UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS AMÉRICAS

CARRERA DE FARMACIA

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN PARA UN PERFIL DE DISOLUCIÓN DE AZITROMICINA TABLETAS RECUBIERTAS DE 500MG EN UN LABORATORIO FARMACÉUTICO NACIONAL, DURANTE SEPTIEMBRE DEL 2021 A DICIEMBRE DEL 2021

MODALIDAD DE TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIATURA EN FARMACIA

MÓNICA PAOLA GUEVARA GONZÁLEZ

TUTOR: HUGO LEANDRO ALPÍZAR

SAN JOSÉ

ABRIL, 2022

Contenido

CAPÍTULO I: PROBLEMA 18

1.1 Introducción 18

1.2 Planteamiento del Problema 19

1.3 Objetivos 20

1.3.1 Objetivo General 20

1.3.2 Objetivos Específicos 20

1.4 Justificación 21

1.5 Antecedentes 23

1.5.1 Antecedentes Internacionales 23

1.5.2 Antecedentes Nacionales 24

1.5.3 Antecedentes Históricos 25

1.5.3.1 Consejo Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH) 25

1.5.3.2 Ministerio de Salud de Costa Rica (MINSA) 26

1.5.3.3 Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 27

1.5.3.4 Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP) 27

1.5.3.5 Organización Mundial de la Salud (OMS) 28

1.5.3.6 Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) 28

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO 30

2.1 Industria Farmacéutica 30

2.1.1 Historia de la Industria Farmacéutica 31

2.1.2 Buenas Prácticas de Manufactura 32

2.1.3 Buenas Prácticas de Laboratorio 33

2.1.4 La Industria Farmacéutica en Costa Rica 34

2.1.5 Laboratorio Farmacéutico Nacional 35

2.2 Principio activo y Medicamento 36

2.2.1 Medicamento Innovador 37

2.2.2 Medicamento Genérico/Multiorigen 37

2.3 Tabletas recubiertas 39

2.4 Antibióticos 39

2.4.1 Antibióticos Macrólidos 40

2.4.1.1 Historia 40

2.4.1.2 Estructura y Clasificación 41

2.4.1.3 Azitromicina 43

2.4.1.3.1 Historia 43

2.4.1.3.2 Síntesis 44

2.4.1.3.3 Características físico-químicas. 46

2.4.1.3.4 Propiedades farmacocinéticas 47

2.4.1.3.5 Mecanismo de acción 48

2.4.1.3.6 Usos 48

2.5 Disolución de una forma farmacéutica sólida 50

2.5.1 Factores que afectan la velocidad de disolución 51

2.5.1.1 Factores relacionados con las condiciones de la prueba de disolución 51

2.5.1.1.1 Temperatura 51

2.5.1.1.2 Agitación 52

2.5.1.1.3 Composición del medio de disolución 52

2.5.1.2 Factores relacionados con las propiedades fisicoquímicas del fármaco 53

2.5.1.2.1 Solubilidad 53

2.5.1.2.2 Área superficial 53

2.5.1.3 Factores relacionados con el proceso de formulación 54

2.5.1.4 Factores relacionados con el proceso de fabricación 54

2.5.2 Importancia de la disolución en la absorción por vía oral de fármacos 55

2.6 Sistema de Clasificación Biofarmacéutica 56

2.7 Ensayos In vitro 58

2.7.1 Ensayo de Disolución 58

2.7.1.1 Aparatos para la prueba de disolución 60

2.7.1.1.1 Aparato I (Aparato de canasta) 61

2.7.1.1.2 Aparato II (Aparato de paleta) 62

2.7.1.2 Perfil de disolución comparativo……63
2.7.1.2.1 Condiciones experimentales para el desarrollo de estudios de perfiles de disolución in vitro 64
2.8 Método analítico 66
2.9 Validación de métodos analíticos 67
2.9.1 Características para la validación de métodos analíticos……68
2.9.2 Parámetros de desempeño para validación de procedimientos analíticos 69
2.9.2.1 Exactitud……..69
2.9.2.1.1 Comparación con un método oficial, validado o estandarizado 70
2.9.2.1.2 Adición estándar 70
2.9.2.1.3 Comparación de las curvas de regresión lineal de estándares con curvas de regresión lineal de placebos enriquecidos (métodos de curvas de respuesta relativa) 72
2.9.2.1.4 Comparación de los resultados obtenidos de un estándar o material de referencia certificado. 72
2.9.2.2 Precisión……...72
2.9.2.2.1 Repetibilidad..... 73
2.9.2.2.2 Precisión Intermedia 73
2.9.2.2.3 Reproducibilidad 73
2.9.2.3 Especificidad……74
2.9.2.3.1 Comparación del comportamiento de la matriz o impurezas con respecto al comportamiento del estándar. 74
2.9.2.3.2 Comparación del comportamiento de muestra enriquecida con matriz con respecto al comportamiento de estándar enriquecido con matriz 75
2.9.2.3.3 Comparación del comportamiento de muestras enriquecidas con analito con respecto al comportamiento de estándar enriquecido con analito 75
2.9.2.3.4 Procedimientos adicionales para verificar la especificidad 75
2.9.2.4 Linealidad e intervalo……...76
2.9.2.4.1 Linealidad e intervalo del sistema 77
2.9.2.4.2 Linealidad e intervalo del método 77
2.9.3 Documentación para la validación analítica. 78
2.9.3.1 Protocolo de validación……78

