales con los valores de pH a utilizar y se colocaron en estos 15 ml del amortiguador correspondiente. Se colocó un gel previamente pesado en cada medio, esto se realizó para las 3 series de geles, p-AMOB, C-A15 y C-A30. Transcurridas las 24 h el gel fue retirado del medio, se retiró el exceso de agua en la superficie del mismo con un papel absorbente, enseguida el material fue pesado y devuelto al vial correspondiente y se calculó Q. Se tomaron muestra cada 24 h por aproximadamente 30 días siguiendo el mismo procedimiento para las 3 series.

3.8 Determinación de Q

El hidrogel se peso previo a la prueba a realizar, se colocó el gel en el medio de prueba. Una vez cumplido el tiempo necesario se tomó un hidrogel con una espátula de metal con cuidado de no romperlo. Enseguida se secó el exceso de agua con un papel absorbente. Inmediatamente se colocó en un vial de vidrio previamente tarado y etiquetado. El hidrogel se peso nuevamente y se determinó Q con la siguiente fórmula:

$$Q = \frac{W \text{ gel humedo} - W \text{ gel seco}}{W \text{ gel seco}}$$

Siendo:

Q= grado de hinchamiento

W= peso

3.9Diseño del método analítico

Para la cuantificación del ácido salicílico hidrolizado y el profármaco se diseñó un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Se trató de separar el ácido salicílico (producto de hidrólisis) y el profármaco ABHB utilizando gradientes con amortiguador preparado con fosfatos pH 7.0 ±1, metanol en diferentes proporciones y gradientes sin obtener una buena resolución entre estos dos compuestos. Por lo tanto fue necesario cambiar el profármaco utilizado como modelo para el estudio de liberación. El fármaco utilizado es la salicilamida.

Para el método de separación de ácido salicílico y salicilamida se utilizó un amortiguador a base de fosfatos con pH 7.0 y hexadeciltrimetilamonio (cetiltrimetilamonio o cetrimonio) como surfactante para formar un contraíón dentro de la columna. Las condiciones finales del sistema se muestran en la **Tabla 3.7**.

Se logró separar eficientemente el ácido salicílico y la salicilamida cumpliendo con los parámetros de adecuabilidad del sistema.

El método diseñado se describe con detalle a continuación.

3.9.1 Preparación de la fase móvil

La fase móvil se preparó usando una proporción 75:25 de amortiguador de fosfatos (pH 5.8) a 50mM:Metanol. El amortiguador de fosfatos (pH5.8) a 50mM; se preparó pesando 6.2095g de fosfato monobásico de sodio y 0.7098 g de fosfato dibásico de sodio, se colocó en un vaso de precipitado de 1 L, se agregó agua purificada y se agitó hasta disolver. Se ajustó el pH a 5.8 con ácido fosfórico 0.2 N de ser necesario. Para preparar la fase móvil se selecciono en el instrumento de cromatografía 75% en la línea correspondiente a amortiguador y 25% en la línea correspondiente a acetonitrilo.

3.9.2 Preparación del estándar

Se preparó una solución madre pesando exactamente 10mg de 4-hidroxiácido benzoico, 10mg de salicilamida y 50mg de ácido salicílico coloque en una matraz de 100ml y diluya con amortiguador de fosfatos pH 7.0, para preparar el estándar se tomó una alícuota de 1 ml y se diluyó en 10 ml de amortiguador de fosfatos pH 7, para tener una concentración final de 4-hidroxiácido benzoico, salicilamida y ácido salicílico de 10,10 y 50 µg/ml.

3.9.3 Condiciones cromatográficas

Tabla 3.7. Condiciones cromatográficas	
Columna	Phenomenex, Luna C18, 5µm, 4.6 X 100 mm
Temperatura de columna	30 °C
Fase móvil	75:25 amortiguador de fosfatos (pH5.8) 50mM: metanol
Flujo	1.0 mL/min
Detector	UV a 215nm
Volumen de inyección	10 µL
Tiempo de corrida	10 min

El estándar y las muestras fueron analizadas como se describe en la **Tabla 3.8**, no se deben inyectar más de 10 muestras sin intercalar un estándar.

Tabla 3.8. Secuencia de la inyecciones.	
Solución de prueba	# de inyecciones
Blanco	1
Estándar principal	6
Muestra de ensayo 1	1
Muestra de ensayo 2	1
Muestra de ensayo <i>n</i>	1
Estándar principal	1

3.9.4 Adecuabilidad del sistema

Los criterios de adecuabilidad del sistema son los siguientes:

- Factor de retención: $k \geq 2.0$
- Resolución: $R \geq 1.5$
- Factor de coeio: $T \leq 2.0$
- Numero de platos teóricos: $N \geq 1000$
- Coeficiente de variación: $CV \leq 2.0\%$

3.10 Validación de método analítico

3.10.1 Linealidad

La linealidad fue demostrada preparando cinco soluciones estándar entre un intervalo de 60 a 140% de la concentración nominal de la muestra, 50 µg/ml para ácido salicílico y 10 µg/ml para salicilamida. Cada solución fue preparada por dilución de una solución madre y fue inyectada por triplicado. Se realizó el análisis de regresión lineal, excluyendo el origen.

3.10.2 Intervalo

El intervalo se demostró analizando la solución estándar en un intervalo de 80% a 120% del valor nominal de la muestra de ácido salicílico (50µg/ml) y del valor nominal de salicilamida (10µg/ml). Tres muestras fueron preparadas para cada nivel de concentración y cada muestra fue analizada. Se realizó el análisis de regresión lineal, excluyendo el origen como punto para no forzar el intercepto de la gráfica a cero.

3.10.3 Exactitud (recobro)

La exactitud y el recobro del método fueron demostrados analizando los datos obtenidos durante el desarrollo de la prueba del intervalo. El porciento de recobro de cada muestra individual y el promedio de cada nivel de concentración fue determinado.

3.10.4 Estudio de retención del filtro

Se utilizaron tres muestras de un estándar para evaluar el filtro. Las porciones obtenidas de cada muestra fueron filtradas a través de membranas para jeringa de nylon de

0.45 μm usando un volumen de 5 ml de filtrado. Las muestras fueron inyectada por triplicado y analizadas de acuerdo al método analítico. El porcentaje de recobro y el CV fueron determinados para cada muestra individual.

3.10.5 Precisión

La precisión fue evaluada en dos experimentos, la repetitividad y la precisión intermedia o reproducibilidad.

3.10.5.1 Repetitividad

La repetitividad del método fue demostrada preparando seis muestras del estándar. Las muestras fueron analizadas de acuerdo al método analítico y se determino el porcentaje de recobro para cada muestra.

3.10.5.2 Precisión intermedia

La precisión intermedia del método fue demostrada repitiendo el experimento de repetitividad por un segundo analista. Este analista uso diferentes soluciones, reactivos, condiciones de operación y realizó el análisis en diferente día del primer analista.

3.10.6 Selectividad (Especificidad)

La selectividad fue demostrada inyectando los medios de disolución que podrían causar interferencia como la fase móvil, el fluido gástrico simulado, amortiguador intestinal pH 6.8, amortiguador intestinal pH 7.4 y un cromatograma típico para confirma la especificidad.

3.10.7 Estudio de estabilidad de las soluciones

La estabilidad de las soluciones del estándar y las muestras fueron evaluadas a temperatura ambiente en frascos transparentes. Estas muestras fueron analizadas por duplicado contra la cuantificación inicial de un estándar recién preparado, en intervalos de 24 h.

3.10.8 Determinación de la adecuabilidad del sistema

Los parámetros de adecuabilidad del sistema propuestos se cumplieron durante la validación. Se tomaron los parámetros de adecuabilidad del sistema como se determinaron en

la prueba de exactitud para el pico de 4-hidroxiácido benzoico, ácido salicílico y el de salicilamida.

3.11 Cuantificación de ácido salicílico hidrolizado contra el pH

Para la cuantificación del ácido salicílico hidrolizado a diferentes valores de pH se tomaron muestras de la prueba de hinchamiento contra pH, las muestras fueron recolectadas retirando el medio totalmente (15 ml) cada siete días, se repuso el medio de cada pH correspondiente, las muestras fueron recolectadas por el mismo tiempo que duro la prueba, se recolectaron un total de 4 muestras por valor de pH correspondientes a 4 semanas. Se preparó previamente una solución madre de salicilamida y ácido salicílico a 0.1 y 0.5 mg/ml respectivamente. De la muestra tomada se tomó una alícuota de 1ml y se enriqueció con 1ml de la solución madre antes descrita se llevó a volumen de 10 ml en un matraz volumétrico con solución amortiguadora, esta solución fue filtrada por membrana de nylon de 0.45 μm e inyectada al cromatógrafo con las condiciones ya descritas.

3.12 Cargado de los geles

Se preparó una solución de salicilamida 0.2 M en metanol, se colocó un gel previamente pesado en un recipiente con tapadera, se adicionó 10 ml de la solución preparada previamente, se mantuvo en la solución por 24 h se retiró el gel de la solución, posteriormente se dejó secar al vacío por 24 h colocándose en una estufa de secado a 60°C por 24h. El cálculo de cantidad de fármaco cargado en el gel se determino por gravimetría.

3.13 Prueba de liberación de fármaco e hidrolisis

Se realizaron las pruebas de liberación en tres medios de disolución con pH diferentes, utilizando solución HCl 0.1N pH 1.2, solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 y solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. Se pesaron los geles y se calculó la cantidad de ácido salicílico y salicilamida (por diferencia de peso) en el material. La prueba se realizó en un equipo de disolución marca Varian modelo VK 7025, se sirvieron 500 ml de medio de disolución previamente desairado y se dejó equilibrar la temperatura a 37°C. Se colocaron los geles dentro de las canastas (aparato II USP), se colocó las canastillas en los ejes, se programó la velocidad de disolución a 75 rpm. Se comenzó la disolución haciendo tomas a 0.25, 0.5,

0.75, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h. El volumen de la alícuota fue de 5 ml. Se preparó previamente una solución madre salicilamida y ácido salicílico a 0.1 y 0.5 mg/ml respectivamente. De la muestra tomada se tomó una alícuota de 1ml y se enriqueció con 1ml de la solución madre, antes descrita, se llevó a un volumen de 10 ml en un matraz volumétrico, esta solución fue filtrada por membrana de nylon de 0.45 μm e inyectada al cromatógrafo con las condiciones ya descritas.

Capítulo 4

Resultados y Discusión

4.1 Síntesis de monómero (ácido 2-metacrililoiloxibenzoico)

Se obtuvo el monómero propuesto el cual fue caracterizado por FT-IR, ^1H RMN y ^{13}C RMN, obteniéndose los siguientes resultados. ^{13}C RMN (CD_2Cl_2): 168.8, 166.0, 151.28, 135.72, 134.41 132.39, 127.34, 125.95, 123.93, 18.32. ^1H RMN (CD_2Cl_2): 8.10 (dd, 1H, H-Ar), 7.61(td, 1H, H-Ar), 7.34(dd, 1H, H-Ar), 7.16(dd,1H, H-Ar), 6.35 (d, 1H, H-Vinílico),5.74 (d, 1H, H-Vinílico), 2.07(d, 3H,CH₃), FT-IR 3200-2800 (-COOH), 1741.13(C=O, éster). m/z 206.52 (Ión molecular), 188.73 (pico base).

Los resultados de la caracterización espectroscópica demuestran la obtención del producto deseado con pureza adecuada.

4.2 Optimización de la reacción

Para optimizar la reacción se variaron las cantidades de los reactivos (anhídrido metacrílico-acido salicílico) utilizando relaciones molares 1:1, 1:1.3, 1:1.6. Teniendo como resultados los descrito en la **Tabla 4.1**.

Se tomo la relación molar en la que se obtuvo el mayor rendimiento (1:1.6) demostrando la importancia de agregar el ácido salicílico en exceso para desplazar la reacción hacia los productos. Se hicieron reacciones variando los tiempos de adición entre 1 y 3 horas (**Tabla 4.2**.) encontrándose un mejor rendimiento con la menor velocidad de adición del anhídrido metacrílico demostrando que esta reacción tiene un control termodinámico.

4.3 Prueba de de hinchamiento (Q) contra el tiempo (t)

De los geles obtenidos se realizaron las pruebas de hinchamiento contra el tiempo. Se calculó $Q = (W_{\text{gel hinchado}} - W_{\text{peso de gel seco}}) / W_{\text{gel seco}}$ para las 3 series.

Para la serie p-AMOB (**Figura 4.1**.) la respuesta no fue considerable en un periodo de 24 h para los 3 pH's en los que se realizó la prueba, posiblemente la red polimérica no permite la entrada de medio por lo tanto su respuesta de hinchamiento es muy baja.

En esta prueba se observa como los la serie c-A15 (**Figura 4.2.**) muestra una respuesta considerable en cuanto al hinchamiento y un tiempo de respuesta corto a pH de 6.8 y 7.4 y una respuesta casi nula a pH 1.2, podemos asumir que la respuesta del material esta dependiendo de la presencia de los grupos ionizables aportados por el ácido acrílico.

Tabla 4.1. Rendimiento de reacción Vs relación molar de Ac. Salicílico.

Relación	% Rendimiento
1:1	28.12
1:1.3	55.6
1:1.6	91.4

Tabla 4.2. Rendimiento Vs tiempo de adición.

Tiempo de adición (horas)	% Rendimiento
1	91.4
3	93.5

Tabla 4.3. Respuesta de Q contra t.

T (Días)	pH								
	1.2			6.8			7.4		
	p-AMOB	c-A15	c-A30	p-AMOB	c-A15	c-A30	p-AMOB	c-A15	c-A30
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.25	0.0179	0.1574	0.2662	0.1337	0.7870	1.2038	0.1790	1.1376	1.7208
0.5	0.0179	0.2222	0.3766	0.2479	1.4167	2.2102	0.2557	2.1376	2.9091
0.75	0.0209	0.2870	0.4351	0.3036	1.8611	2.8217	0.3097	2.3349	3.6039
1	0.0149	0.3472	0.5325	0.3955	2.7130	3.8917	0.4602	3.6468	5.6169
2	0.0388	0.5370	0.8247	0.6880	5.5972	8.2739	0.7869	7.9450	11.3247
4	0.0866	0.6065	0.9481	1.3454	12.1065	16.8089	1.3807	16.7661	22.1104
8	0.1343	0.6528	0.9286	2.6045	25.2454	31.0955	2.4744	34.5963	39.6753
16	0.1582	0.6343	0.9675	2.9610	35.3426	39.8790	3.4744	46.6330	49.8636
24	0.1970	0.6713	1.0325	9.1337	43.9630	45.4268	14.3438	51.1422	53.4545

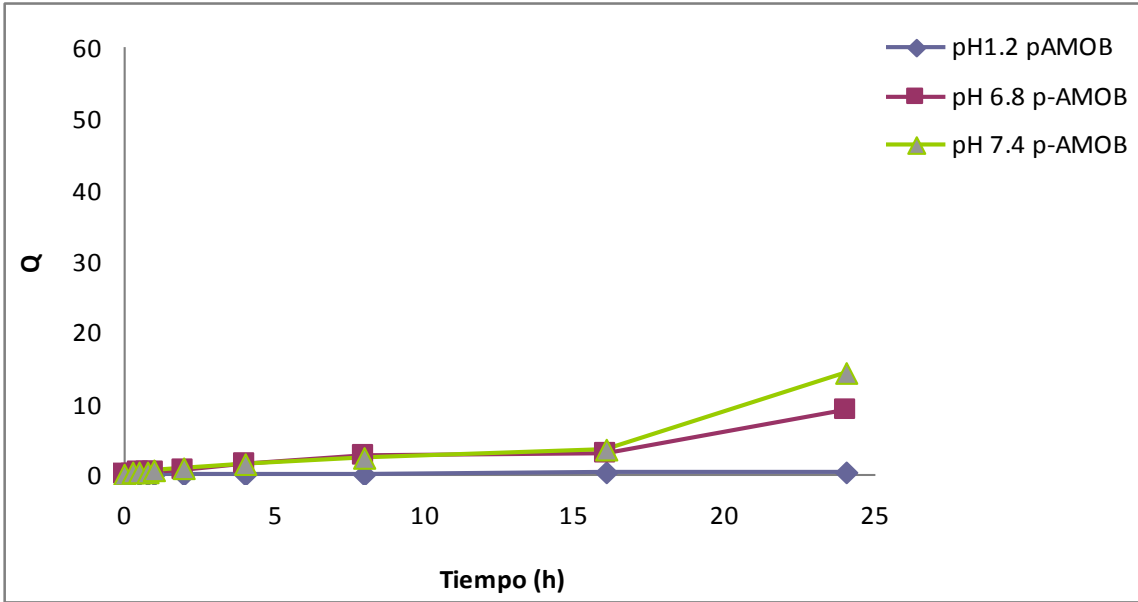


Figura 4.1. Respuesta de Q contra pH para la serie p-AMOB.

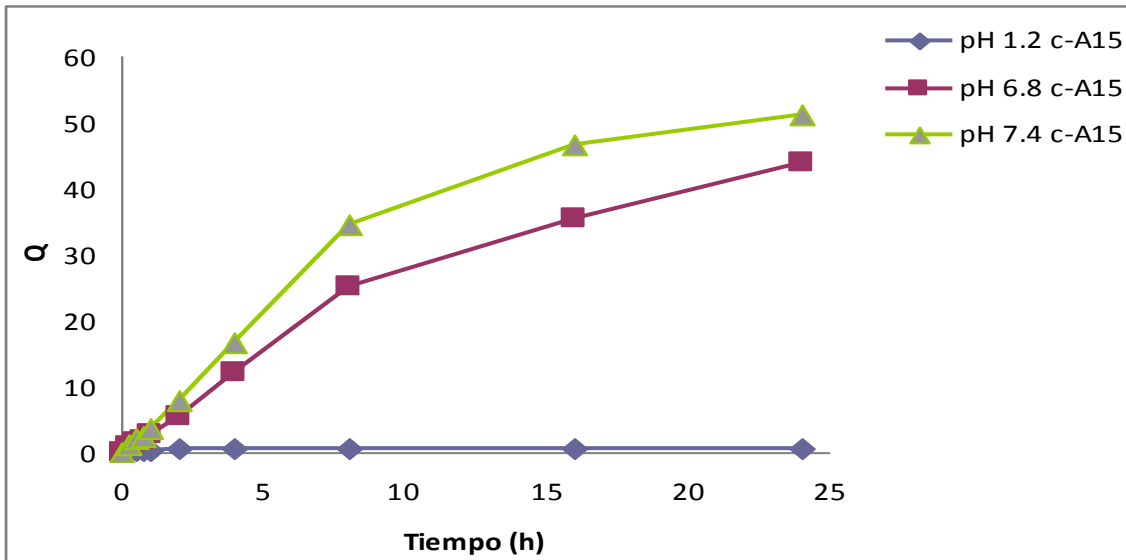


Figura 4.2. Respuesta de Q contra pH para la serie p-cA15.

Para la serie c-A30 (**Figura 4.3.**) el comportamiento es muy similar al demostrado por la serie c-A15 cuando se estudio en los mismos pH's. Con esta observación podemos suponer que los grupos polares aportados por el ácido acrílico influyen en el fenómeno del hinchamiento, y en el caso de las dos proporciones utilizadas no hay una diferencia

considerable, indicando que el ácido acrílico produce una modificación limitada en la hidrofiliidad.

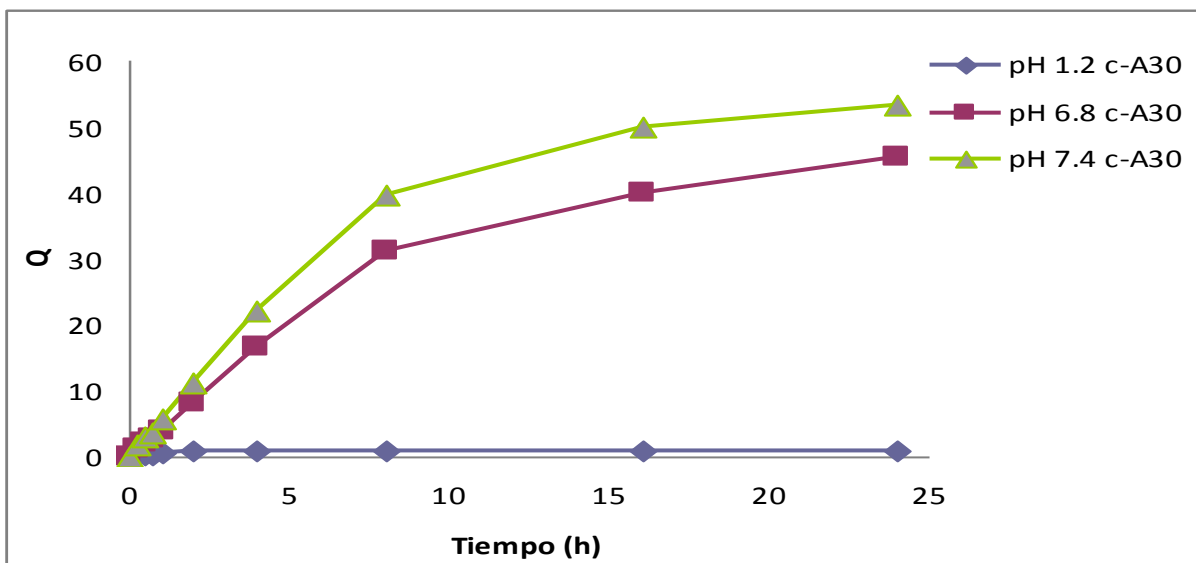


Figura 4.3. Q contra pH para la serie p-cA30.

4.4 Pruebas de hinchamiento con respecto al pH

En las pruebas de hinchamiento con respecto al pH realizadas para la serie p-AMOB (Figura 4.4.) y muestran un pH de transición de hinchamiento alrededor de 6.0. El tiempo para alcanzar el equilibrio a pH cercanos a pH 6 es alrededor de 10 días indicando que el proceso de hinchamiento es lento, sin embargo a pH de nueve en adelante el equilibrio se alcanza en un día. Esto es debido a que a mayor pH existe mayor concentración de base que permite un hinchamiento más rápido.

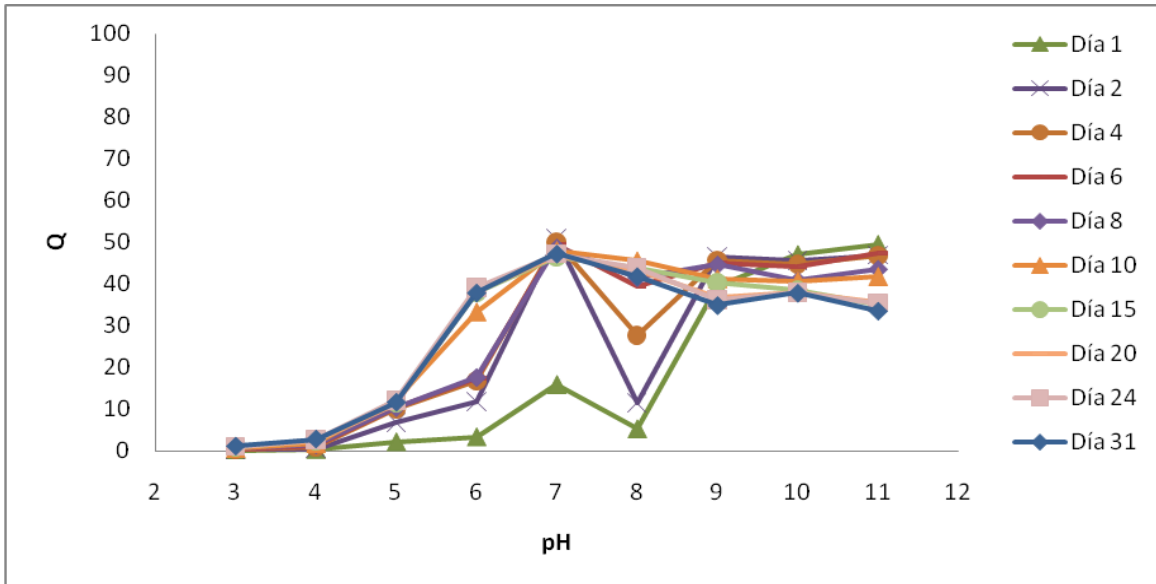


Figura 4.4. Q contra pH serie p-AMOB.

Para la series c-A15 (**Figura 4.5.**) se observa que el material alcanza el equilibrio en 6 días y muestra un pH de transición de 6.0, un comportamiento muy similar con respecto al tiempo de equilibrio y el pH de transición de la serie p-AMOB.

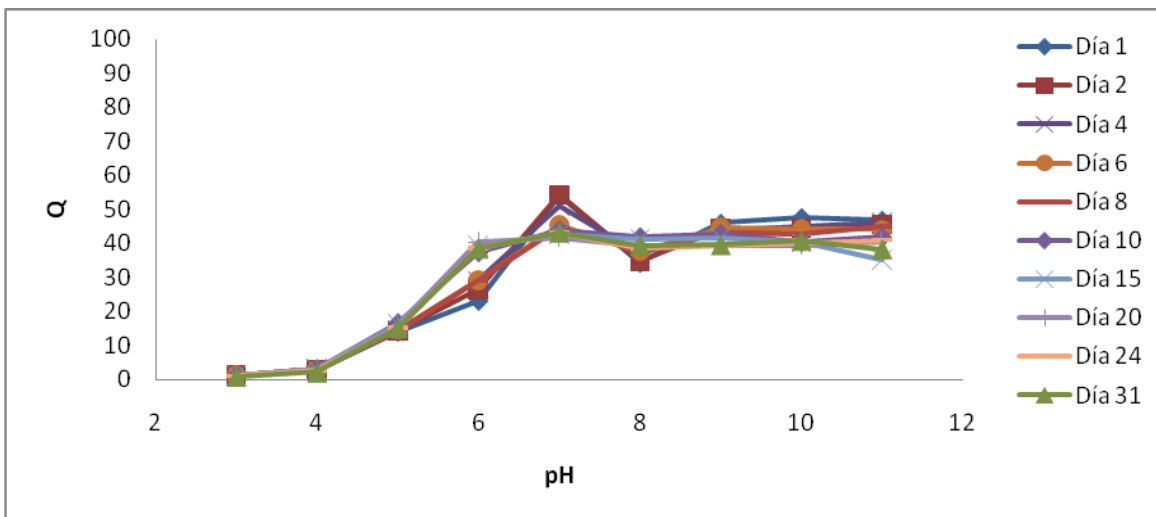


Figura 4.5. Q contra pH serie c-A15.

Para la serie c-A30 (**Figura 4.6.**) el pH de transición del hinchamiento se presento en 6.0 y el equilibrio se observa en los primeros 6 días, muy similar a las series anteriores.

Para esta dos últimas series el relativamente rápido en comparación con el p-AMOB se podría deber a los grupos hidrofílicos aportados por la copolimerización con el ácido acrílico, estos permiten la expansión de la red polimérica y por lo tanto permiten la entrada de medio al interior de la red polimérica de manera más rápida.

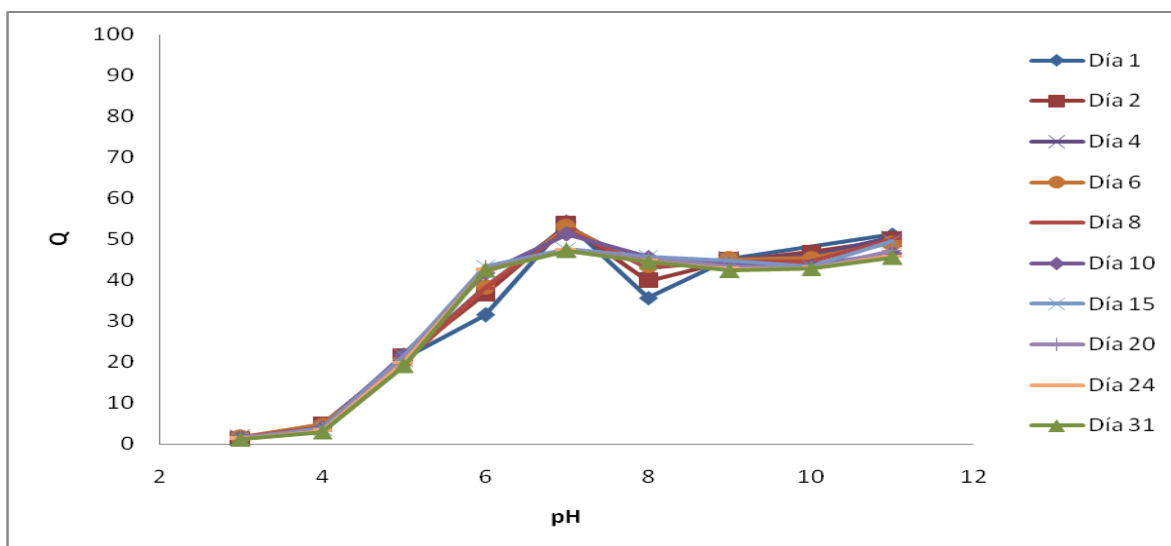


Figura 4.6. Q contra pH serie c-A30.

4.5 Validación de método analítico

4.5.1 Linealidad:

Se realizó el análisis de regresión lineal, excluyendo el origen. Los resultados para ácido salicílico y salicilamida se presentan en la tabla 4.4. y 4.5. respectivamente.

Tabla 4.4. Linealidad de la valoración de ácido salicílico.

Nivel esperado	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Respuesta	Promedio	CV
		727286		
60%	30	722397	725826	0.41
		727796		
		932232		
80%	40	933662	932548	0.11
		931751		
		1255368		
100%	50	1263791	1268337	1.24
		1285853		
		1491031		
120%	60	1480850	1480747	0.70
		1470359		
		1750346		
140%	70	1753992	1747737	0.45
		1738875		
Pendiente	25920			
Intercepto	-64971			
Coefficiente de correlación (r^2)	0.9952			
Especificaciones	El coeficiente de correlación (r^2) debe ser ≥ 0.99			

Tabla 4.5. Linealidad de la valoración de salicilamida

Nivel esperado	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Respuesta	Promedio	CV
60%	6	189933	189070	1.27
		190914		
		186364		
80%	8	252696	253431	0.35
		254404		
		253194		
100%	10	333769	332473	0.67
		329883		
		393691		
120%	12	397094	397389	0.97
		401384		
		465301		
140%	14	470030	468346	0.56
		469708		
Pendiente	35125			
Intercepto	-23112.9			
Coefficiente de correlación (r^2)	0.9991			
Especificaciones	El coeficiente de correlación (r^2) debe ser ≥ 0.99			

Todos los criterios de aceptación se cumplieron. Una gráfica de concentración contra respuesta para la linealidad de ácido salicílico se ve en la **figura 4.7**. En la **figura 4.8**, se tiene el gráfico que representa la linealidad de salicilamida. El intercepto no parte de cero en ninguna de las dos gráficas.

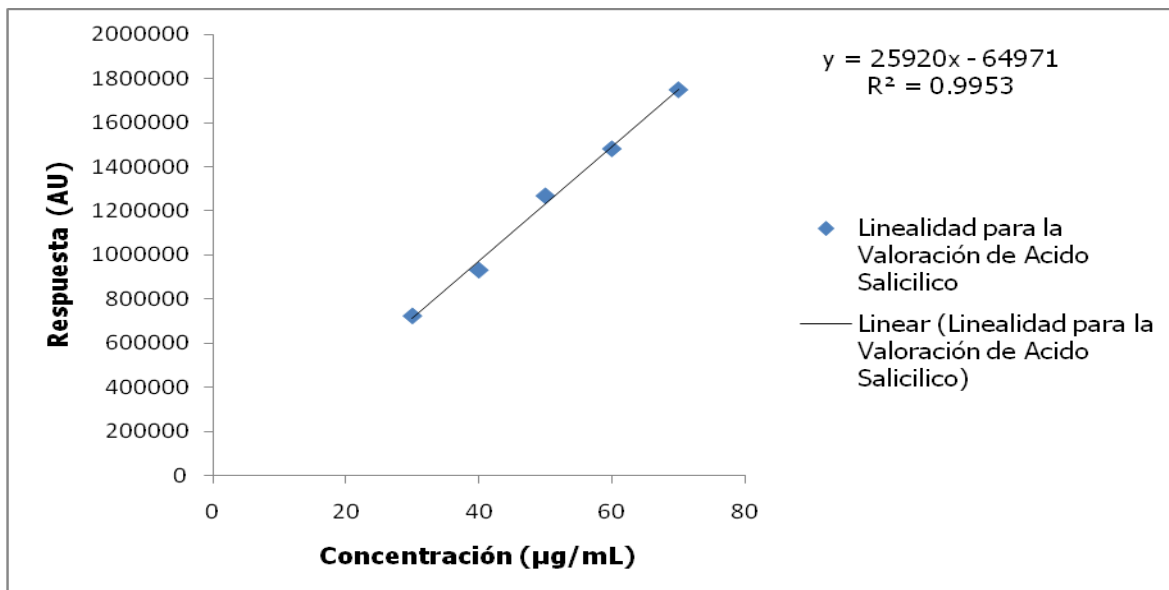


Figura 4.7. Gráfica de linealidad de ácido salicílico.

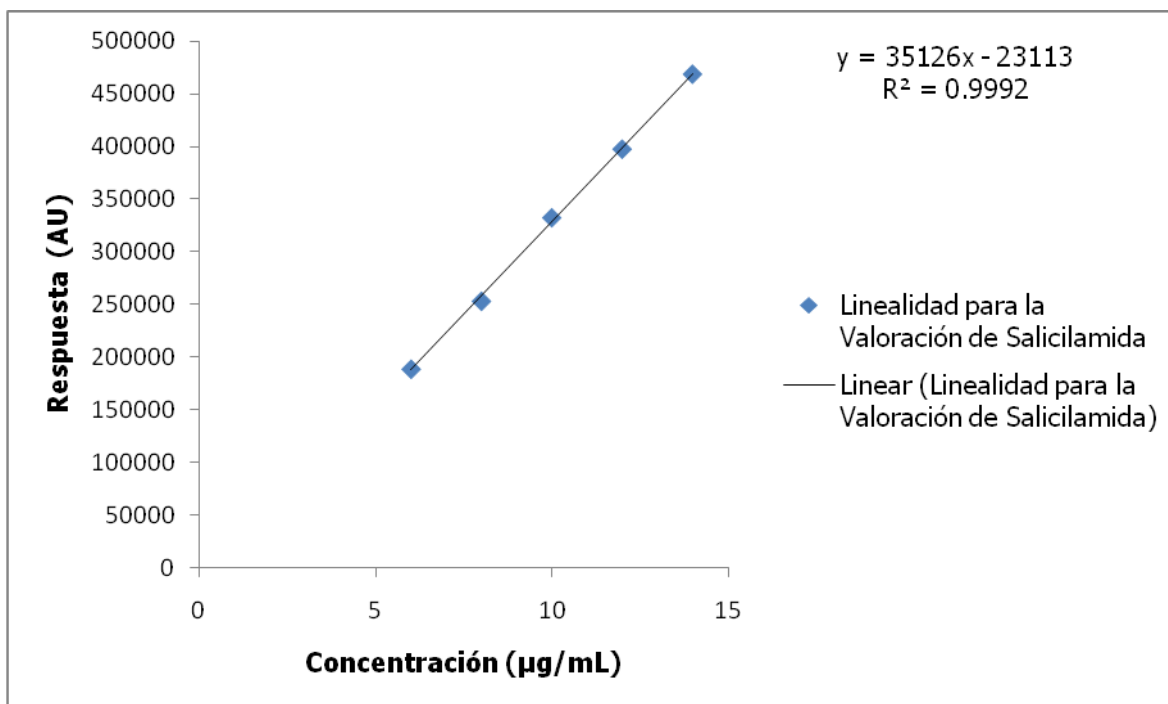


Figura 4.8. Gráfica de linealidad de salicilamida.

4.5.2 Intervalo

Se realizó el análisis de regresión lineal, excluyendo el origen como punto. Los resultados para ácido salicílico y salicilamida se presentan en las tablas 4.6 y 4.7, respectivamente. Cumpliendo en un intervalo de 80 a 120% para los dos fármacos.

Tabla 4.6. Intervalo del método de ácido salicílico.