2.9.3.2 Informe del estudio de validación……79
2.10 Herramientas estadísticas empleadas en la evaluación de la validación 79
2.11 Cromatografía Líquida de Alta Resolución 81
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO 86
3.1 Enfoque.....86
3.2 Diseño de la investigación.....87
3.3 Pruebas iniciales para la optimización del método de análisis.....90
3.4 Instrumentación para el desarrollo metodológico del perfil de disolución y su validación. 90
3.4.1 Equipos e instrumentación.....90
3.5 Metodología para la valoración de tabletas recubiertas de Zithromax® 500mg.....91
3.5.1 Evaluación de la solubilidad de azitromicina en los medios de disolución establecidos por el MINSA para el desarrollo del perfil de disolución.....94
3.6 Metodología para el desarrollo del perfil de disolución.....94
3.6.1 Descripción de la preparación del perfil de disolución pH 1.2.....95
3.6.1.1 Reactivos……..95
3.6.1.2 Preparación del estándar……..95
3.6.1.3 Preparación de la muestra……96
3.6.2 Descripción de la preparación del perfil de disolución pH 4.5.....96
3.6.2.1 Reactivos 96
3.6.2.2 Preparación del estándar……..96
3.6.2.3 Preparación de la muestra…….97
3.6.3 Descripción de la preparación del perfil de disolución pH 6.8.....97
3.6.3.1 Reactivos:…….97
3.6.3.2 Preparación del estándar……...98
3.6.3.3 Preparación de la muestra…….98
3.7 Validación del perfil de disolución.....100
3.7.1 Metodología para la evaluación de los parámetros de desempeño 100
3.7.1.1 Metodología para la preparación de las soluciones muestra y estándar……102

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN Y RESULTADOS.....105

4.1 Pruebas preliminares para el desarrollo del perfil de disolución comparativo.....105

4.1.1 Valoración de tabletas recubiertas de Zithromax® de 500mg.....105

4.1.2 Evaluación de la solubilidad del principio activo en los medios de disolución para el desarrollo del perfil comparativo.....106

4.1.3 Evaluación de las condiciones cromatográficas de la prueba de disolución empleado en el Laboratorio Farmacéutico Nacional para su uso en el desarrollo del perfil de disolución comparativo.....106

4.1.4 Determinación de la cantidad mínima de principio activo que se disuelve del perfil de disolución en el primer tiempo de muestreo.....111

4.1.5 Evaluación de la estabilidad de la azitromicina en los medios de disolución 112

4.1.5.1 Evaluación de la estabilidad en el medio de disolución a pH 1.2……..112

4.1.5.2 Evaluación de la estabilidad en el medio de disolución a pH 4.5……..117

4.2 Validación del método analítico.....118

4.2.1 Evaluación de los parámetros de desempeño del perfil de disolución en los medios de disolución a pHs 1.2, 4.5 y 6.8.....119

4.2.1.1 Especificidad……..119

4.2.1.2 Exactitud……121

4.2.1.3 Precisión……123

4.2.1.4 Linealidad e intervalo……124

4.3 Comprobación de la metodología del perfil de disolución comparativo.....133

4.3.1 Comprobación de la metodología del perfil de disolución comparativo en el medio de disolución a pH 1.2 133

4.3.2 Comprobación de la metodología del perfil de disolución comparativo en el medio de disolución a pH 4.5 135

4.3.3 Comprobación de la metodología del perfil de disolución comparativo en el medio de disolución a pH 6.8 139

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES……..

BIBLIOGRAFÍA.....146

ANEXOS.....166

Anexo 1. Resultados de la valoración de tabletas recubiertas de Zithromax® de 500mg 166

Anexo 2. Descripción de la preparación de muestras y estándares para la validación del perfil de disolución pH 1.2.....168

Reactivos.....168

Preparación del estándar madre (9.255mg/mL).....168

Preparación de las muestras al 33%.....168

Preparación de las muestras al 66%.....169

Preparación de las muestras al 100%.....169

Preparación de las muestras al 133%.....169

Preparación de las muestras al 167%.....170

Preparación de soluciones estándar al 33% 170

Preparación de soluciones estándar al 66% 170

Preparación de soluciones estándar al 100% 171

Preparación de soluciones estándar al 133% 171

Preparación de soluciones estándar al 166% 171

Descripción de la preparación de muestras y estándares para la validación del perfil de disolución pH 4.5.....172

Reactivos.....172

Preparación del estándar madre (9.255mg/mL).....172

Preparación de las muestras al 33%.....172

Preparación de las muestras al 66%.....173

Preparación de las muestras al 100%.....173

Preparación de las muestras al 133%.....174

Preparación de las muestras al 167%.....174

Preparación de soluciones estándar al 33% 174

Preparación de soluciones estándar al 66% 175

Preparación de soluciones estándar al 100% 175

Preparación de soluciones estándar al 133% 175

Preparación de soluciones estándar al 166% 175

Descripción de la preparación de muestras y estándares para la validación del perfil de disolución pH 6.8.....176
Reactivos.....176
Preparación del estándar madre (9.255mg/mL).....176
Preparación de las muestras al 33%.....176
Preparación de las muestras al 66%.....177
Preparación de las muestras al 100%.....177
Preparación de las muestras al 133%.....178
Preparación de las muestras al 167%.....178
Preparación de soluciones estándar al 33%.....178
Preparación de soluciones estándar al 66%.....179
Preparación de soluciones estándar al 100%.....179
Preparación de soluciones estándar al 133%.....179
Preparación de soluciones estándar al 166%.....179
Anexo 3. Resultados de la validación.....181
Evaluación de la Especificidad.....181
Evaluación de la linealidad del sistema.....182
Evaluación de la linealidad del método.....186
Evaluación de la exactitud.....191
Determinación de la exactitud para la validación del perfil de disolución a pH 1.2……..191
Determinación de la exactitud para la validación del perfil de disolución a pH 4.5……..193
Determinación de la exactitud para la validación del perfil de disolución a pH 6.8……..194
Evaluación de la precisión.....196
Anexo 4. Análisis de datos por medio de regresión lineal.....199
Regresión lineal para la exactitud.....199
Regresión lineal para la evaluación de la linealidad del sistema.....200
Regresión lineal para la evaluación de la linealidad del método.....202
Anexo 5. Marca y pureza de los materiales utilizados.....204