Nivel esperado	Concentración (µg/ml)	Promedio (n=3)	CV
80%	40	929751	0.78
100%	50	1252927	0.82
120%	60	1480746	0.70
Pendiente	18366		
Intercepto	302817		
Coefficiente de correlación (r²)	0.9901		
Especificaciones	El coeficiente de correlación (r ²) debe ser ≥ 0.99		

Tabla 4.7. Intervalo del método de salicilamida.

Nivel esperado	Concentración (µg/ml)	Promedio (n=3)	CV
80%	8	257983	1.93
100%	10	329553	0.47
120%	12	397389	0.97
Pendiente	25762.27		
Intercepto	-70574.6		
Coefficiente de correlación (r²)	0.9997		
Especificaciones	El coeficiente de correlación (r ²) debe ser ≥ 0.99		

4.5.3 Exactitud (recobro):

El porcentaje de recobro de cada muestra individual y el promedio de cada nivel de concentración fue determinado y se presentan los resultados de ácido salicílico y salicilamida en la tabla 4.8 y 4.9 respectivamente mostrando un recobro entre el 97 y 102 % para los dos fármacos.

Tabla 4.8. Exactitud del método de ácido salicílico.

Nivel esperado	Concentración (mg/ml)	% de recobro	Promedio del % de recobro
		99.8	
80%	40	99.3	99.1
		99.0	
		101.6	
100%	50	101.1	101.1
		101.3	
		98.4	
120%	60	99.5	99.5
		100.6	
Pendiente	17716		
Intercepto	322594		
Especificaciones	El porcentaje de recobro debe estar entre 97 – 103% para el promedio de cada ser de tres muestras. Cada recobro individual debe estar dentro del 98-102%		

Tabla 4.9. Exactitud del método de salicilamida.

Nivel esperado	Concentración (mg/ml)	% de recobro	Promedio del % de recobro
		100.8	
80%	40	101.0	100.2
		98.9	
		99.2	
100%	50	99.4	99.4
		100.3	
		100.0	
120%	60	100.1	100.2
		100.3	
Pendiente	33768		
Intercepto	-9198		
Especificaciones	El porcentaje de recobro debe estar entre 97 – 103% para el promedio de cada ser de tres muestras. Cada recobro individual debe estar dentro del 98-102%		

Todos los criterios de aceptación fueron cumplidos. Una gráfica de concentración contra respuesta para ácido salicílico se muestra en la figura 4.9. En la figura 4.10 se representa la gráfica del intervalo de linealidad para salicilamida. El intercepto no parte de cero significativamente en ninguna de las dos pruebas.

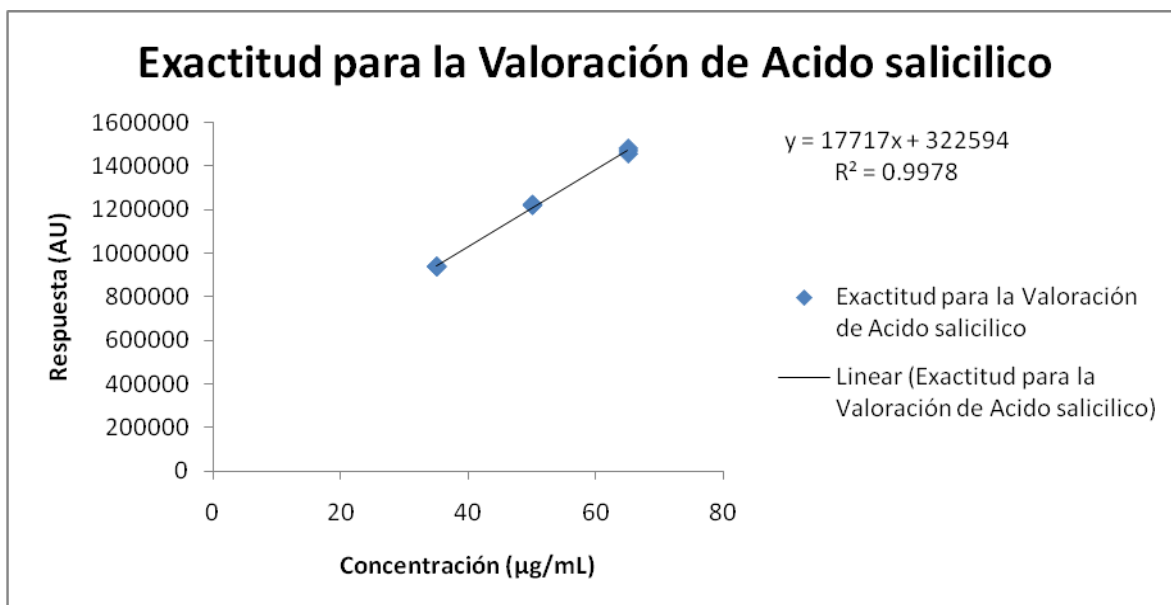


Figura 4.9. Gráfica del intervalo de linealidad para ácido salicílico.

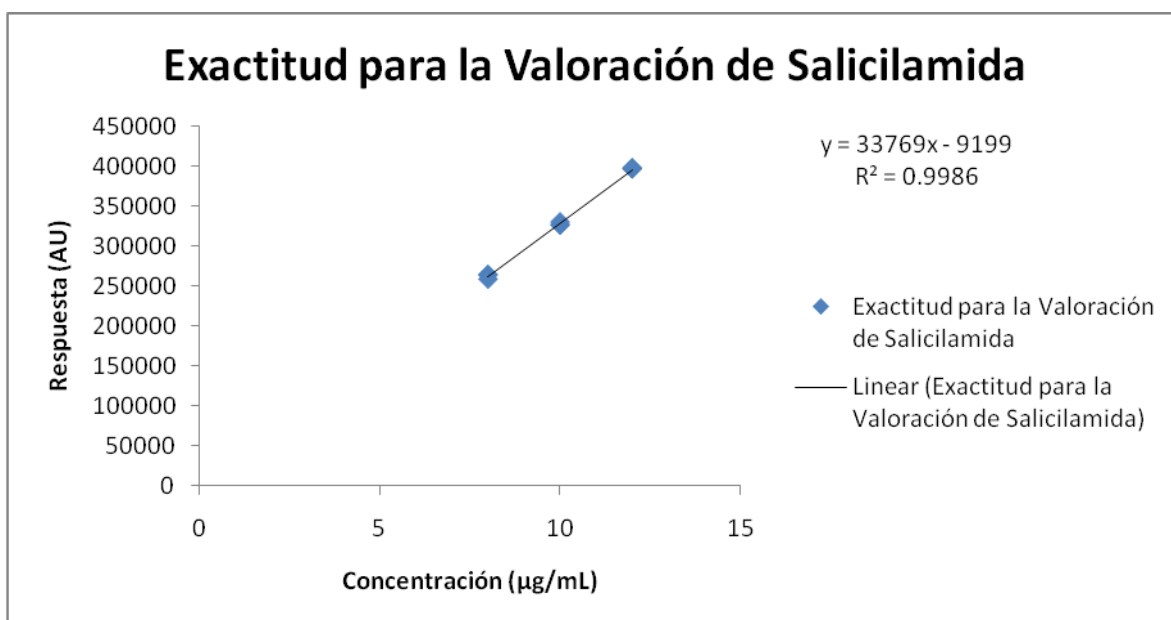


Figura 4.10. Gráfica del intervalo de linealidad para salicilamida.

4.5.4 Estudio de retención del filtro:

El porcentaje de recobro y el CV fueron determinados para cada muestra individual. Los resultados para ácido salicílico y salicilamida se muestran en las tablas 4.10 y 4.11 respectivamente.

Tabla 4.10. Estudio de filtrado para ácido salicílico.

	Nombre de la muestra	Media de recobro (n=3 inyecciones)	% CV	% de recobro por filtro (n= 9 inyecciones)
Nylon	1	98.4	0.3	
	2	99.5	0.5	99.3
	3	100.1	0.8	
Especificaciones	El porcentaje de recobro de placebo enriquecido debe estar entre 98 – 102% para el promedio de cada ser de tres muestras. Cada recobro individual debe estar dentro del 98-102%			

Tabla 4.11. Estudio de filtrado para salicilamida.

	Nombre de la muestra	Media de recobro (n=3 inyecciones)	% CV	% de recobro por filtro (n= 9 inyecciones)
Nylon	1	99.7	0.9	
	2	100.2	1.1	99.6
	3	98.9	1.0	
Especificaciones	El porcentaje de recobro de placebo enriquecido debe estar entre 98 – 102% para el promedio de cada ser de tres muestras. Cada recobro individual debe estar dentro del 98-102%			

Los filtros de nylon mostraron ser útiles en este método ya que presentan un porciento de recobro aceptable.

4.5.5 Precisión

4.5.5.1 Repetitividad

En la repetitividad todos los criterios de aceptación fueron cumplidos. Se obtuvieron un coeficiente de variación aceptable.

Los resultados para ácido salicílico y salicilamida son presentados en las tablas 4.12 y 4.13, respectivamente.

Tabla 4.12. Repetitividad para ácido salicílico.

Preparación de la muestra	% de recobro
1	99.2
2	98.2
3	101.1
4	102.5
5	98.7
6	99.3
Media	100.0
CV	1.98
Especificaciones	Cada recobro individual debe estar dentro del 98-102%

Tabla 4.13. Repetitividad para salicilamida.

Preparación de la muestra	% de recobro
1	98.1
2	102.1
3	98.8
4	98.5
5	99.3
6	100.4
Media	99.5
CV	1.48
Especificaciones	Cada recobro individual debe estar dentro del 98-102%

4.5.5.2 Precisión intermedia

Los resultados de ácido salicílico y salicilamida, individuales y combinados para los dos analistas se presentan en las tablas 4.14 y 4.15 respectivamente. Con esto se asume que la variación entre los analistas no es considerable por lo cual este método es reproducible.

Tabla 4.14. Precisión intermedia para ácido salicílico (Repetitividad analista 2).

Preparación de la muestra	% de Recobro
1	100.4
2	98.1
3	99.9
4	100.9
5	98.2
6	101.7
Media	99.9
CV	1.44 %
Gran media (analista 1+2)	99.9
CV (n=12)	1.7 %
Especificaciones	El CV no debe ser mayor a 2.0%. El CV (n=12) de los resultados combinados de los dos analista no deben ser mayores al 3.0%

Tabla 4.15. Precisión intermedia para salicilamida (Repetitividad analista 2).

Preparación de la muestra	% de Recobro
1	98.5
2	101.9
3	99.3
4	98.5
5	99.3
6	101.7
Media	99.9
CV	1.54%
Gran media (analista 1+2)	99.7
CV (n=12)	1.4%
Especificaciones	El CV no debe ser mayor a 2.0%. El CV de los resultados combinados de los dos analista no deben ser mayores a 3.0%

4.5.6 Selectividad (especificidad)

No se observó interferencia de los diluyentes, Los cromatogramas de un estándar típico y las soluciones de muestras se muestran en el Anexo II. Cromatogramas y Espectros en las figuras I-1 a la I-5.

4.5.7 Estudio de estabilidad de las soluciones

Todas las soluciones determinadas demostraron ser estables para ácido salicílico y salicilamida, por lo menos por 24 h a temperatura ambiente. Esto demuestra que no hay degradación del principio activo por lo menos en este periodo de tiempo.

Los resultados de la solución estándar para ácido salicílico y salicilamida se presentan en las tablas 4.16 y 4.17.

Tabla 4.16. Estabilidad de la solución estándar para ácido salicílico.

Condiciones de almacenamiento	% de recobro	% de la diferencia con respecto al inicial (absoluto)
Inicial	100	N/A
24 h anaquel	100.1	0.1
Especificaciones	El valor del recobro no varía más del 1.5% (absoluto) del valor inicial	

Tabla 4.17. Estabilidad de la solución estándar para salicilamida.

Condiciones de almacenamiento	% de recobro	% de la diferencia con respecto al inicial (absoluto)
Inicial	100	N/A
24 h anaquel	99.8	0.2
Especificaciones	El valor del recobro no varía más del 1.5% (absoluto) del valor inicial	

Los resultados de la solución muestra para ácido salicílico y salicilamida se presentan en las tablas 4.18 y 4.19. En los cuales observamos que no hay degradación en un periodo de 24 h es decir que el medio no afecta al principio activo.

Tabla 4.18. Estabilidad de la solución muestra ácido salicílico.

Condiciones de almacenamiento	% de recobro	% de la diferencia con respecto al inicial (absoluto)
Inicial	100	N/A
24 h anaquel	99.7	0.3
Especificaciones	El valor del recobro no varía más del 1.5% (absoluto) del valor inicial	

Tabla 4.19. Estabilidad de la solución muestra salicilamida.

Condiciones de almacenamiento	% de recobro	% de la diferencia con respecto al inicial (absoluto)
Inicial	100	N/A
24 h anaquel	99.5	0.5
Especificaciones	El valor del recobro no varía más del 1.5% (absoluto) del valor inicial	

4.5.8 Determinación de la adecuabilidad del sistema.

Los parámetros de adecuabilidad del sistema propuestos se cumplieron durante la validación. Se muestran en la tabla 4.20.

Tabla 4.20. Adecuabilidad del sistema.

Nombre	TR(min)	Coleo (T)	Resolución	Platos (N)	Factor de Selectividad (k')
4-HAB	2.04	1.14	-	2113	1.17
Salicilamida	2.83	1.26	4.18	3224	2.01
Ácido salicílico	9.17	1.27	18.76	5960	8.75

4.6 Cuantificación de ácido salicílico hidrolizado contra el pH

Se muestran los resultados para el p-AMOB, c-A15 y c-A30 en las tablas 4.21, 4.22 y 4.23, respectivamente.

Tabla 4.21. Porcentaje disuelto de p-AMOB.

t	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10	pH11
1	0.50	0.6	1.6	1.5	3.0	2.2	0.4	0.3	0.6
2	3.64	0.98	1.84	1.34	3.01	2.35	0.46	0.39	0.62
3	4.54	1.46	2.13	1.52	3.19	2.55	0.51	0.46	0.67
4	4.87	1.58	2.24	1.53	3.22	2.63	0.53	0.48	0.69

Tabla 4.22. Porcentaje disuelto de c-A15.

t	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10	pH 11
1	1.47	0.7	1.4	1.0	1.7	1.5	0.3	0.3	0.3
2	2.32	1.36	1.97	1.54	2.36	2.19	0.41	0.36	0.37
3	2.70	1.55	2.25	1.70	2.53	2.45	0.46	0.36	0.38
4	2.89	1.69	2.30	1.79	2.69	2.68	0.51	0.37	0.41

Tabla 4.23. Porcentaje disuelto de c-A30.

t	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10	pH 11
1	0.39	0.4	0.5	0.5	0.4	0.6	0.1	0.1	0.1
2	0.65	0.58	0.65	0.58	0.74	0.86	0.14	0.09	0.11
3	0.94	0.80	0.70	0.70	0.97	0.98	0.20	0.10	0.13
4	1.10	0.94	0.86	0.92	1.20	1.22	0.27	0.13	0.19

Se muestran las gráficas de la hidrólisis contra el tiempo de las tres series en las figuras 4.11, 4.12 y 4.13. De manera general se observa que a pH's ácidos se presenta una hidrólisis mayor que en los medios más básicos, a pH's de 10 y 11 la hidrólisis es casi nula. En el p-AMOB la hidrólisis es muy rápida a diferencia de los otros copolímeros, aunque el medio entra más rápido a la red polimérica en pH's básicos la hidrólisis se presenta más lentamente, los porcentajes obtenidos son muy bajos posiblemente tengan un error de lectura considerable.

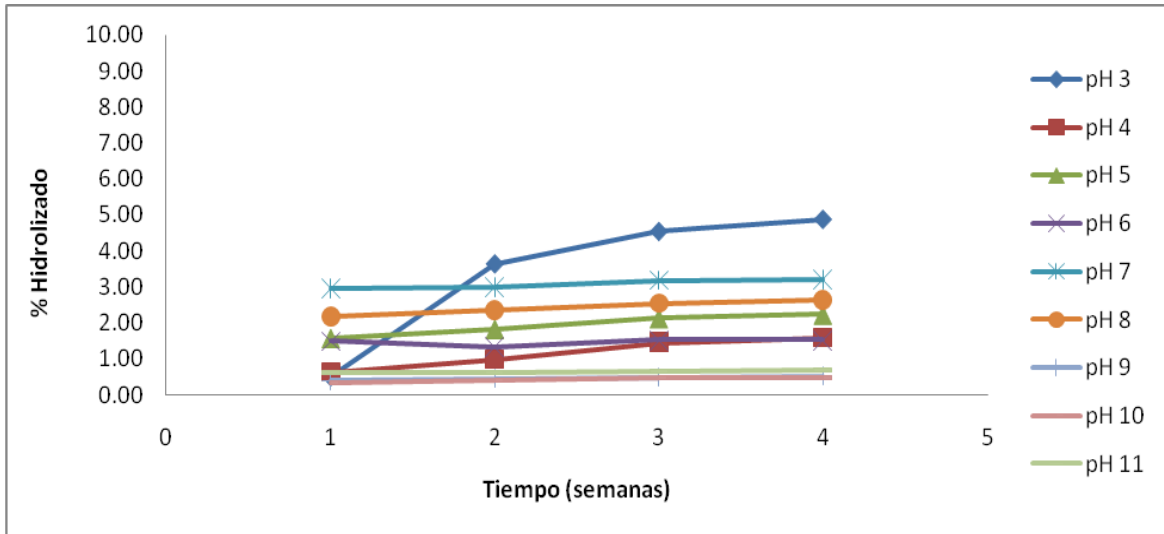


Figura 4.11. Grafica % hidrolizado Vs tiempo de p-AMOB.

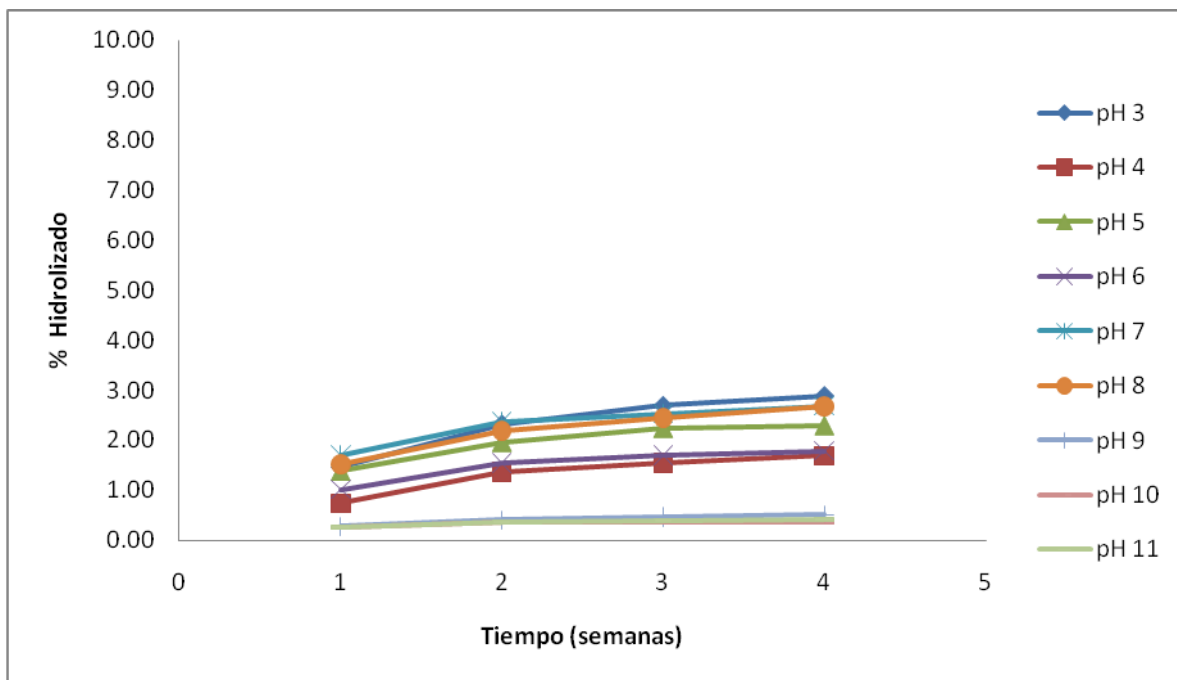


Figura 4.12. Gráfica % hidrolizado Vs tiempo de c-A15.

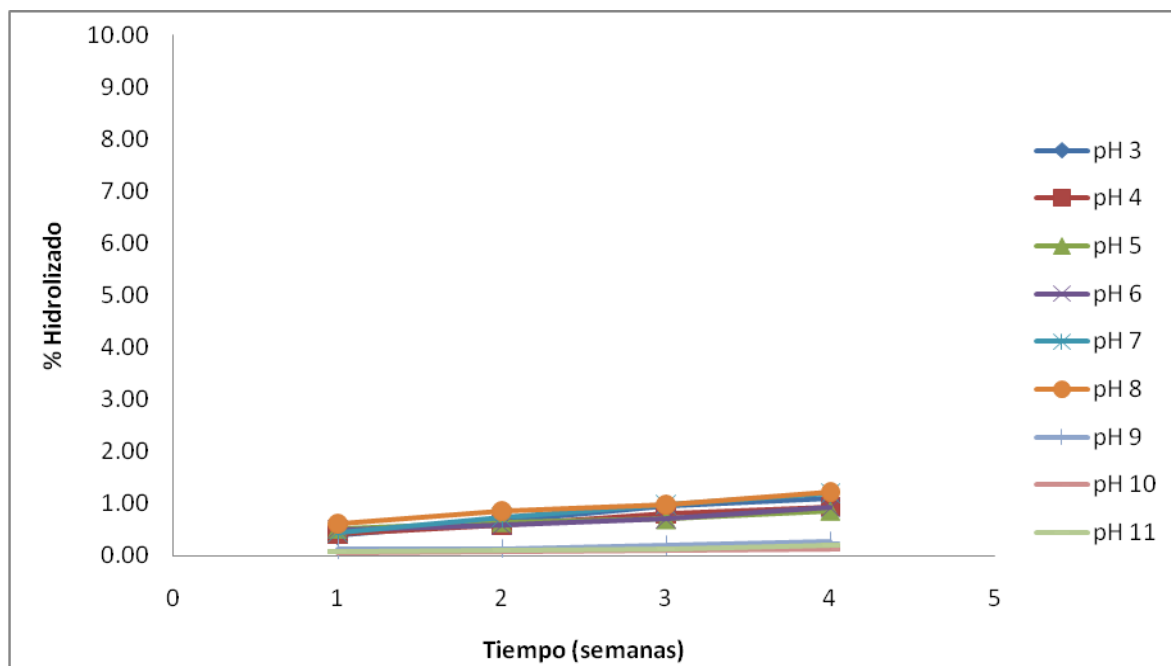


Figura 4.13. Gráfica % hidrolizado Vs tiempo de c-A30.

4.7 Cargado de los geles

Las cantidades cargadas del fármaco en el hidrogel se muestran en la tabla 4.24.

Tabla 4.24. Cantidad de fármaco cargado.					
pH	Muestra	Peso del gel antes de cargar (mg)	Peso del gel después de cargar (mg)	Fármaco (mg)	Ácido salicílico (mg)
1.2	p-AMOB	35.2	47.3	12.1	23.04
	c-A15	21.8	29.7	7.9	12.32
	c-A30	22.3	28.4	6.1	10.38
	p-AMOBE	17.2	20.3	3.1	11.43
6.8	p-AMOB	36.9	48.8	11.9	24.54
	c-A15	21.7	30.1	8.4	12.26
	c-A30	15.1	20.3	5.2	7.02
	p-AMOBE	15.0	16.7	1.7	9.97
7.4	p-AMOB	33.4	44.8	11.4	22.21
	c-A15	21.2	29.1	7.9	11.98
	c-A30	13.8	19.5	5.7	6.42
	p-AMOBE	17.6	20.3	2.7	11.7

El fármaco entra en mayor cantidad dentro de la red polimérica cuando no tiene un agente hidrofílico, ya que esta prueba se realizó en metanol, por lo cual podemos suponer que el gel que más responde a este disolvente es el p-AMOB hinchando de manera considerable en comparación con los demás materiales.

4.8 Prueba de liberación de fármaco e hidrólisis

El porcentaje hidrolizado de ácido salicílico disuelto durante la prueba de disolución en medio de HCl 0.1 N pH 1.2, medio de fosfatos pH 6.8 y medio de fosfatos pH 7.4 se presenta en la tabla 4.25.

Tabla 4.25. Porcentaje hidrolizado.

t (h)	pH 1.2				pH 6.8				pH 7.4			
	p-AMOB	c-A15	c-A30	p-AMOB-E	p-AMOB	c-A15	c-A30	p-AMOB-E	p-AMOB	c-A15	c-A30	p-AMOB-E
0.25	3.5	11.3	9.4	13.1	3.9	9.0	2.6	2.2	0.7	1.6	4.7	2.6
0.5	2.6	4.4	7.9	6.0	3.6	12.9	4.8	2.2	1.1	2.0	3.3	2.1
0.75	3.1	7.6	7.3	6.6	4.0	7.5	3.7	1.7	1.3	2.1	5.0	2.3
1	3.6	6.3	9.0	9.2	4.5	7.1	4.1	2.2	1.1	2.2	4.5	2.4
2	4.0	6.8	9.0	10.6	3.6	12.9	5.5	2.7	1.3	2.6	5.9	2.2
4	6.2	6.2	7.0	7.4	5.3	6.9	4.5	2.1	1.0	1.2	1.9	1.1
8	4.6	8.0	9.7	6.5	4.0	8.2	3.1	1.0	0.7	1.1	3.6	2.2
12	3.8	7.8	9.3	11.5	5.2	11.6	2.0	1.0	0.5	1.1	0.9	1.2
24	3.8	7.9	11.5	8.7	6.2	8.6	1.5	1.2	0.4	-0.3	2.2	0.4

Como se puede observar la cantidad de ácido salicílico hidrolizado es muy pequeña sin tener ninguna tendencia. Es decir que no se ve influenciada por el pH.

El porcentaje liberado de salcilamida se muestra en la tabla 4.26.

Tabla 4.26. Porcentaje de fármaco liberado.												
t (h)	pH 1.2				pH 6.8				pH 7.4			
	p-AMOB	c-A15	c-A30	p-AMOB-E	p-AMOB	c-A15	c-A30	p-AMOB-E	p-AMOB	c-A15	c-A30	p-AMOB-E
0.25	0.08	2.0	1.3	-0.6	1.2	1.4	7.5	23.0	4.2	4.7	9.0	20.2
0.5	0.49	1.4	2.3	-1.2	1.8	3.4	11.0	25.4	5.6	6.6	8.3	18.3
0.75	0.87	3.0	2.5	0.5	2.4	2.9	11.3	24.2	6.3	7.6	11.1	20.1
1	1.05	3.3	3.5	3.2	3.4	3.5	13.0	28.3	6.8	8.2	11.3	22.3
2	1.90	4.3	4.9	3.7	4.4	8.1	18.4	35.4	9.1	12.2	15.1	23.1
4	3.75	5.0	6.3	4.0	8.6	9.6	20.1	34.8	12.6	14.7	14.6	20.9
8	4.63	7.7	9.0	4.9	10.2	10.8	17.9	30.9	13.4	14.7	17.0	27.3
12	4.96	8.4	10.1	8.8	11.0	12.1	16.0	31.9	13.2	15.1	14.1	22.0
24	6.50	9.9	11.9	8.6	11.4	11.4	15.3	32.8	13.2	12.6	15.7	19.2

Como se puede observar en las figura 4.14, 4.15, y 4.16 la hidrólisis en 24 es alrededor del 10%.

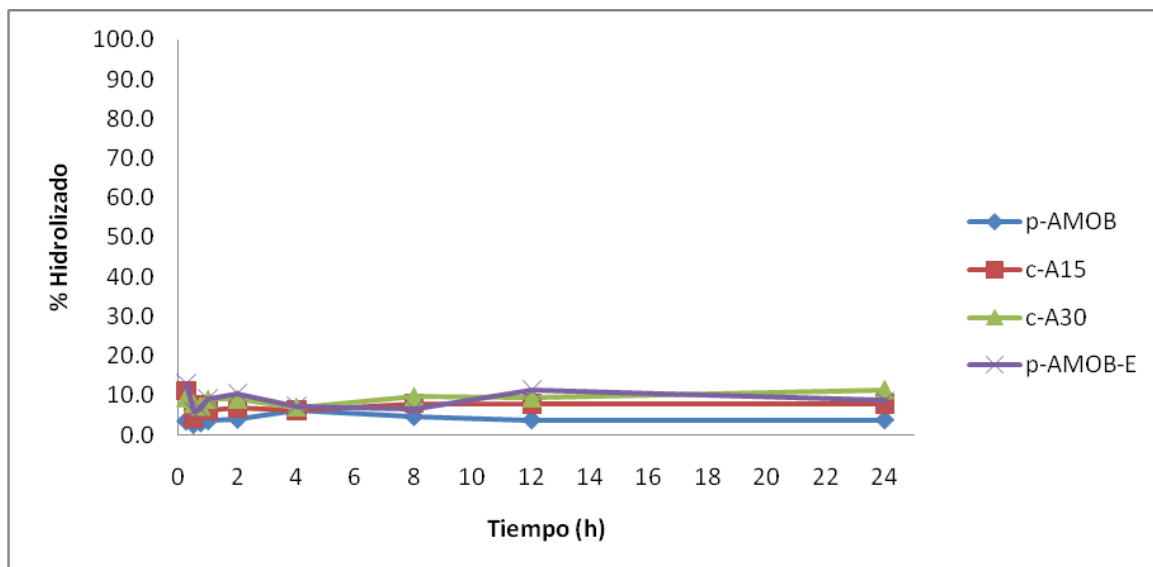


Figura 4.14. Gráfica % hidrolizado Vs tiempo para las cuatro serie de geles a pH 1.2.

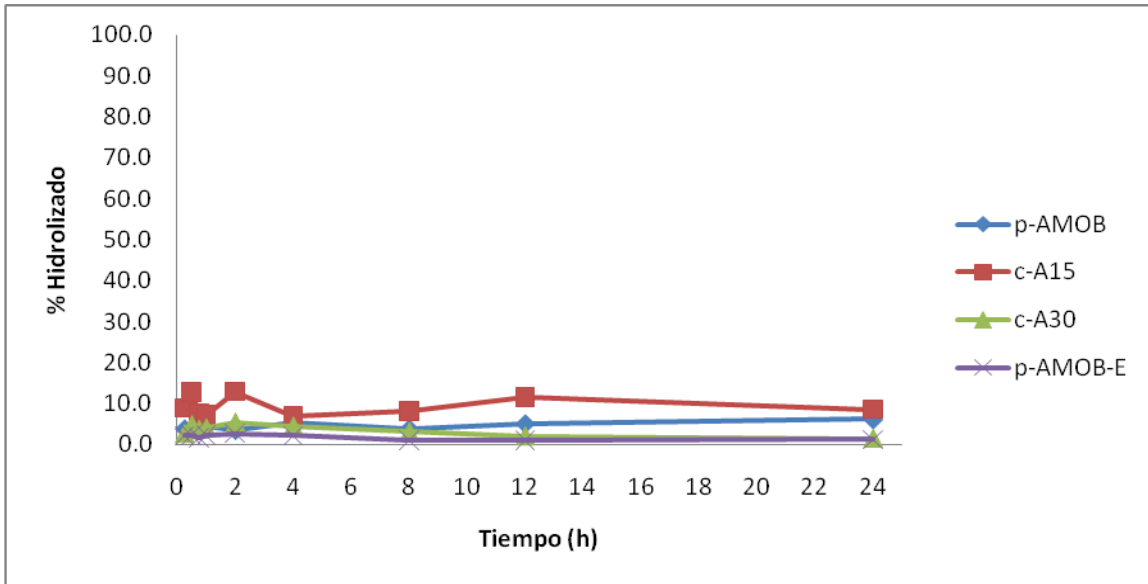


Figura 4.15. Gráfica % hidrolizado Vs tiempo para las cuatro serie de geles a pH 6.8.

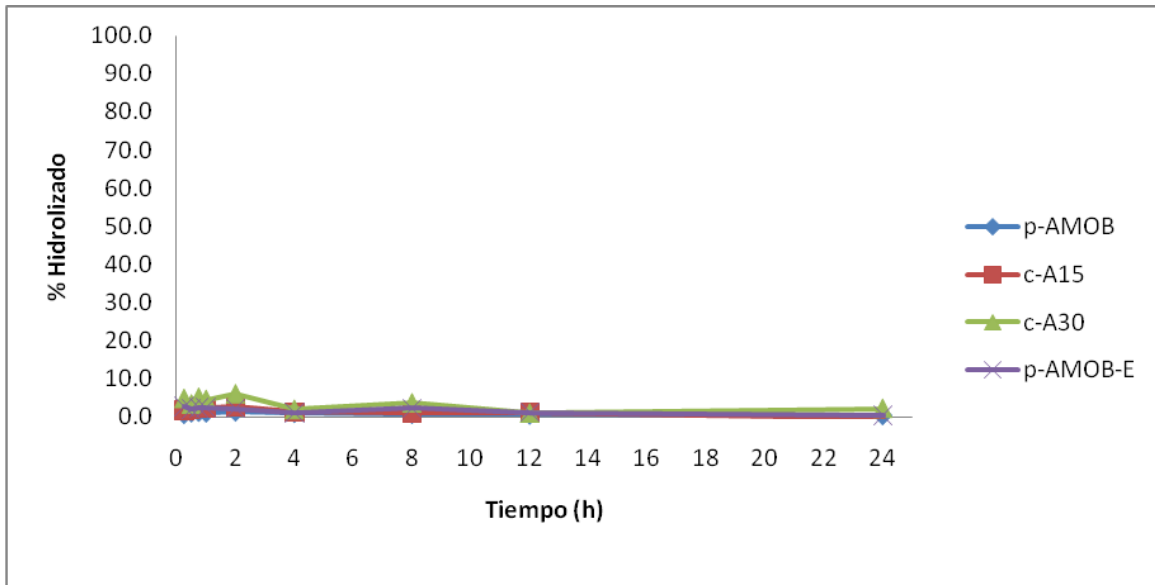


Figura 4.16. Gráfica % hidrolizado Vs tiempo para las cuatro serie de geles a pH 7.4.

La liberación del fármaco se puede observar en las figuras 4.17, 4.18. y 4.19 para los diferentes pH's. La liberación del fármaco en los geles, se llevó a cabo por difusión ya que como se observó el fármaco queda atrapado en la red polimérica, esto se comprueba ya que

cuando el gel no se hincha como sucede en los pH's ácidos no permite la migración de medio hacia el interior de la red polimérica y por lo tanto no hay difusión del fármaco hacia afuera de la red, contrario a lo que sucede a pH's básicos.

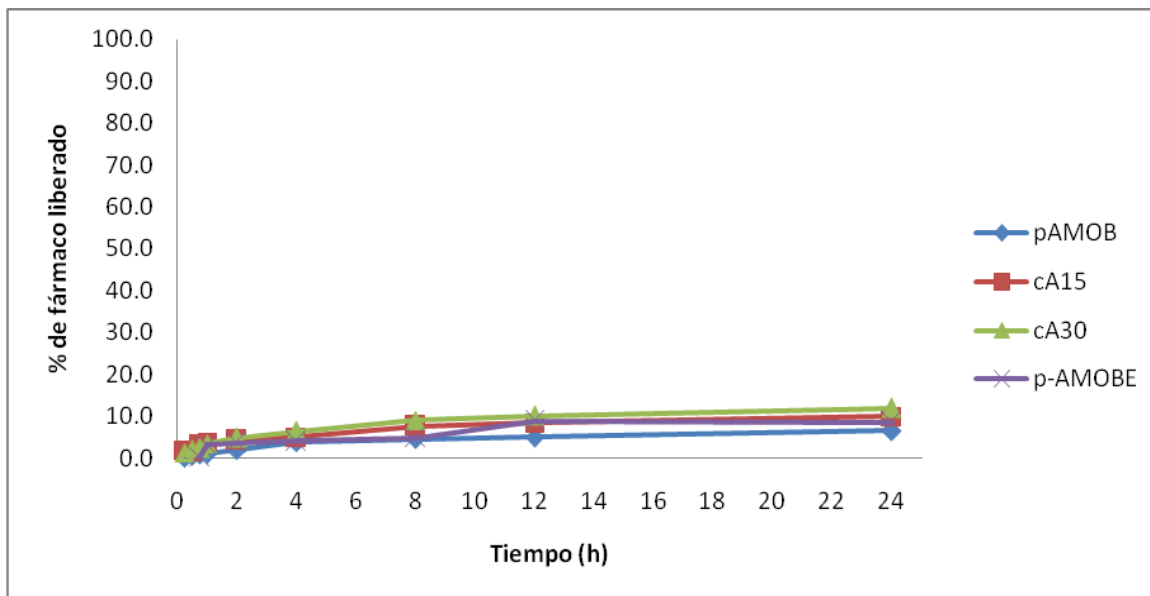


Figura 4.17. Gráfica % fármaco liberado Vs tiempo para las cuatro serie de geles a pH 1.2.