Cuadros

Cuadro 1. Descripción de la gestión de estudios de laboratorio.....34
Cuadro 2. Clasificación de los principios activos según el sistema de clasificación biofarmacéutico.....57
Cuadro 3. Correlación in vivo-in vitro esperada de medicamentos según el principio activo de acuerdo con el sistema de clasificación biofarmacéutico.....58
Cuadro 4. Condiciones experimentales para el desarrollo de perfiles de disolución comparativos de formas farmacéuticas de liberación inmediata.....66
Cuadro 5. Parámetros de desempeño para procedimientos analíticos físico-químicos.....69
Cuadro 6. Criterios de aceptación para la exactitud. 71
Cuadro 7. Intervalo de trabajo para la determinación de la linealidad según la prueba.....76
Cuadro 8. Herramientas estadísticas para el análisis de resultados.....80
Cuadro 9. Operacionalización de variables.....87
Cuadro 10. Cronograma para la validación del perfil de disolución de azitromicina tabletas recubiertas de 500mg 89
Cuadro 11. Equipos para el desarrollo del método analítico del perfil de disolución y de la validación 91
Cuadro 12. Condiciones cromatográficas para la valoración.....92
Cuadro 13. Simbología para el cálculo de resultados.....93
Cuadro 14. Determinación de la solubilidad aproximada de sustancias 94
Cuadro 15. Material volumétrico empleado en la preparación de las muestras y estándares 104
Cuadro 16. Resultados de la valoración de Zithromax® 500mg tabletas recubiertas.....106
Cuadro 17. Evaluación de las muestras en los medios de disolución a pH 1.2, 4.5 y 6.8 111
Cuadro 18. Cantidad de principio activo disuelto del medicamento genérico y de referencia a los 10 minutos en los medios de disolución 112
Cuadro 19. Lecturas de las soluciones muestras para la evaluación de la estabilidad del medio de disolución a pH 1.2.....113
Cuadro 20. Lecturas de las soluciones de las muestras para la evaluación de la estabilidad del medio de disolución a pH 4.5.....117

Cuadro 21. Resultados de la prueba de exactitud en el medio de disolución a pH 1.2 121
Cuadro 22. Resultados de la prueba de exactitud en el medio de disolución a pH 4.5 122
Cuadro 23. Resultados de la prueba de exactitud en el medio de disolución a pH 6.8 122
Cuadro 24. Prueba de t para la pendiente e intercepto 123
Cuadro 25. Coeficiente de variación para la prueba de precisión en el medio de disolución a pH 1.2, 4.5 y 6.8 123
Cuadro 26. Prueba F para el análisis de varianza de la regresión lineal 128
Cuadro 27. Prueba de t para la pendiente 130
Cuadro 28. Prueba de t para el intercepto.....130
Cuadro 29. Resultados de la validación del método analítico para los medios de disolución a pHs 1.2, 4.5 y 6.8.....131
Cuadro 30. Primer perfil de disolución de Zithromax® tabletas recubiertas de 500mg en la solución amortiguadora a pH 4.5 137
Cuadro 31. Segundo perfil de disolución de Zithromax® tabletas recubiertas de 500mg en la solución amortiguadora a pH 4.5 138
Cuadro 32. Primer perfil de disolución de Zithromax® tabletas recubiertas de 500mg en la solución amortiguadora a pH 6.8 140
Cuadro 33. Segundo perfil de disolución de Zithromax® tabletas recubiertas de 500mg en la solución amortiguadora a pH 6.8 141
Cuadro 34. Resultados del estándar para el cálculo de la valoración.....166
Cuadro 35. Datos para el cálculo de la valoración de tabletas recubiertas de Zithromax® de 500mg.....166
Cuadro 36. Resultados de la valoración de tabletas recubiertas de Zithromax® de 500mg 167
Cuadro 37. Determinación de la especificidad de la validación del perfil de disolución a pH 1.2.....181
Cuadro 38. Determinación de la especificidad de la validación del perfil de disolución a pH 4.5.....181
Cuadro 39. Determinación de la especificidad de la validación del perfil de disolución a pH 6.8.....182

Cuadro 40. Determinación de la linealidad del sistema para la validación del perfil de disolución a pH 1.2.....182
Cuadro 41. Determinación de los residuales para la linealidad del sistema en la validación del perfil de disolución a pH 1.2 183
Cuadro 42. Determinación de la linealidad del sistema para la validación del perfil de disolución a pH 4.5.....184
Cuadro 43. Determinación de los residuales para la linealidad del sistema en la validación del perfil de disolución a pH 4.5 184
Cuadro 44. Determinación de la linealidad del sistema para la validación del perfil de disolución a pH 6.8.....185
Cuadro 45. Determinación de los residuales para la linealidad del sistema en la validación del perfil de disolución a pH 6.8 186
Cuadro 46. Determinación de la linealidad del método para la validación del perfil de disolución a pH 1.2.....187
Cuadro 47. Determinación de los residuales para la linealidad del método en la validación del perfil de disolución a pH 1.2 187
Cuadro 48. Determinación de la linealidad del método para la validación del perfil de disolución a pH 4.5.....188
Cuadro 49. Determinación de los residuales para la linealidad del método en la validación del perfil de disolución a pH 4.5 189
Cuadro 50. Determinación de la linealidad del método para la validación del perfil de disolución a pH 6.8.....190
Cuadro 51. Determinación de los residuales para la linealidad del método en la validación del perfil de disolución a pH 6.8 190
Cuadro 52. Datos de la solución estándar al 100% 191
Cuadro 53. Datos para la exactitud de la solución muestra al 33% 192
Cuadro 54. Datos para la exactitud de la solución muestra al 100% 192
Cuadro 55. Datos para la exactitud de la solución muestra al 167% 192
Cuadro 56. Datos de la solución estándar al 100% 193
Cuadro 57. Datos para la exactitud de la solución muestra al 33% 193
Cuadro 58. Datos para la exactitud de la solución muestra al 100% 194