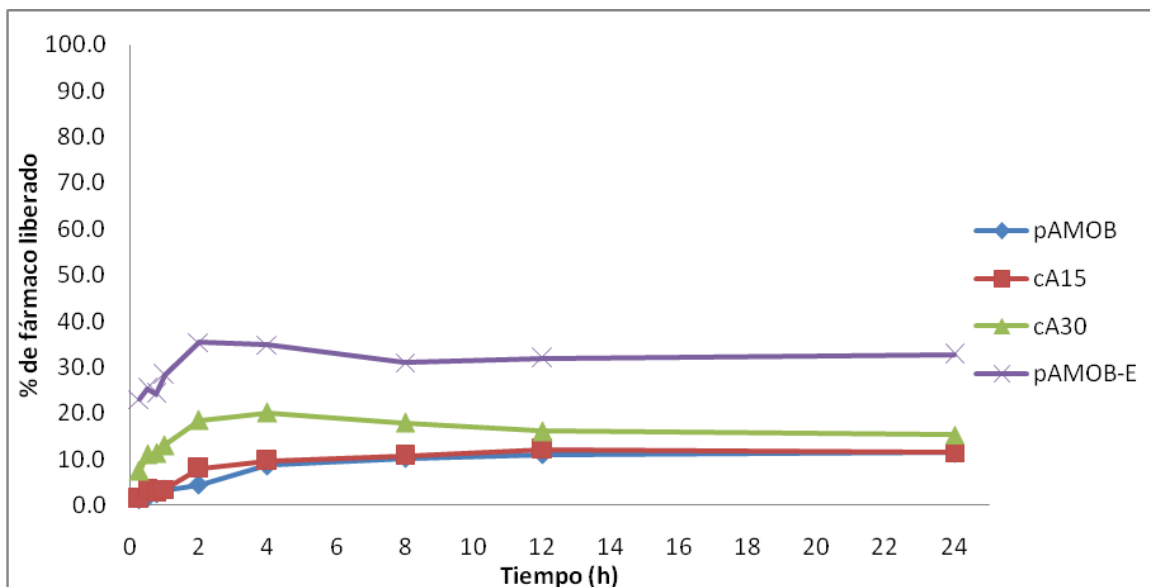


Figura 4.18. Gráfica % fármaco liberado Vs tiempo para las cuatro serie de geles a pH 6.8.

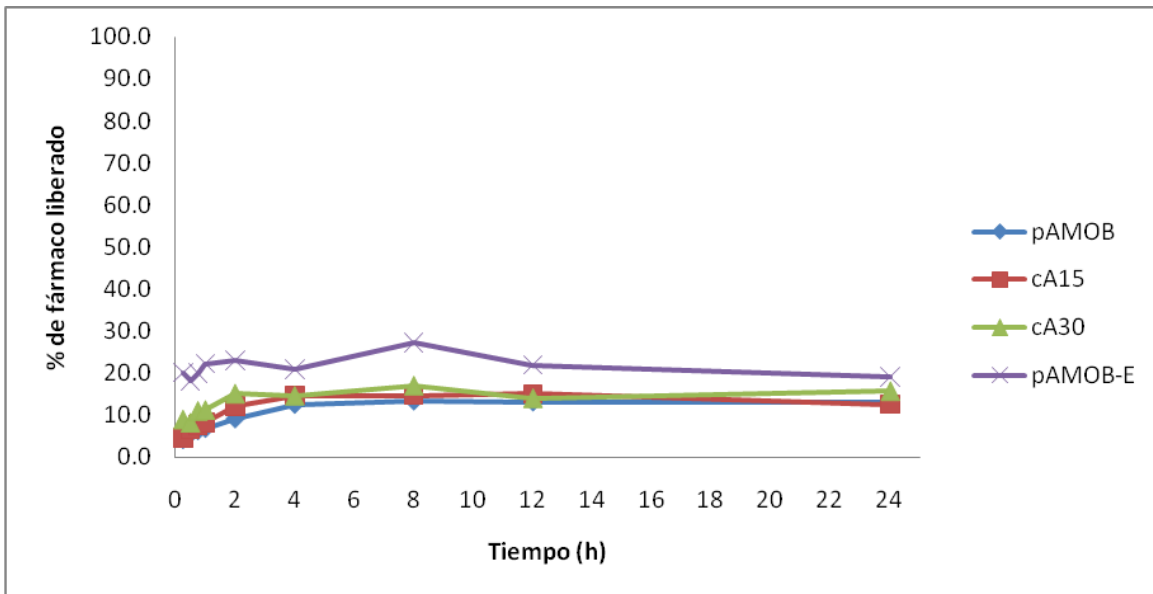


Figura 4.19. Gráfica % fármaco liberado Vs tiempo para las cuatro serie de geles a pH 7.4.

Capítulo 5

Conclusiones

En el trabajo realizado en esta tesis se obtuvo el monómero ácido metacriloioloxibenzoico (MAOB) y se encontraron sus condiciones óptimas de reacción: Relación Ácido metacrílico/Ácido salicílico: 1:1.6, con un tiempo de reacción de 3 horas.

Se logro manejar la hidrofobicidad del material sintetizando geles copolimerizando con ácido acrílico, que responden con un hinchamiento mayor y más rápido a valores de pH altos, presentan un pH de transición de 5.0, aproximadamente.

Se comprobó que el compuesto hidrolizado del gel es ácido salicílico, sin embargo el porcentaje de hidrólisis durante el tiempo de muestreo de 28 días para los materiales p-AMOB, c-A15 y c-A30 fue menor a los valores de pH básicos; con respecto a los valores de pH ácidos. La copolimerización de MAOB con monómeros hidrofílicos del gel no influye en la hidrólisis del grupo salicilato.

Se diseño un método para la cuantificación de ácido salicílico y salicilamida por CLAR. Se valido un método por cromatografía de líquidos de alta resolución para la valoración cuantificación simultanea de ácido salicílico y salicilamida. El método demostró ser selectivo, preciso, lineal y exacto en un intervalo de 80 a 120% de la concentración nominal establecida.

Se demostró que la hidrólisis del ácido salicílico a partir de los geles es mínimo a cualquier pH.

La liberación del fármaco salicilamida a partir de los geles sintetizados es mayor a pH básico debido al hinchamiento de los geles que ocurre a por arriba del pH de transición (pH 5.5). Sin embargo el máximo liberado solo alcanza alrededor del 20% a pH 7.4 indicando que existe una interacción entre el fármaco y el gel que no permite una liberación completa del fármaco. A pH's abajo del pH de transición, prácticamente no hay liberación del fármaco al quedar atrapado en la red polimérica.

Como trabajo futuro propones realzar es estudio de liberación con otro fármaco que no tenga interacción con la red polimérica.

Referencias

- [1] Norma oficial mexicana NOM-177-SSA1-1998, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
- [2] Hoffman A.S. *Advanced Drug Delivery Review*. (2002), 43, 3-1
- [3] Branon-Peppas L.; Peppas N. A. *Chemical Engineering Science*. (1991), 3, 715-722
- [4] Licea, A. E.; Rogel, E. H.; Lopez, J. S.; Castillo, L. A.; Cornejo, J. B.; Arndt, K. *Designed Monomers and Polymers*,(2003), 6, 67-80.
- [5] Philippova OE, Hourdet D. Audebert R. Khokhlov AR. pH-responsive gels of hydrophobically modified poly(acrylic acid). *Macromolecules* (1997); 30, 8278-85
- [6] Park, K.; Shalaby, W. S. W.; Park, H *Biodegradable hydrogels for drug delivery*. Technomic Publishing Company, Inc. Pennsylvania USA. (1993), 2-3
- [7] Kikuchi and Okano, T. Pulsatile drug release control using hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, (2002). 54, 53-77.
- [8] Park, S. Y., and Bae, Y. H. Novel pH-sensitive polymers containing sulfonamide groups. *Macromol Rapid Commun*, (1999). 20, 269-273
- [9] Siegel, R.A., Falamarzian, M., Firestone, B. A., Moxley, B.C., pH Controlled release from hydrophobic/polyelectrolyte copolymer hydrogels. *J. Contr. Rel.* (1988). 8, 179-182

Bibliografía consultada

- [1] Mahkam, M.; Assadi, M. G.; Zahedifar, R.; Ramesh, M.; Davaran, S. J. *Bioact. Comp. Polym.*, (2004), 19,46-53
- [2] Murthy, N., Robichaud, J. R., Tirrel, D. A., Stayton, P. S., and Hoffman, A. S. The design and synthesis of polymers for eukaryotic membrane disruption. *J. Control.(1999). Rel.*, 61, 137-143
- [3] Krishnamachari, Y.; Madan, P.; Lin, S. *International Journal Pharmaceutics*, (2007), 338, 238-247
- [4] Mahkam, M.; Doostie, L. *Drug Delivery*, (2005), 12, 343-347
- [5] Brown, J. P. *Appl. Environ. Microbiol.*, (1981), 41,1283
- [6] Brazel, C. S.; Peppas, N. A. *Journal of Controlled Release*, (1996), 39, 57-64
- [7] Legaz, M. E; Acitores, E.; Valverde, F.; *Journal of experimental and clinical medicine*, (1992), 17, 229-237
- [8] Broome, T. A. y col.; *The Canadian Journal of Veterinary Research*, (2003), 67, 297-302
- [9] Baxter, G. j.; Graham, A.;y Col; *Eur J Nutr* , (2001), 40, 289-292
- [10] Epshtein N. A; *Pharmaceutical Chemistry Journal*, (2004), 38, 212-228

Anexo I: Glosario de términos

Adecuabilidad del sistema: evaluación de los componentes de un sistema analítico para demostrar que el desempeño del sistema cumple con los estándares requeridos por el método. Para cromatografía estos parámetros incluyen factor de coe, resolución, precisión del estándar, factor de capacidad, tiempos de retención, platos teóricos y linealidad de la curva de calibración.

Blanco: muestra o estándar de una matriz en particular sin analito.

Curva de calibración: grafica de la concentración de las soluciones estándares (x) contra la señal de instrumento (y).

Factor de capacidad (k'): parámetro adimensional usado para describir la retención de un compuesto.

Desarrollo del método: proceso por el cual el método es desarrollado y evaluado con adecuabilidad para su uso, y como precursor de la validación.

Desviación estándar: expresión y medida de la precisión de un método analítico de una serie medidas

Enriquecido: la adición de una cantidad conocida de un compuesto conocido a un estándar, muestra o placebo, típicamente con el propósito de confirmar el desempeño de un procedimiento analítico o la calibración de un instrumento

Especificidad: habilidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes. Típicamente éstos pueden incluir impurezas, productos de degradación, la matriz, etc.

Estabilidad de la solución de muestras y estándar: establecida en condiciones de anaquel, condiciones normales de almacenamiento, y algunas veces en el instrumento (HPLC automuestreador) para determinar si son necesarias condiciones especiales de almacenamiento. La estabilidad es determinada comparando la respuesta del compuesto principal y las impurezas de un estándar viejo con uno recién preparado.

Estudio de degradación forzada: estudios realizados a la muestra degradada deliberadamente. Se realiza para determinar que los productos de degradación no interfieran con el método de análisis asegurando la especificidad y estabilidad.

Estudio de filtración: comparación entre la muestra filtrada y la no filtrada para evaluar la retención de fármaco por parte del filtro o alguna aportación del filtro.

Exactitud: (veracidad): expresa la cercanía entre el valor que es aceptado entre el valor encontrado y el valor que es aceptable como valor real. Puede ser expresado como el recobro.

Factor de coleo: medida de una asimetría del pico.

Ingrediente farmacéutico activo (API): también conocido como fármaco o principio activo, sustancia con el fin de tener una actividad farmacológica u otro efecto directo sobre el diagnóstico, cura, prevención, tratamiento o para afectar el funcionamiento en el cuerpo de una persona o animal.

ICH: The Tripartite International Conference on Harmonization, organización internacional formada para establecer guías uniformes en la industria farmacéutica.

Intervalo de linealidad: ámbito entre la menor y la mayor concentración de analito en la muestra (incluyendo éstas concentraciones) para las cuales se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene el nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.

Linealidad: habilidad (dentro de un ámbito dado) del procedimiento analítico de obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra.

Método analítico: adaptación específica de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionado.

Platos teóricos: cantidad adimensional usado para expresar la eficiencia del desempeño de la columna bajo condiciones específicas. Una disminución de los platos teóricos puede indicar un deterioro de la columna de HPLC.

Precisión: expresa la cercanía de coincidencia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea bajo condiciones establecidas. Puede considerarse a tres niveles: repetitividad, precisión intermedia y reproducibilidad. Debe determinarse utilizando muestras originales y homogéneas. Sin embargo, si no es posible obtener una muestra homogénea puede ser determinada usando muestras preparadas o una disolución de la muestra.

Precisión intermedia: precisión obtenida dentro del laboratorio por diferentes analistas, diferentes equipos, días distintos con la misma muestra homogénea.

Procedimiento analítico: forma en que se realiza el análisis. Debe describir en detalle los pasos necesarios para realizar cada prueba analítica. Puede incluir, pero no

necesariamente los siguientes conocimientos: características de la muestra, preparación de los estándares de referencia y reactivos, uso de los aparatos o instrumentos, generación de la curva de calibración, uso de fórmulas para los cálculos.

Repetibilidad (repetitividad): precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (mismo día), por un mismo analista, en la misma muestra homogénea y en el mismo equipo.

Reproducibilidad: expresa la precisión entre laboratorios como resultado de estudios interlaboratoriales diseñados para estandarizar la metodología.

Resolución: medida de la eficiencia de la separación de dos componentes. En cromatografía significa que dos picos están separados uno del otro hasta la línea base.

Selectividad: describe la habilidad de un procedimiento analítico para diferenciar entre varias sustancias en la muestra y es aplicable a métodos en los que dos o más componentes son separados y cuantificados en una matriz compleja.

Sustancia activa: *ver* API

Tiempo de retención relativa (RRT): la normalización de los picos menores con el pico principal.

USP <1225> categoría III: uno de las cuatro categorías de métodos, para los cuales ciertos datos de validación son requeridos. La categoría III incluye métodos analíticos para la determinación de características de desempeño (disolución).

Validación: confirmación que se da por la recopilación y análisis de la evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para el uso específico propuesto.

Validación de un procedimiento analítico: procedimiento para establecer por medio de estudios de laboratorio una base de datos que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Implica la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y del error sistemático y al azar de un procedimiento, no solo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales.

Anexo II: Cromatogramas y Espectros

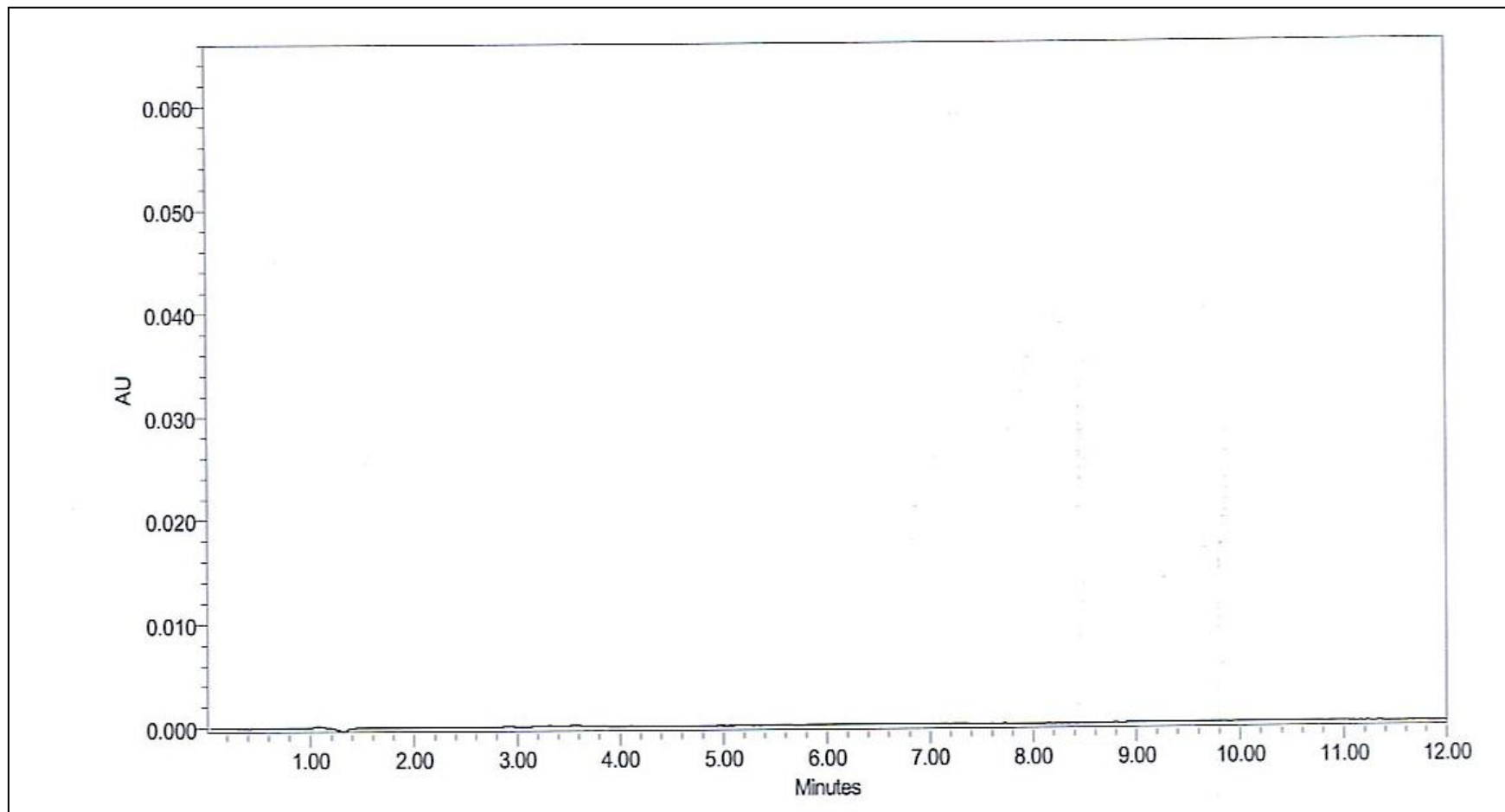


Figura I.1. Cromatograma de fase móvil.