Cuadro 59. Datos para la exactitud de la solución muestra al 167% 194
Cuadro 60. Datos de la solución estándar al 100% 195
Cuadro 61. Datos para la exactitud de la solución muestra al 33% 195
Cuadro 62. Datos para la exactitud de la solución muestra al 100% 195
Cuadro 63. Datos para la exactitud de la solución muestra al 167% 196
Cuadro 64. Datos de la precisión para la validación del perfil de disolución a pH 1.2....196
Cuadro 65. Datos de la precisión para la validación del perfil de disolución a pH 4.5....197
Cuadro 66. Datos de la precisión para la validación del perfil de disolución a pH 6.8....198
Cuadro 67. Marca y lote de las tabletas y estándar secundario utilizados 204
Cuadro 68. Marca y pureza de reactivos utilizados.....204

Figuras

Figura 1. Degradación de la eritromicina en condiciones ácidas 42
Figura 2. Clasificación general de los principales antibióticos macrólidos 43
Figura 3. Síntesis de azitromicina 45
Figura 4. Comparación de la estructura química de la azitromicina y eritromicina 47
Figura 5. Usos de la azitromicina a partir de su descubrimiento 49
Figura 6. Disolución de una forma farmacéutica sólida 50
Figura 7. Aparato 1 (canasta) 62
Figura 8. Aparato 2 (paleta) 63
Figura 9. Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC) 82
Figura 10. Pureza de picos en un detector con arreglo de diodos marca Agilent 84
Figura 11. Esquema de un cromatógrafo líquido de alta resolución 85
Figura 12. Metodología de la prueba de valoración 92
Figura 13. Metodología del perfil de disolución 99
Figura 14. Descripción de la metodología para la validación del perfil de disolución 101
Figura 15. Metodología analítica para la preparación del estándar madre 102
Figura 16. Metodología para la preparación de los estándares a pH 6.8 103
Figura 17. Metodología para la preparación de las muestras a pH 6.8 104
Figura 18. Comparación de espectros cromatográficos entre el estándar, muestra y placebo del medicamento genérico en el medio de disolución a pH 1.2 108
Figura 19. Comparación de espectros cromatográficos entre el estándar, muestra y placebo del medicamento genérico en el medio de disolución a pH 4.5 109
Figura 20. Comparación de espectros cromatográficos entre el estándar, muestra y placebo del medicamento genérico en el medio de disolución a pH 6.8 110
Figura 21. Cromatografía de las soluciones muestras para la evaluación de la estabilidad del medio de disolución a pH 1.2 114
Figura 22. Comparación de la solución muestra a pH 1.2 con 8 horas de diferencia 115
Figura 23. Vía de descomposición de la azitromicina en medio ácido 116
Figura 24. Cromatografía de las soluciones muestras para la evaluación de la estabilidad del medio de disolución a pH 4.5 118

Figura 25. Determinación de la especificidad en los tres medios de disolución.....120
Figura 26. Curvas de calibración para evaluación de la linealidad del sistema en el medio de disolución a pH 1.2.....124
Figura 27. Curvas de calibración para evaluación de la linealidad del sistema en el medio de disolución a pH 4.5.....125
Figura 28. Curvas de calibración para evaluación de la linealidad del sistema en el medio de disolución a pH 6.8.....125
Figura 29. Curvas de calibración para evaluación de la linealidad del método en el medio de disolución a pH 1.2.....126
Figura 30. Curvas de calibración para evaluación de la linealidad del método en el medio de disolución a pH 4.5.....126
Figura 31. Curvas de calibración para evaluación de la linealidad del método en el medio de disolución a pH 6.8.....127
Figura 32. Distribución de los residuos para la linealidad del sistema 129
Figura 33. Distribución de los residuos para la linealidad del método 129
Figura 34. Disociación de la azitromicina en el medio de disolución a pH 1.2 134
Figura 35. Cromatograma del perfil de disolución a pH 4.5 136
Figura 36. Cromatograma del perfil de disolución a pH 6.8 140
Figura 37. Regresión lineal para la exactitud del pH 1.2 199
Figura 38. Regresión lineal para la exactitud del pH 4.5 199
Figura 39. Regresión lineal para la exactitud del pH 6.8 200
Figura 40. Regresión lineal para la linealidad del sistema a pH 1.2 200
Figura 41. Regresión lineal para la linealidad del sistema a pH 4.5 201
Figura 42. Regresión lineal para la linealidad del sistema a pH 6.8 201
Figura 43. Regresión lineal para la linealidad del método a pH 1.2 202
Figura 44. Regresión lineal para la linealidad del método a pH 4.5 202
Figura 45. Regresión lineal para la linealidad del método a pH 6.8 203

Abreviaturas y Símbolos

BP	British Pharmacopoeia
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
CV	Coeficiente de variación
EMA	European Medicines Agency
EFPIA	European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations
FDA	United States Food and Drug Administration
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
IFPMA	European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations
MINSA	Ministerio de Salud
OMS	Organización Mundial de la Salud
PIB	Producto Interno Bruto
PROCOMER	Agencia de Promoción del Comercio Exterior de Costa Rica
mg	Miligramos
mL	Mililitros
r	Coeficiente de correlación
r^2	Coeficiente de determinación
rpm	Revoluciones por minuto
RSD	Desviación estándar relativa
RTCA	Reglamento Técnico Centroamericano
SCB	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica
USP	United States Pharmacopeia
UV-V	Ultravioleta visible

CAPÍTULO I: PROBLEMA

1.1 Introducción

El presente trabajo de investigación plantea la adaptación de una metodología analítica de una disolución de azitromicina tabletas recubiertas de 500mg, para el desarrollo de un método que permita la elaboración de un perfil de disolución comparativo entre un medicamento multiorigen y el de referencia, desarrollado en un laboratorio farmacéutico nacional. Por lo tanto, se pretende proporcionar un método analítico validado, que cuente con la evaluación de los parámetros de desempeño exigidos por parte del Ministerio de Salud de Costa Rica, contemplando así: especificidad, linealidad e intervalo del sistema, linealidad e intervalo del método, exactitud y precisión[1].

De acuerdo con el Ministerio de Salud de Costa Rica, el desarrollo de los perfiles de disolución debe corresponder a las condiciones fisiológicas del organismo, para lo cual se deberán utilizar pHs con similitud al jugo gástrico, intestinal y un pH intermedio. Por esta razón, se desarrollará y validará un método analítico para una solución amortiguadora de acetato de pH 4.5, una solución amortiguadora de fosfato a pH 6.8 y una solución de ácido clorhídrico a pH 1.2, empleando un cromatógrafo líquido de alta resolución para la determinación analítica del contenido de azitromicina (API), con tiempos de muestreo de 10, 15, 20, 30, 45 y 60 minutos, según lo recomendado por parte del Ministerio de Salud de Costa Rica para formas dosificadas de liberación inmediata[2]. Posteriormente, se procederá a verificar la metodología analítica evaluando 12 unidades de Zithromax®, considerado como el medicamento de referencia a utilizar por parte del Ministerio de Salud de Costa Rica[3].

Antes de desarrollar la validación, se deben determinar los porcentajes de disolución máximos y mínimos que se obtendrán del perfil de disolución, tanto del medicamento genérico como del innovador, con el fin de conocer el rango a utilizar en la validación, ya que este debe garantizar datos fiables dentro del intervalo de trabajo. La validación para las muestras se realizará

mediante la adición de estándar con placebo, que corresponde a la mezcla con todos los componentes de la matriz de la muestra sin el principio activo a determinar, para posteriormente enriquecer el placebo con estándar[1]. Lo anterior se hará a cinco niveles de concentración diferentes, tanto para los estándares como para las muestras, de acuerdo con los valores máximos y mínimos obtenidos en el método analítico para los tres medios de disolución del perfil, elaborando estándares y muestras por triplicado para cada uno los niveles.

1.2 Planteamiento del Problema

La azitromicina es un antibiótico macrólido de subclase azida, utilizado en el tratamiento de bronquitis, infecciones cutáneas, faringitis, amigdalitis y neumonías[4], activo frente a una amplia gama de microorganismos gram-positivos y gram-negativos. De acuerdo con el Centro de Información Tecnológica y apoyo a la Gestión de la Propiedad Industrial[5], este fármaco se ha convertido en el antibiótico más vendido a nivel mundial; su interés sanitario radica en su baja biodisponibilidad, dando lugar a variabilidad intra e interindividual, atribuido a una disolución errática en el tracto gastrointestinal por su baja solubilidad en solventes acuosos, limitando así su absorción[4].

La disolución de un medicamento administrado por vía oral es un prerrequisito para su posterior absorción en el organismo, las características fisicoquímicas del principio activo, los excipientes y la tecnología empleada para el desarrollo de las formulaciones influyen en el proceso de liberación in vitro de un fármaco. Los medicamentos genéricos requieren el desarrollo de estudios in vivo e in vitro, que demuestren su capacidad de aportar la misma cantidad de principio activo que el medicamento de referencia, siendo este último útil cuando la disolución del medicamento es el paso limitante en el proceso de absorción[6]. Los perfiles de disolución comparativos permiten determinar el porcentaje de principio activo que se disuelve con respecto al tiempo bajo condiciones controladas, logrando establecer la existencia de semejanzas entre medicamentos que son equivalentes farmacéuticos, permitiendo así ser un marco de referencia para determinar el posible comportamiento del medicamento[7].

El Laboratorio Farmacéutico Nacional, donde se llevará a cabo el trabajo de investigación, pretende evaluar si su formulación de tabletas recubiertas de azitromicina de 500mg es bioequivalente con respecto al medicamento innovador. Sin embargo, para este proceso primero realizará estudios in vitro, que permitirán evaluar su formulación contra el medicamento de referencia según el Ministerio de Salud, para posteriormente desarrollar estudios in vivo. Para cumplir este objetivo, es necesario desarrollar un método analítico debidamente validado para la elaboración del perfil de disolución comparativo; es por esta razón que el presente trabajo de investigación pretende implementar una metodología analítica validada para el desarrollo de perfiles de disolución comparativos, y ante esto surge la siguiente pregunta:

¿La metodología analítica para el desarrollo del perfil de disolución comparativo de azitromicina tabletas recubiertas de 500mg a desarrollar permitirá demostrar datos válidos y confiables?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Desarrollar la validación y adaptación de un método analítico para un perfil de disolución de azitromicina tabletas recubiertas de 500mg por cromatografía líquida de alta resolución, en un laboratorio farmacéutico nacional.

1.3.2 Objetivos Específicos

Desarrollar, a partir del método interno utilizado en el Laboratorio Farmacéutico Nacional para la prueba de disolución de tabletas recubiertas de 500mg de azitromicina, un método que permita la aplicación de un análisis de un perfil de disolución comparativo empleando los medios de disolución a pH 1.2, 4.5 y 6.8.