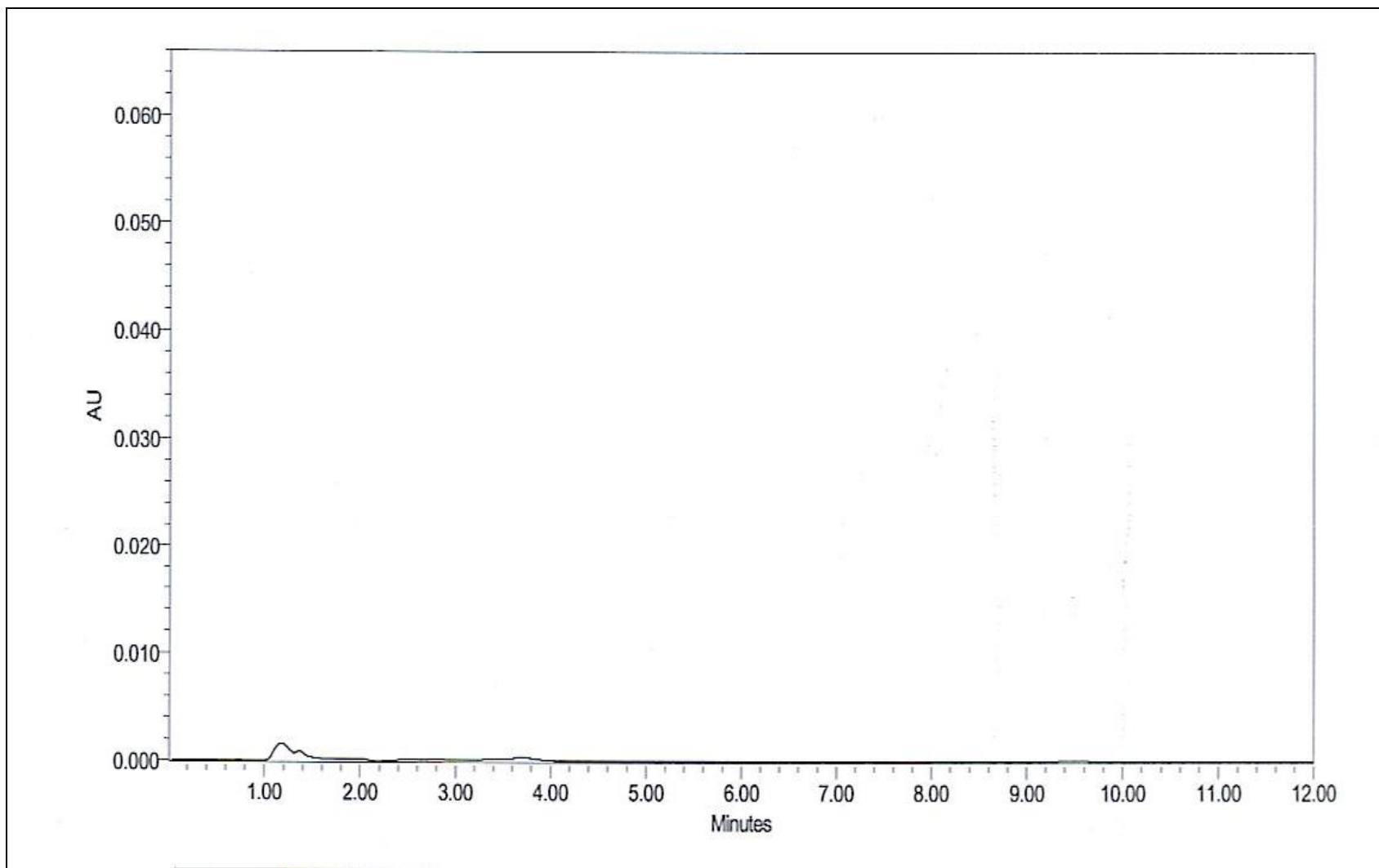


Figura I.2. Cromatograma de amortiguador gástrico pH 1.2.

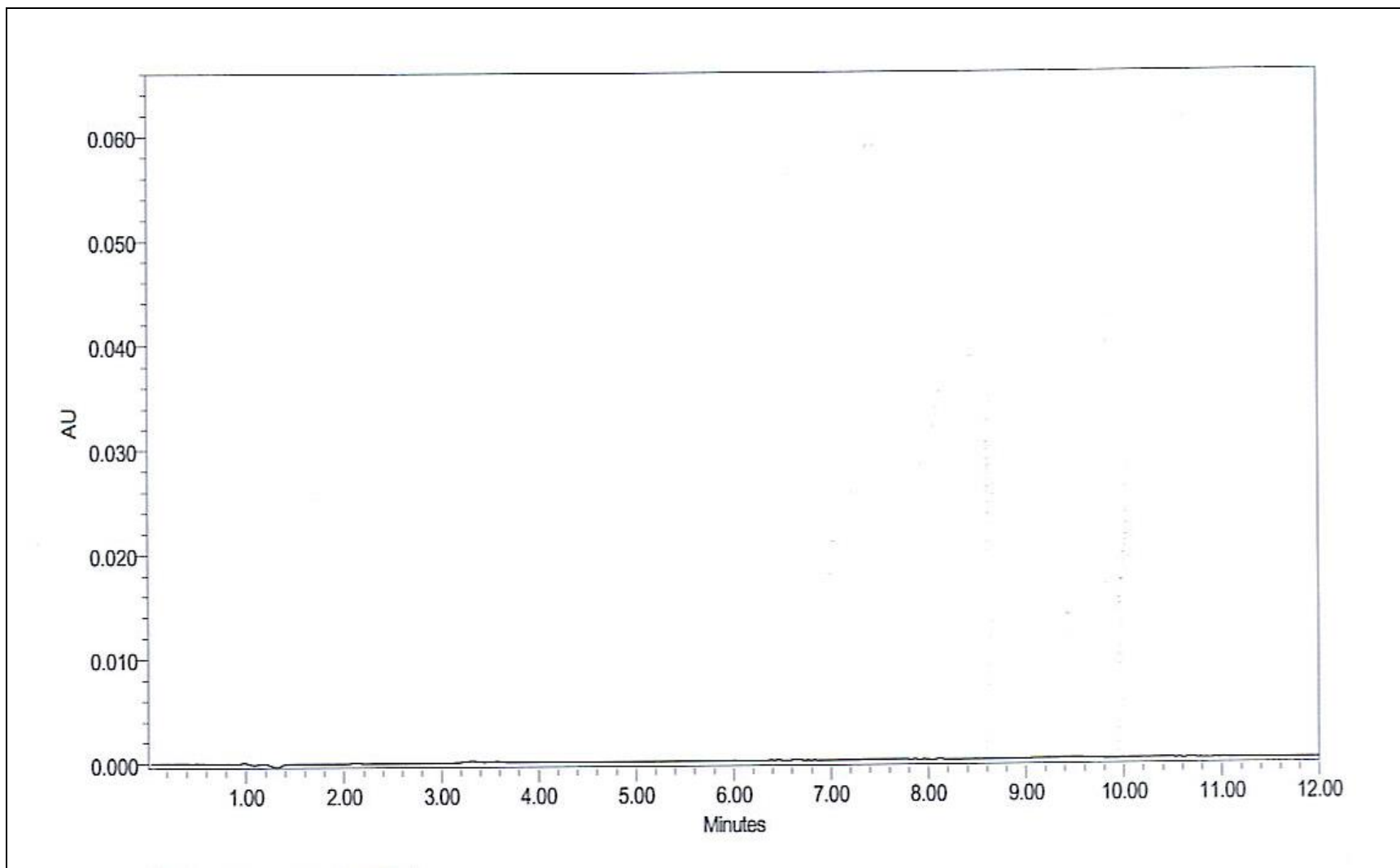


Figura I.3. Cromatograma de amortiguador intestinal pH 6.8.

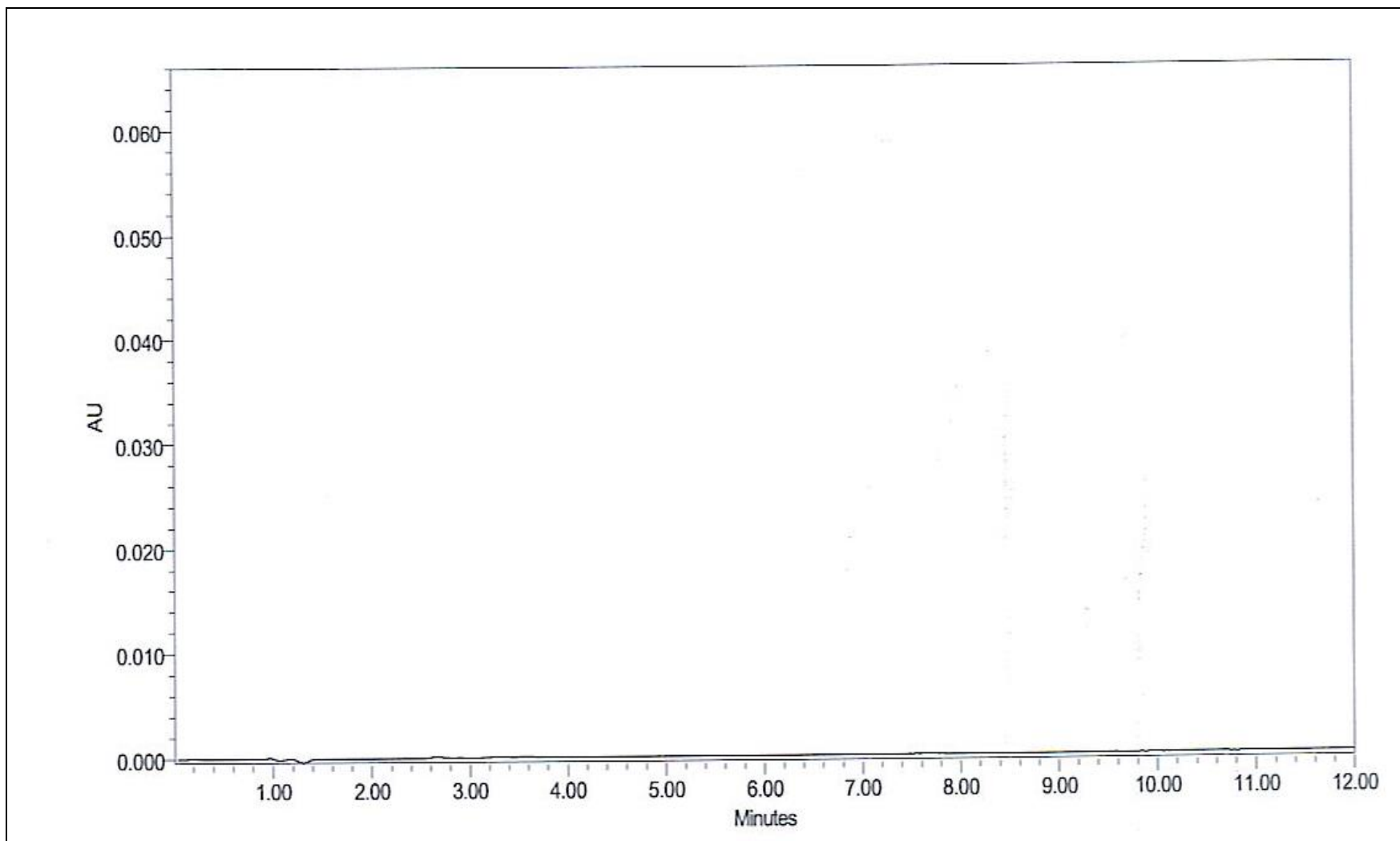


Figura I.4. Cromatograma de amortiguador intestinal pH 7.4.

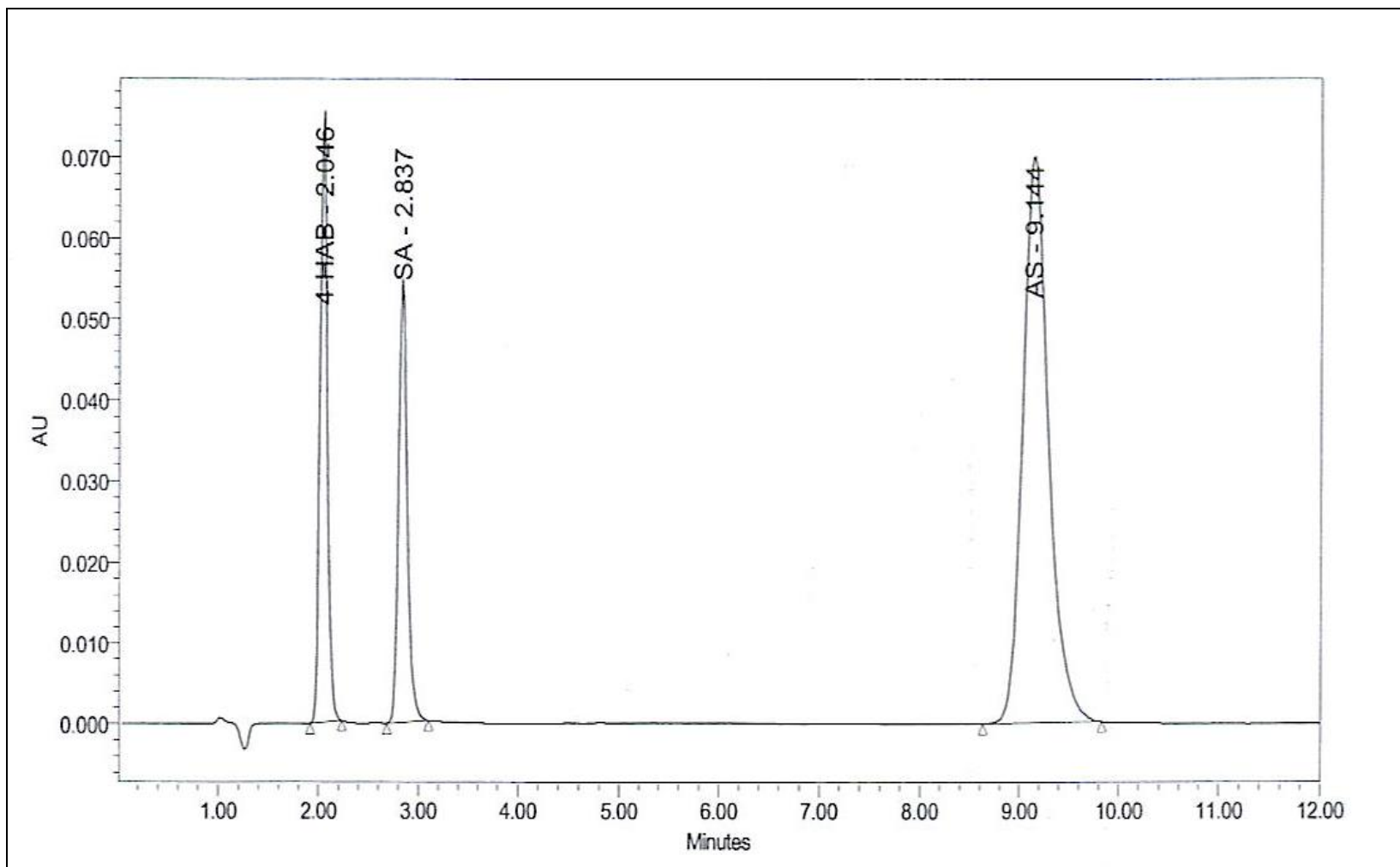


Figura I.5. Cromatograma típico

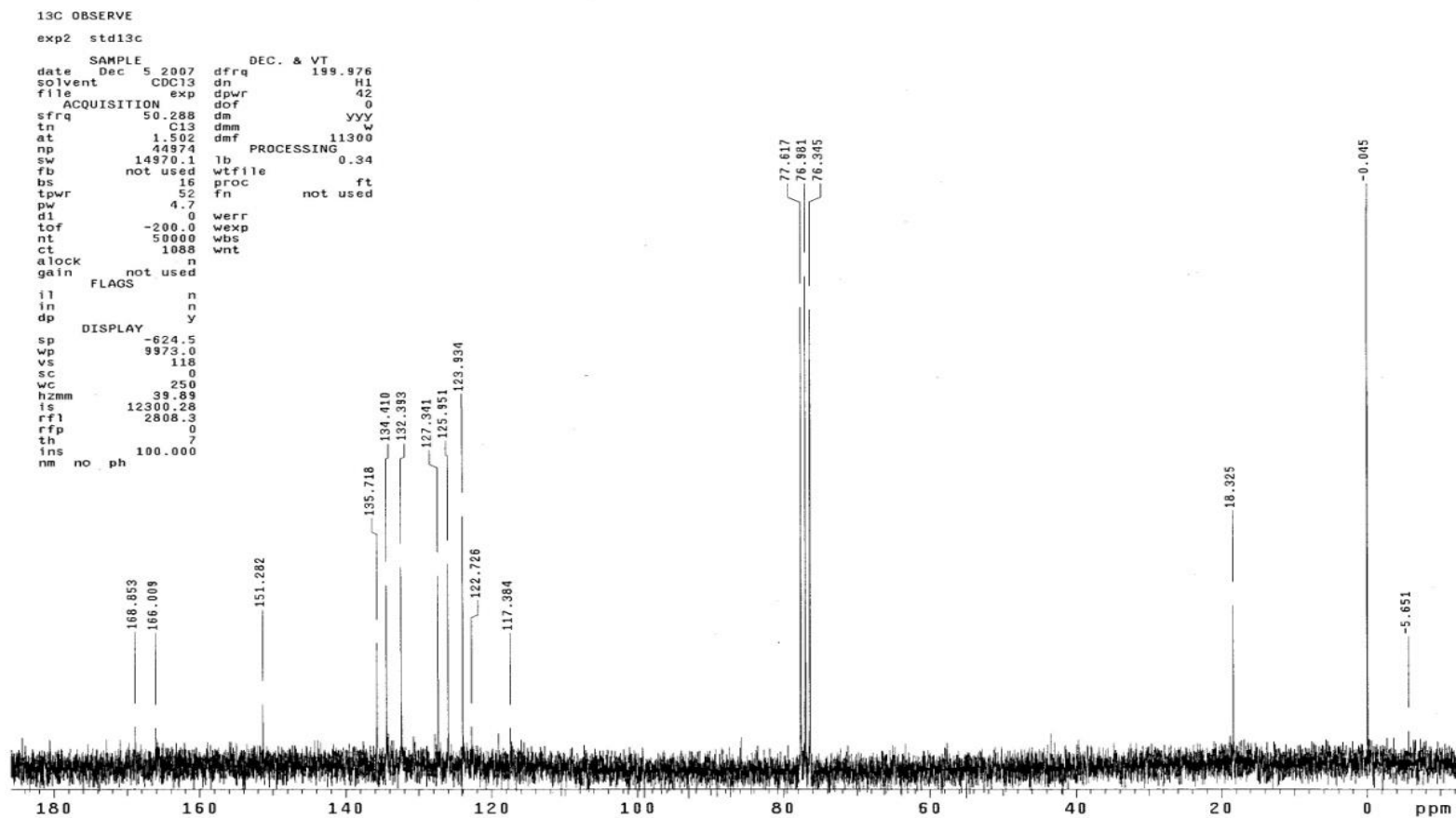


Figura I.6. Espectro RMN de C13 AMOB.