Demostrar el cumplimiento de las características de desempeño de validación analítica para la metodología del perfil de disolución de Azitromicina tabletas recubiertas de 500mg al departamento de Control de Calidad.

Comprobar las características de desempeño del perfil de disolución en un producto farmacéutico (Azitromicina) de referencia oficial del MINSA.

1.4 Justificación

La adquisición de medicamentos representa un presupuesto importante del PIB de un país; tanto la Organización Mundial de la Salud como la Organización Panamericana de Salud promueven la compra de medicamentos genéricos, con el fin de incentivar la contención del gasto[8] al ser más asequibles, tanto para los pacientes como para los sistemas sanitarios del país, atribuido a la menor inversión económica que representa para el laboratorio farmacéutico que lo desarrolla, en comparación con el medicamento innovador. Sin embargo, los productos genéricos deben mostrar su equivalencia terapéutica mediante estudios in vitro y/o in vivo contra un medicamento innovador o de referencia, con la finalidad de garantizar el acceso a medicamentos de calidad, seguros y eficaces, asegurando así la equivalencia terapéutica del medicamento multifuente[9].

Posterior a la administración oral de una forma farmacéutica sólida, su absorción dependerá de la liberación del principio activo, de la disolución en los jugos digestivos y de su permeabilidad en el tracto gastrointestinal; por lo tanto, un perfil de disolución comparativo permite orientar el comportamiento del medicamento in vivo, ya que para lograr una adecuada absorción de este es necesario que se encuentre disuelto en el fluido biológico donde se presenta su absorción. Es por esta razón que los estudios de disolución in vitro resultan útiles para la evaluación del comportamiento de una formulación de productos equivalentes farmacéuticos antes de la realización de estudios in vivo[1].

Los métodos analíticos implementados en un laboratorio farmacéutico deben asegurar la obtención de resultados válidos y confiables; la validación de estos conlleva al establecimiento de evidencia documental bajo estudios sistemáticos, y que permitan demostrar que dicha metodología presenta las características de desempeño aptas para el cumplimiento de las aplicaciones analíticas que se pretenden realizar, permitiendo así la obtención de datos reproducibles y fiables dentro de los intervalos de trabajo establecidos. Es por esta razón que surge la necesidad, para dicho laboratorio farmacéutico nacional, de desarrollar y validar la metodología analítica para la elaboración del perfil de disolución comparativo de azitromicina tabletas recubiertas de 500mg, propiciando así el desarrollo de esta tesis.

Su relevancia social radica en la necesidad por parte de la población en acceder a medicamentos menos costosos, que cuenten con los estándares de calidad, que certifiquen que su efecto terapéutico en la población será el mismo que el medicamento original. De acuerdo con Fraile[10], según datos del mercado farmacéutico en Costa Rica, el Antibac®, un medicamento genérico cuyo principio activo es azitromicina, se encuentra dentro de los diez productos que registran mayor venta en las farmacias del país, y no así el medicamento original, lo que refleja la preferencia por parte de la población en adquirir medicamentos genéricos atribuido a su menor costo.

Además, de acuerdo con el MINSA[11, 12], la azitromicina, al considerarse un fármaco de riesgo sanitario, deberá presentar estudios de perfiles de disolución comparativos y bioequivalencia in vitro e in vivo para los medicamentos que pretendan registrarse en el país, y para optar por la renovación del registro sanitario en caso de encontrarse registrados. Dentro de la documentación a presentarse, se deberá adjuntar el informe de validación del procedimiento analítico implementado en el desarrollo de dichos perfiles de disolución[11]. Por lo tanto, el desarrollo y la validación del perfil de disolución son necesarios para dicho establecimiento farmacéutico, si pretende seguir comercializando un medicamento genérico cuyo principio activo es azitromicina.

1.5 Antecedentes

Este apartado se emplea como un marco de referencia en la tesis a desarrollar, exponiendo lo que se ha publicado y realizado, referente a parámetros de desempeño evaluados y la descripción de procedimientos empleados en la validación de métodos analíticos, centralizándose en las pruebas de perfiles de disolución comparativos a través de la historia, a nivel nacional e internacional.

1.5.1 Antecedentes Internacionales

Rojas[13], en su tesis: ¨Validación de método analítico para test de disolución con objetivo de realizar estudio de bioexención de levofloxacino comprimidos recubiertos de 500 y 750mg¨, desarrolla la validación analítica del método de disolución y la cuantificación de los comprimidos de levofloxacino de liberación inmediata de 500mg y 750mg en un laboratorio en Chile, con la finalidad de que el establecimiento farmacéutico acceda a una bioexención con el medicamento genérico que fabrica, para lo cual deberá realizar perfiles de disolución comparativos a pHs de 1.2, 4.5 y 6.8 entre el medicamento genérico y el de referencia, que corresponde a Tavanic® de Sanofi Aventis. Sin embargo, para este deberán desarrollar una validación del método analítico, y en la misma tesis se concluye que la metodología analítica cumple con las características necesarias para demostrar que el método es apto.

Duque[14], en su tesis ¨Validación de una metodología analítica y estudio de cinética liberación-disolución de quetiapina como análisis preliminar para optar a estudio de bioexención¨, implementó y ejecutó la validación de la metodología analítica para la evaluación de la similitud de perfiles cinéticos de liberación-disolución de dicho fármaco, como un análisis preliminar para optar por un estudio de bioexención entre comprimidos recubiertos de quetiapina de 200mg y como producto de referencia Seroquel®, llevado a cabo en Laboratorios Davis S.A. de Santiago de Chile. Los resultados de la validación mostraron cumplimiento con los criterios de aceptación según las

BPM y el Instituto de Salud Pública, respecto a los perfiles cinéticos de liberación-disolución se presentó similitud entre los comprimidos recubiertos de quetiapina de 200mg y el Seroquel®.