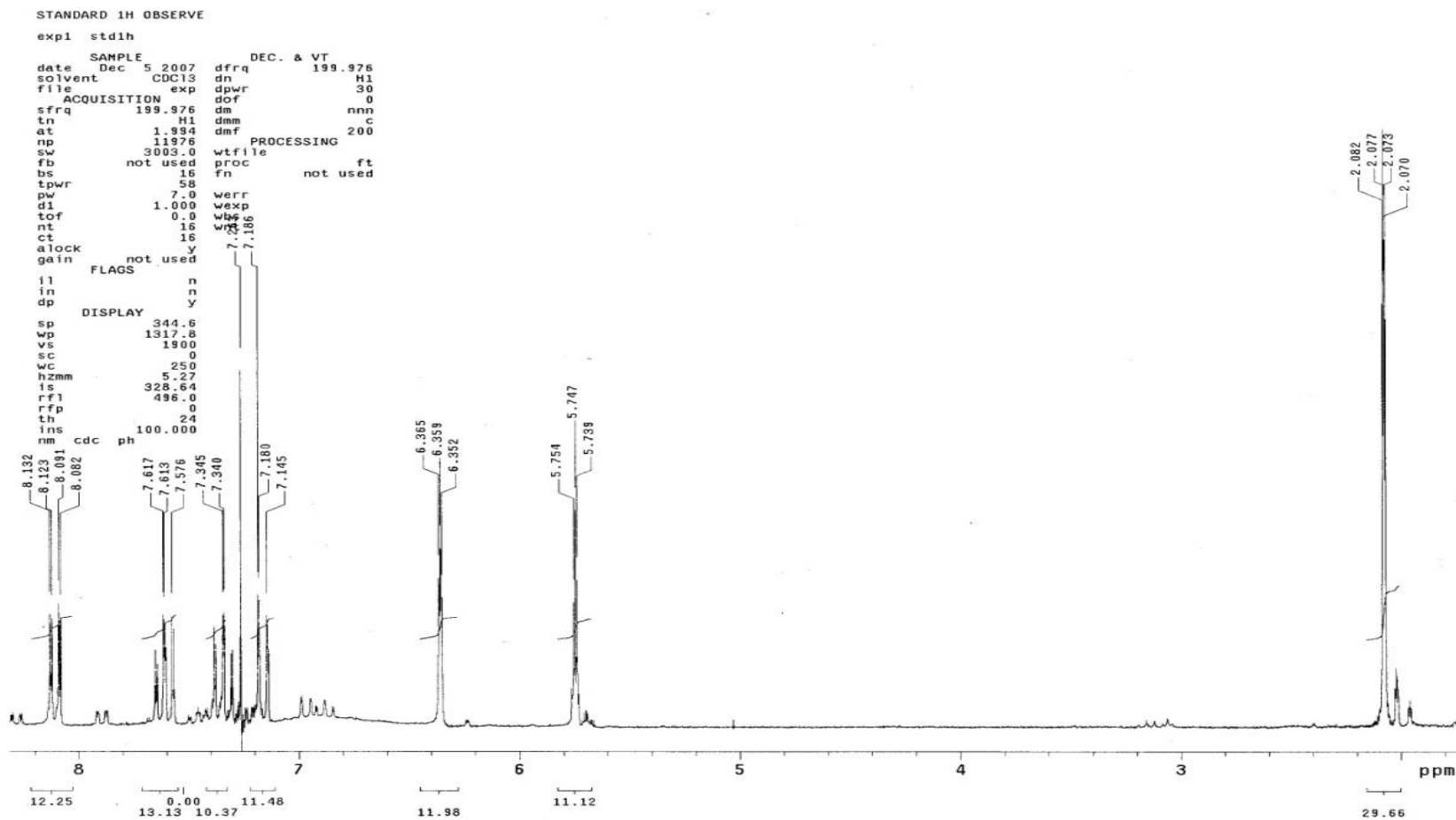


Figura I.7. Espectro de H¹RMN AMOB.

PRODUCTO RX10 (TIRSO)

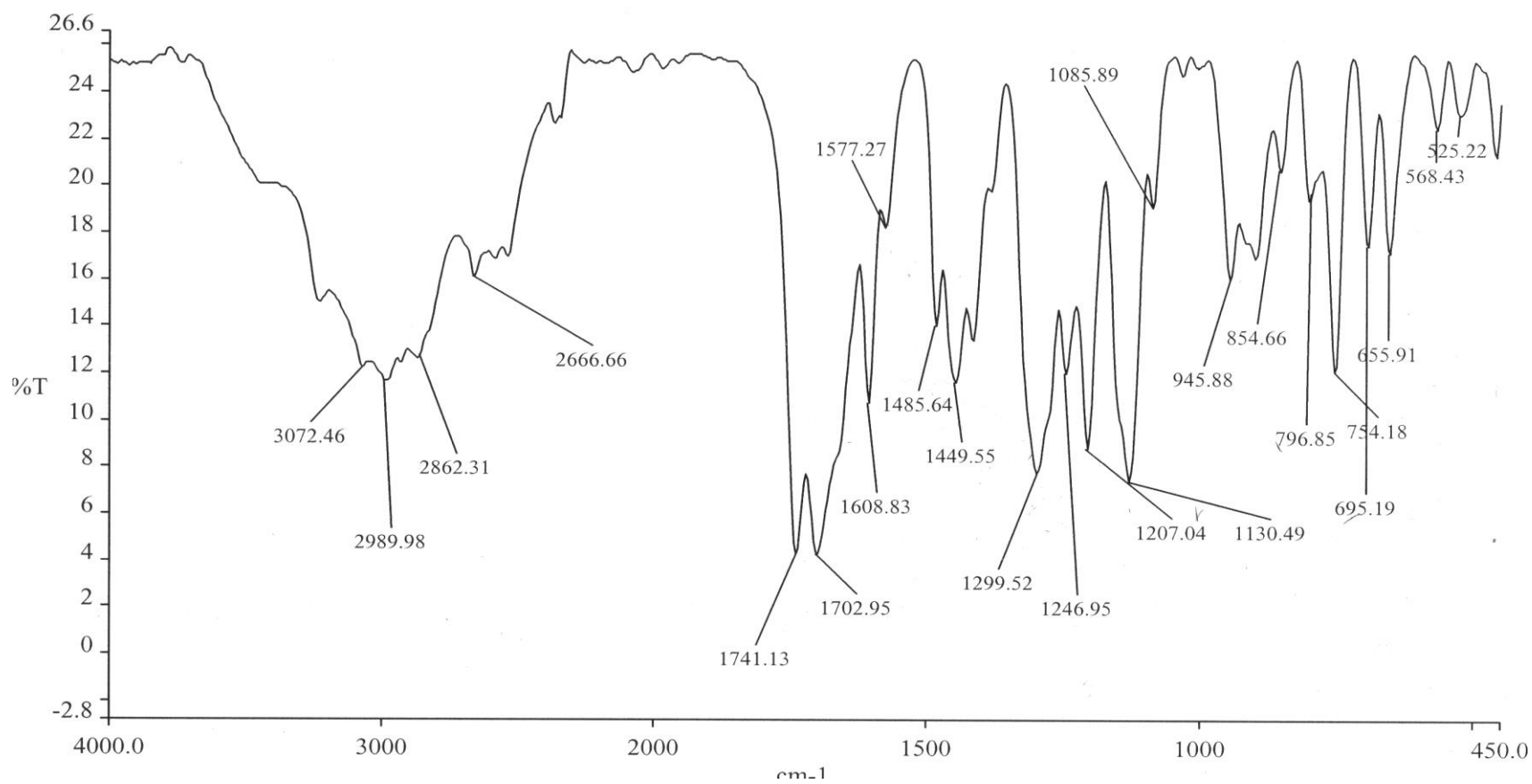


Figura I.8. Espectro IR de AMOB.

TIRMON #254 RT: 2.55 AV: 1 NL: 4.06E2
T: + c Full ms [50.00-650.00]

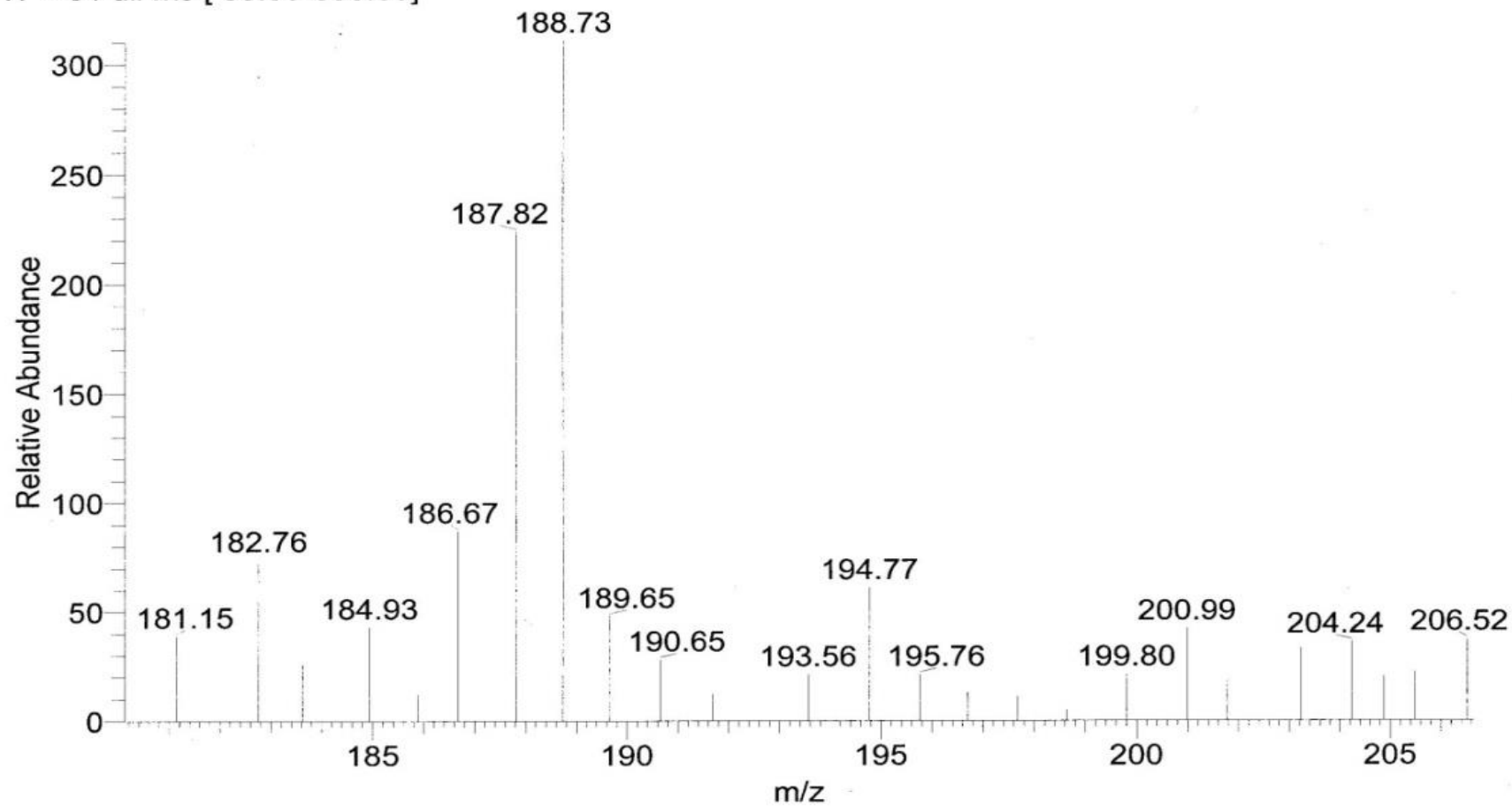


Figura I.9. m/z AMOB.

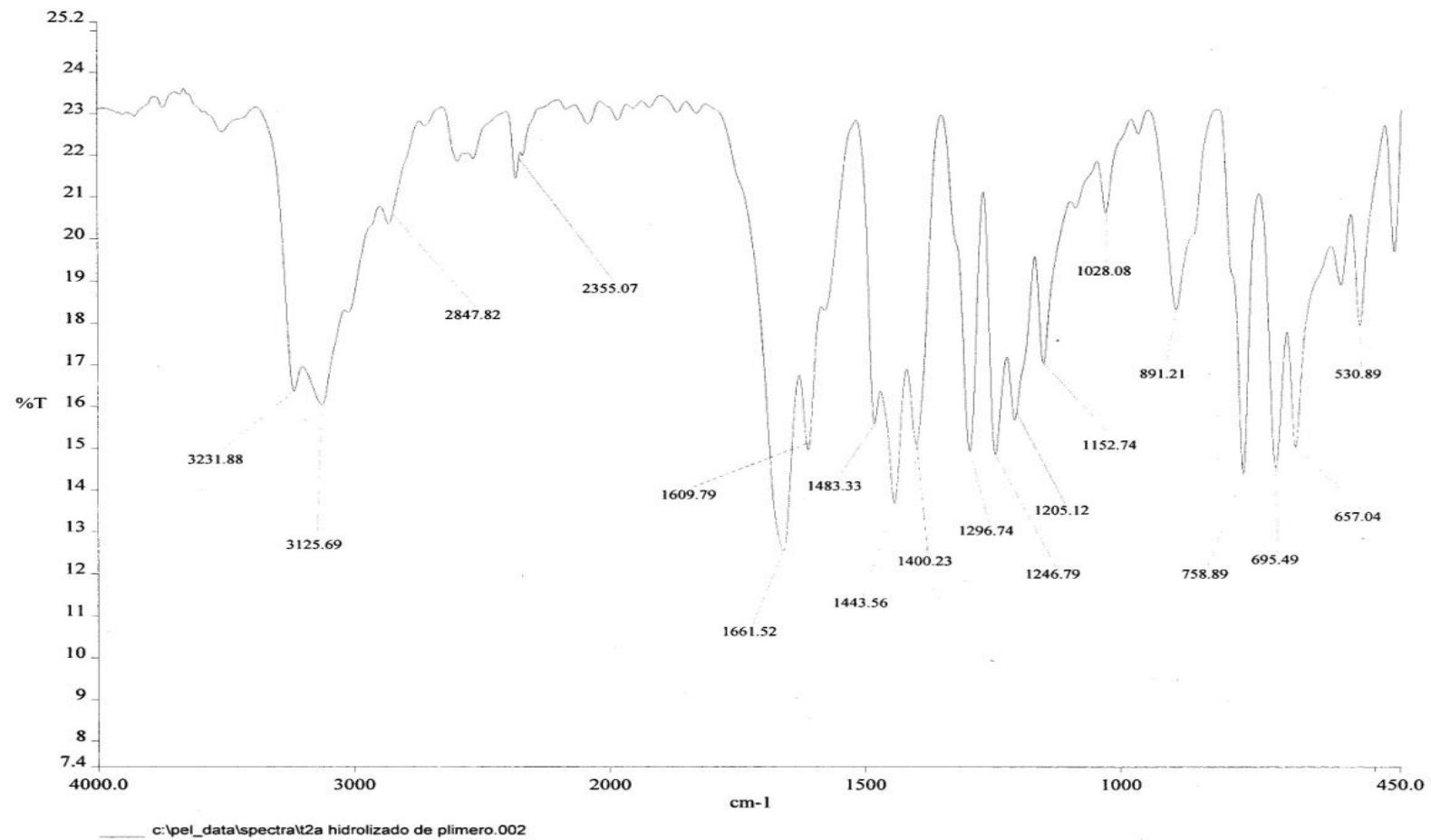
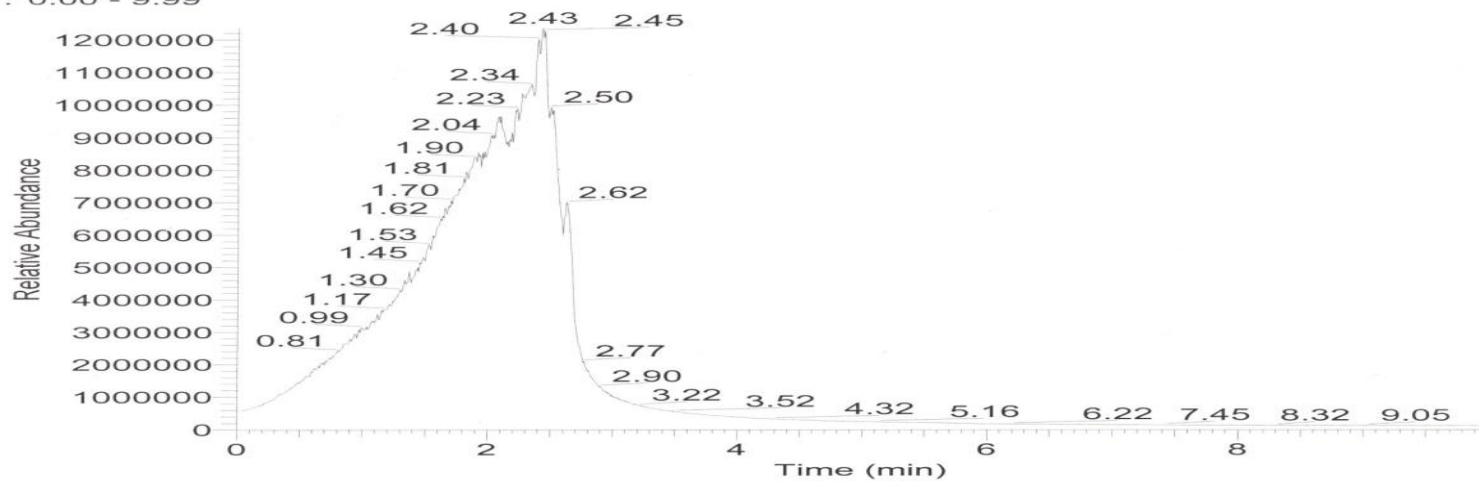


Figura I.10. IR ácido salicílico.