Quesada[15], en su tesis ¨Influencia de los solventes en el desarrollo del método espectrofotométrico para la cuantificación de azitromicina en comprimidos¨. Realizada en la Universidad Central del Ecuador, determinó la influencia de ciertos solventes empleados en la industria farmacéutica para el desarrollo de un método espectrofotométrico, que permitiera cuantificar azitromicina en comprimidos. Los resultados indicaron que el metanol con ácido clorhídrico 0,1N y ácido sulfúrico, permitió disolver exitosamente el principio activo, sin mostrar interferencias en el análisis de dicha formulación. Se evaluó la linealidad, exactitud, precisión, especificidad y robustez del método, y como verificación se comparó la metodología analítica con el método propuesto por la USP y este no mostró diferencias significativas; por lo tanto, se concluye que dicha metodología cumple con las características de desempeño para su fin propuesto.

Mora et al.[16], en su investigación ¨Validación de una metodología analítica para la cuantificación de naproxeno en estudios de reparto líquido/líquido mediante espectrofotometría ultravioleta¨, hecha en la Universidad Nacional de Colombia, realizaron la validación de la metodología analítica para la cuantificación de naproxeno en medios acuosos de pH 1.2 y 7.4 por espectrofotometría UV-V, donde se evaluó la especificidad, linealidad, precisión, repetibilidad del instrumento y método. El análisis estadístico demostró que la metodología analítica para cuantificar naproxeno a pH 1.2 y 7.4 cumplía con los parámetros que se evaluaron; por lo tanto, se concluye que el método propuesto es adecuado en los dos buffers utilizados.

1.5.2 Antecedentes Nacionales

Castiglioni[17] presentó su tesis titulada ¨ Evaluación del impacto de resultados S2 en las pruebas de disolución farmacopeica de fármacos multiorigen presentes en la lista de medicamentos priorizados y que deben demostrar equivalencia terapéutica in vitro¨, para lo obtención del grado

de maestría académica en Análisis y Control de Calidad de Medicamentos en la Universidad de Costa Rica, en el 2019, cuya finalidad era evaluar la variabilidad en la prueba de disolución de distintos lotes de ibersartán de la Caja Costarricense de Seguro Social.

Contempla la descripción del proceso de validación en un medio de pH 6.8, de acuerdo con los requisitos establecidos por parte del MINSA, para el desarrollo de una validación de un perfil de disolución de ibersartán, para su posterior comparación con el medicamento de referencia en el país. Se concluye que los lotes empleados corresponden a equivalentes terapéuticos in vitro en un medio amortiguador de fosfato pH 6.8 de acuerdo con los factores f1 y f2 obtenidos; además, la validación del método analítico empleado cuenta con las características de desempeño adecuadas para el cumplimiento de la prueba analítica[17].

1.5.3 Antecedentes Históricos

1.5.3.1 Consejo Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH)

Creado en abril de 1990, bajo una reunión organizada por EFPIA en Bruselas, impulsada por tragedias presentadas por la comercialización de productos farmacéuticos, como la talidomida en Europa, mostró la importancia de realizar la evaluación de los medicamentos antes de su comercialización; esto trajo consigo la implementación de leyes, directrices y reglamentos en las décadas de 1960 y 1970, con la finalidad de evaluar la seguridad, calidad y eficacia de aquellos. Sin embargo, las diferencias respecto a los requisitos técnicos entre países ocasionaron la duplicación de pruebas, que implicaron costos económicos y una mayor extensión de tiempo para la comercialización de fármacos a nivel internacional[18, 19].

Esto buscó una armonización dentro de la Comunidad Europea en 1980. Su éxito mostró que era posible una armonización entre Europa, Japón y Estados Unidos de América; de esta

manera se originó la ICH, cuyo objetivo es armonizar a nivel mundial los requisitos que garanticen el desarrollo, registro y mantenimiento para la comercialización de medicamentos de calidad, seguros y eficaces en la Comunidad Europea, Estados Unidos de América y Japón, considerando los recursos y altos estándares de calidad que deben cumplir los productos farmacéuticos. Sin embargo, es hasta octubre del 2015 que se instaura como una asociación internacional y una entidad legal bajo la ley suiza[20].

La ICH cuenta con una guía de validación de procedimientos analíticos, la cual identifica y establece las características que deben considerarse para la validación de métodos analíticos necesarios para la comercialización dentro de la Comunidad Europea, Estados Unidos de América y Japón. Creada en octubre de 1993 por parte del comité directivo de la ICH, ha sufrido distintas modificaciones hasta el establecimiento de la última guía vigente en el 2005, renombrada como guía de validación de procedimientos analíticos: texto y metodología, codificada como Q2 (R1)[21].

1.5.3.2 Ministerio de Salud de Costa Rica (MINSA)

El MINSA, con el propósito de establecer las directrices para la validación de distintos procedimientos analíticos, empleados en el análisis de productos farmacéuticos, desarrolló bajo el decreto No 29968-S el reglamento para la validación de métodos analíticos requeridos para el Registro Sanitario de Medicamentos, que contempla los requisitos mínimos que se deben presentar para la validación de un procedimiento analítico, según sea su necesidad o prueba a desarrollar, que permita el registro sanitario de dicho medicamento[22]. Además, el MINSA suministró una guía para la validación de métodos analíticos, que indica las directrices a seguir según la prueba analítica a desarrollar [1].