RT: 0.00 - 9.99



NL:
1.24E7
TIC F: MS
2ATIRSO

2ATIRSO #1 RT: 0.04 AV: 1 NL: 1.49E5
Γ: + c Full ms [50.00-650.00]

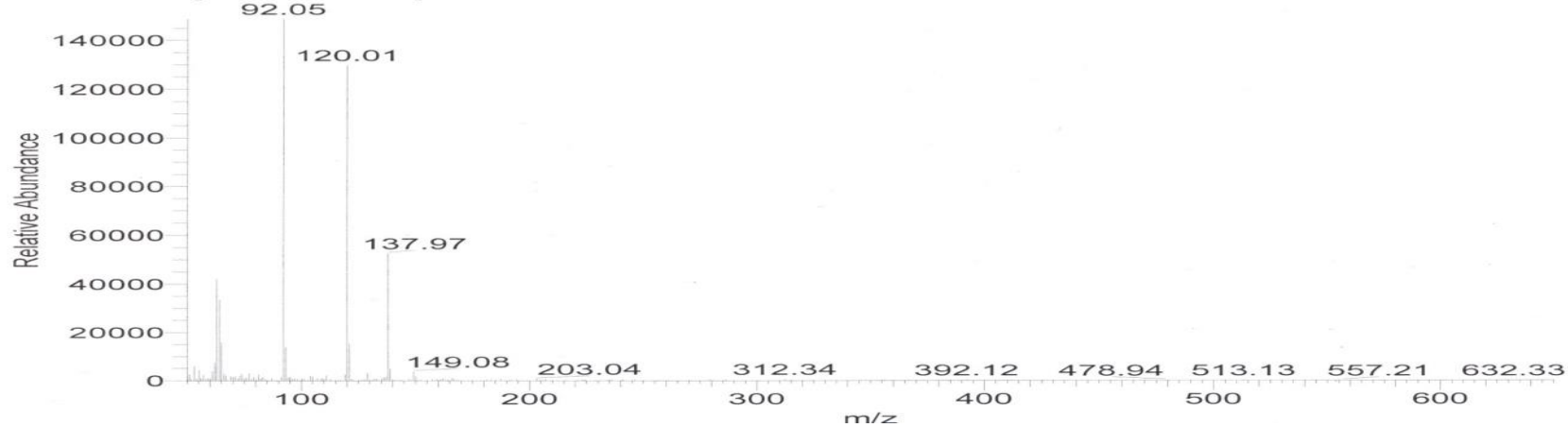


Figura I.11. m/z ácido salicílico.

Anexo III: Procedimiento experimental recomendado y criterios de aceptación para métodos categoría III (disolución)

CATEGORÍA III (DISOLUCIÓN)		
CARACTERISÍSTICAS DEL DESEMPEÑO ANALÍTICO	PROCEDIMIENTO RECOMENDADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN RECOMENDADO
1. Exactitud (recobro)	<p>Si no se utiliza las muestras y resultados del experimento del intervalo realice los siguiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Prepare 15 muestras pesando la cantidad apropiada de placebo (el placebo se mantiene al 100% de la concentración en todas las muestras) con respecto a la concentración especificada. • Enriquezca las muestras placebo con la solución madre de principio activo, a cinco niveles de concentración. Los niveles deben abarcar el intervalo de (Q-25%) a 120% del valor nominal del producto farmacéutico. • Prepare replicados para cada nivel. • Inyecte 3 veces cada muestra aplicando el método analítico, soportado propiamente por el estándar. 	<ul style="list-style-type: none"> • El porciento de recobro del promedio de cada grupo de tres muestras debe estar dentro de $100 \pm 2.0\%$. • El porciento de recobro de cada muestra individual debe estar entre 98%-100%. • El coeficiente de determinación (r^2) debe ser mayor a 0.997. • No debe haber curvatura en la grafica de residuos.

CATEGORÍA III (DISOLUCIÓN)

CARACTERISÍSTICAS DEL DESEMPEÑO ANALÍTICO	PROCEDIMIENTO RECOMENDADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN RECOMENDADO
	<ul style="list-style-type: none">• Inyecte las muestras de menor a mayor concentración.• Calcule el CV para cada concentración.• Grafique la concentración de analito contra la respuesta (promedio de cada grupo de inyecciones).• Realice el análisis de regresión lineal, sin incluir el cero.• Grafique la señal y la magnitud del residuo contra la concentración.• En la grafica de residuos revise los valores lejanos y la curvatura.• Evalúe el intercepto para determinar si se parte desde cero.• Calcule el recobro de cada concentración de muestra (promedio de las tres inyecciones).• Calcule el porciento de recobro de las tres muestras de cada nivel de concentración.• Nota: Se deben realizar estudios separados de recobro para cada forma farmacéutica.	<ul style="list-style-type: none">• El intercepto no debe partir de cero.

2. Precisión

CATEGORÍA III (DISOLUCIÓN)

CARACTERISÍSTICAS DEL DESEMPEÑO ANALÍTICO	PROCEDIMIENTO RECOMENDADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN RECOMENDADO
2.1. Repetitividad del método)	<ul style="list-style-type: none"> • Realice una disolución en 6 unidades de dosis diferentes para las dos potencias si es requerido, de acuerdo al método de disolución. Si existe una sola potencia evalúe dos lotes diferentes de esa misma potencia. • Analice las muestras de acuerdo al método analítico y realice dos inyecciones por cada muestra. • Calcule el porcentaje disuelto para cada unidad individual. • Calcule la media y el coeficiente de variación de las seis disoluciones. 	<ul style="list-style-type: none"> • El CV del porcentaje de recobro no debe ser mayor a 3.0%.
2.2. Precisión intermedia	<ul style="list-style-type: none"> • Un analista diferente debe realizar el análisis con las siguientes restricciones: • Realice el análisis en un día diferente. • Realice el análisis usando diferentes condiciones y diferentes equipos cuando sea posible (columnas, aparatos, reactivos, etc.). • Si es posible utilice un equipo de diferente fabricante. • Realice una disolución en 6 unidades de dosis diferentes 	<ul style="list-style-type: none"> • El CV de la recobro generado por un solo analista no debe ser mayor de 3.0%. • El CV de los resultados generados por los dos analistas en los dos días no

CATEGORÍA III (DISOLUCIÓN)

CARACTERISÍSTICAS DEL DESEMPEÑO ANALÍTICO	PROCEDIMIENTO RECOMENDADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN RECOMENDADO
	<p>para las dos potencias si es requerido, de acuerdo al método de disolución.</p> <ul style="list-style-type: none">• Si existe una sola potencia evalúe dos lotes diferentes de esa misma potencia.• Analice la muestra de acuerdo al método analítico, realice dos inyecciones de cada muestra.• Calcule el porcentaje disuelto para cada unidad individual.• Calcule la media y el CV de las seis disoluciones.• Notas:• La precisión debe ser investigada con muestras homogéneas.• Si no es posible obtener muestras homogéneas, prepare soluciones que puedan analizarse.• Si el método es usado para diferentes tipos de formas farmacéuticas, el método debe validarse para cada forma farmacéutica.• Si hay diferentes potencias de fármaco, la precisión debe	<p>debe ser mayor al 4.0%.</p>

CATEGORÍA III (DISOLUCIÓN)

CARACTERISÍSTICAS DEL DESEMPEÑO ANALÍTICO	PROCEDIMIENTO RECOMENDADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN RECOMENDADO
3. Especificidad	<p>evaluarse para la potencia baja y alta.</p> <ul style="list-style-type: none">• Si existe solo una potencia, la precisión del método debe realizarse en dos lotes diferentes.• Inyecte por duplicado una muestra representativa de medio de disolución.• Prepare e inyecte por duplicado un blanco y diluyente de la muestra (si aplica).• Si se utiliza estándar interno, inyecte el estándar interno solo para confirmar la especificidad.• Prepare un placebo para cada potencia. Si las formulaciones son proporcionales, el placebo debe prepararse en una sola potencia.• Para productos encapsulados, disuelva una capsula vacía en un volumen apropiado de medio de disolución.• Inyecte el blanco de capsula por duplicado.• Inyecte cada placebo por duplicado.• Confirme que los picos no pueden ser atribuidos al medio	<ul style="list-style-type: none">• Confirme que no hay interferencia en la zona de elución del principio activo por parte del blanco, placebo, estándar interno (si aplica), el diluyente o la capsula.

CATEGORÍA III (DISOLUCIÓN)

CARACTERISÍSTICAS DEL DESEMPEÑO ANALÍTICO	PROCEDIMIENTO RECOMENDADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN RECOMENDADO
4. Linealidad	<p>de disolución, blanco, placebo o capsula vacía.</p> <ul style="list-style-type: none">• Defina cada pico observado por RRT referente al compuesto principal.• <i>Notas:</i> Si hay una interferencia significativa por parte de la capsula, puede ser corregida preparando un blanco de capsula como se menciona en la USP <711>.• Prepare cinco soluciones estándares del analito a ~50%, 70%, 100%, 130% y 150% usando soluciones diluidas de la solución madre.• Realice tres inyecciones de cada concentración, soportadas por el estándar.• Asegúrese de realizar las inyecciones de mayor a menor concentración para evitar acarreos de las muestras de mayor concentración a las de menor concentración.• Calcule el CV para cada concentración.• Grafique la concentración contra la respuesta (promedio de	<ul style="list-style-type: none">• El r^2 debe ser mayor a 0.9999.• No debe haber curvatura en la gráfica de residuales.• El intercepto no debe partir de cero.

CATEGORÍA III (DISOLUCIÓN)

CARACTERISÍSTICAS DEL DESEMPEÑO ANALÍTICO	PROCEDIMIENTO RECOMENDADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN RECOMENDADO
--	----------------------------------	---

las respuestas de cada grupo de concentraciones).

- Realice el análisis de regresión lineal, pero no incluya el cero y no forcé la línea hacia el origen.
 - Grafique la señal y magnitud de los residuales contra la concentración de analito.
 - Revise que la grafica no muestra valores desviados o curvatura.
 - Evalúe el intercepto para determinar si hay relación con el origen.
 - Grafique el residual de las mediciones Y-C.
 - Notas:
 - Si el método es usado para diferentes concentraciones, asegúrese que la linealidad se evalúe desde el 50% del valor nominal más bajo hasta el 150 % del valor nominal más alto.
 - Si el valor de r^2 es menor a 0.9998 calcule t para evaluar la si las desviaciones son considerables.
-

CATEGORÍA III (DISOLUCIÓN)

CARACTERISÍSTICAS DEL DESEMPEÑO ANALÍTICO	PROCEDIMIENTO RECOMENDADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN RECOMENDADO
5. Intervalo	<ul style="list-style-type: none">• Si nos utiliza los resultados de las muestras de la exactitud se debe realizar el siguiente experimento:• Prepare 15 muestra pesando una cantidad apropiada del placebo (el placebo se mantiene al 100% en todos las concentraciones), con respecto a la cantidad especificada en el método que está siendo validado.• Enriquezca las muestras placebo con la solución madre de principio activo, a cinco niveles de concentración. Los niveles deben abarcar el intervalo de (Q-25%) a 120% del valor nominal del producto farmacéutico.• Prepare tres muestras para cada nivel.• Inyecte por triplicado las muestras y analice de acuerdo al método propuesto, soportado por el estándar.• Asegúrese de realizar las inyecciones de mayor a menor concentración para evitar acarreo de las muestras de mayor concentración a las de menor concentración.• Calcula el CV para cada muestra de cada grupo.	<ul style="list-style-type: none">• El r^2 debe ser mayor a 0.9998.• No debe existir curvatura en la grafica de los residuales.• El intercepto no debe tocar el cero.

CATEGORÍA III (DISOLUCIÓN)

CARACTERISÍSTICAS DEL DESEMPEÑO ANALÍTICO	PROCEDIMIENTO RECOMENDADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN RECOMENDADO
--	----------------------------------	---

- Grafique la concentración contra la respuesta (promedio de las respuestas de cada grupo de concentraciones).
 - Realice el análisis de regresión lineal, pero no incluya el cero y no forcé la línea hacia el origen.
 - Grafique la señal y magnitud de los residuales contra la concentración de analito.
 - Revise que la grafica no muestra valores desviados o curvatura.
 - Evalúe el intercepto para determinar si hay relación con el origen.
 - Calcule el recobro de cada muestra individual (promedio de las tres inyecciones).
 - Calcule el promedio del recobro de cada grupo de muestras.
- Notas:
- Si hay múltiples potencias, la prueba se debe realizar para las dos concentraciones.
-

CATEGORÍA III (DISOLUCIÓN)

CARACTERISÍSTICAS DEL DESEMPEÑO ANALÍTICO	PROCEDIMIENTO RECOMENDADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN RECOMENDADO
6. Determinación de la adecuabilidad del sistema	<ul style="list-style-type: none"> • Si la potencia es proporcional en sus dosis, la linealidad puede ser evaluada usando una sola potencia. • Si el compuesto es de baja solubilidad, disuelva el compuesto en una cantidad pequeña de solvente (No mayor del 5% del volumen total). • Las muestras del intervalo pueden ser usadas para exactitud. • El intervalo de (Q-25%) a 120% se describe mejor con un ejemplo. En las especificaciones de un producto de liberación controlada se cubre un intervalo de liberación de 25% después de una hora y más del 90% después de 24 horas, entonces el intervalo debe ser validado desde 0 a 110% de la cantidad etiquetada. • Cuando se aplicable, calcule la adecuabilidad del sistema (factor de capacidad, factor de coleo, resolución, platos teóricos y reproducibilidad) para cada corrida cromatográfica durante la validación. • Identifique los límites superiores e inferiores para cada 	<ul style="list-style-type: none"> • Se sugieren los siguientes criterios como mínimo: • $k' \geq 2.0$, donde k' es el factor de capacidad. • $T \leq 2$, donde T es el factor

CATEGORÍA III (DISOLUCIÓN)

CARACTERISÍSTICAS DEL DESEMPEÑO ANALÍTICO	PROCEDIMIENTO RECOMENDADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN RECOMENDADO
	<p>parámetro analizado los valores obtenidos durante la validación.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Establecer los criterios mínimos para este intervalo. 	<p>de coleo.</p> <ul style="list-style-type: none"> • $R > 1.5$, donde R es la resolución. • $N \geq 2000$ donde N son los platos teóricos de la columna. • $CV \leq 2.0\%$, donde CV es el coeficiente de variación o desviación estándar relativa.
<p>7. Estudios de estabilidad de las soluciones</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Prepare estándar fresco de acuerdo a la prueba, asegure que las soluciones de anaquel y el estándar de trabajo estén disponibles para el análisis. • Prepare u obtenga las muestras de disolución (producto farmacéutico disuelto en medio de disolución y diluido apropiadamente). • Analice estas soluciones con el método, estableciendo el 	

CATEGORÍA III (DISOLUCIÓN)

CARACTERISÍSTICAS DEL DESEMPEÑO ANALÍTICO	PROCEDIMIENTO RECOMENDADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN RECOMENDADO
8. Estudios de retención	<p>tiempo cero para cada evaluación.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tome una alícuota de cada solución en un frasco de vidrio y expóngalo a condiciones de anaquel. • Tome una alícuota de cada solución en un frasco ámbar y expóngalo a condiciones de anaquel. • Tome una alícuota de cada solución en un frasco de vidrio y colóquelo en el refrigerador. • Analice estas muestras contra un estándar fresco cada 24 h por dos días. • Realice dos inyecciones de cada muestra. • Calcule el porcentaje de recobro para todas las soluciones. <p>Notas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Después de dos días las muestras deben ser analizadas en intervalos a discreción del analista. • Un estándar fresco debe ser preparado diariamente. 	<ul style="list-style-type: none"> • Para el estándar de la

CATEGORÍA III (DISOLUCIÓN)

CARACTERISÍSTICAS DEL DESEMPEÑO ANALÍTICO	PROCEDIMIENTO RECOMENDADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN RECOMENDADO
del filtro	<p>activo seco a 100% del valor nominal de la valoración.</p> <ul style="list-style-type: none">• Cuando sea necesario, tres muestra de los productos pueden ser sustituidos por los placebos enriquecidos.• Filtre porciones de cada placebo enriquecido por lo menos con dos posibles filtros. Asegúrese que el filtro está disponible comercialmente. Si es una revalidación, evaluar un filtro especificado y otro propuesto.• Inyecte las muestras tres veces y analice de acuerdo al método analítico.• Calcule el porciento de recobro de cada muestra y CV de las replicas de las inyecciones.• Calcule el promedio de recobro de cada filtro.	<p>valoración, el estándar fresco y el estándar de verificación no debe variar más del 1.5%.</p> <ul style="list-style-type: none">• La muestra de disolución es considerada suficientemente estables a través del tiempo si la perdida no es más del 2.0% del valor inicial.• Para el placebo enriquecido, el porcentaje de recobro debe ser de 100 \pm2.0% para el promedio de cada grupo.• Para cada placebo enriquecido, el recobro

CATEGORÍA III (DISOLUCIÓN)

CARACTERISÍSTICAS DEL DESEMPEÑO ANALÍTICO	PROCEDIMIENTO RECOMENDADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN RECOMENDADO
--	----------------------------------	---

debe ser de 97-103%.