En agosto del 2009 se publica la ¨Guía técnica para la presentación y evaluación de los estudios de perfiles de disolución comparativos¨, la cual define los lineamientos a seguir para el desarrollo de perfiles de disolución comparativos, incluyendo la metodología y criterios

estadísticos a emplear, para el análisis de datos experimentales obtenidos en los estudios de perfiles de disolución comparativos, en concordancia con lo establecido en el Reglamento para el Registro Sanitario de los Medicamentos que requieren demostrar equivalencia terapéutica[23], el cual indica que los productos farmacéuticos multiorigen que se encuentren dentro del listado priorizado deberán demostrar su equivalencia terapéutica[12].

1.5.3.3 Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA)

Con la finalidad de buscar una integración económica en Centroamérica, se establecen las directrices para la validación de métodos analíticos fisicoquímicos y microbiológicos empleados para controlar la calidad de los medicamentos, cuyo reglamento entra en vigencia en noviembre del 2009, mediante la resolución Nº 188-2006 (COMIECO XL) del Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.03.39:06 Productos Farmacéuticos, el Reglamento de validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos, el cual debe ser aplicado a todas las metodologías analíticas oficiales y no oficiales, para el cumplimiento de normativas vigentes respecto a las buenas prácticas de manufactura y buenas prácticas del laboratorio[24].

1.5.3.4 Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP)

La USP es una organización científica independiente sin fines lucrativos, centralizada en la seguridad y calidad de medicamentos, suplementos dietéticos y alimentos[25] , publicada por primera vez en 1820, que nace atribuida a una necesidad de estandarizar y armonizar información respecto a los medicamentos, la cual, debido a su amplia utilización dentro del sector farmacéutico, fundó en 1990 la Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos de América, que ha desarrollado programas para la confección de materiales de referencia, una constante revisión de sus monografías, incorporación de nuevos fármacos y normalización con distintas farmacopeas y organizaciones[26].

Al armonizar en lo posible con la directriz tripartita sobre la validación de procedimientos analíticos de ICH, la USP establece, en el capítulo ‹1225›, la validación de procedimientos compendiados, la cual indica los parámetros requeridos para la validación de métodos analíticos, según el procedimiento a desarrollar, proporcionando documentación completa sobre la validación de distintos métodos analíticos[27], que es considerada como un marco de referencia oficial en el país.

1.5.3.5 Organización Mundial de la Salud (OMS)

La OMS es una autoridad directiva y coordinadora sanitaria en el sistema de las Naciones unidas, encargada de promover el desarrollo, fomentar la seguridad sanitaria, fortalecer los sistemas de salud y promover la investigación e información[28]. Ella surge tras una reunión en 1945, conformada por una serie de diplomáticos, con la finalidad de establecer una Organización Mundial de la Salud, lo que desencadenaría con la entrada en vigor de la constitución de la OMS el 7 de abril de 1948[29].

Así mismo, esta organización, en su informe técnico 32 de 1992, anexo 5 sobre validación de los procedimientos analíticos en la industria farmacéutica, indica la finalidad de la validación de los métodos analíticos, describe la presentación de datos, las características de los procedimientos analíticos y las que se deben considerar para cada una de las distintas pruebas[30].

1.5.3.6 Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA)

LA FDA surge a partir de la ley de la pureza de los alimentos y medicamentos en 1906, gracias a los esfuerzos de Harvey Washington Wiley[31]. Esta organización pretende proteger y promover la salud pública, además de enfrentar los desafíos de innovación a nivel industrial, además esta organización corresponde a un marco de referencia en temas de disolución en la industria farmacéutica.

En su ¨Guía para la industria: pruebas de disolución de formas de dosificación oral sólidas de liberación inmediata¨, pretende promover recomendaciones para el desarrollo de pruebas de disolución, enfoques para el establecimiento de sus especificaciones, métodos estadísticos que permiten la comparación de perfiles de disolución y los requerimientos necesarios para acceder a una exención de un estudio de bioequivalencia in vivo. Además, hace recomendaciones en las pruebas de disolución para el aseguramiento de la calidad de los medicamentos posterior a cambios en su aprobación respecto a procesos de fabricación[33].

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

El siguiente apartado pretende abarcar los términos necesarios para la comprensión y análisis de aspectos asociados con el desarrollo de la investigación. De acuerdo con Hernández et al.[34], consiste en la integración de la información que se ha recopilado, permitiendo la orientación para elaborar la investigación y la interpretación de los resultados, al contextualizarlos dentro de un conjunto de conocimientos que se poseen sobre el problema.

2.1 Industria Farmacéutica

La industria farmacéutica es uno de los sectores empresariales más rentables e influyentes a nivel mundial[35], el cual constituye un elemento esencial dentro de los sistemas de asistencia sanitaria; se encarga del descubrimiento, desarrollo, fabricación, control de calidad y comercialización de medicamentos empleados para curar, prevenir y detener distintas enfermedades y alteraciones, tanto en seres humanos como en animales. Su desarrollo se basa en la investigación continua y el descubrimiento de moléculas que presenten propiedades farmacéuticas atractivas seguras y eficaces[36].

Está constituida por grandes organizaciones gubernamentales o particulares dedicadas a la investigación y desarrollo (I+D), lo que ha propiciado distintos descubrimientos científicos y tecnológicos, permitiendo el desarrollo de productos farmacéuticos innovadores, que demuestren actividades terapéuticas más eficaces y que generen una menor cantidad de efectos secundarios. Algunas compañías farmacéuticas se encargan de la fabricación de producción primaria, las cuales elaboran productos químicos farmacéuticos en grandes cantidades, mientras que otras compañías se encargan de la producción destinada a uso médico y consumo final, empleando métodos estandarizados y certificados; dentro de este sector se encuentra la elaboración de productos medicamentosos dosificados en distintas formas farmacéuticas, como lo son: óvulos, pastillas, cápsulas, inyectables, suspensiones, entre otros[37].

Los laboratorios farmacéuticos se encuentran constituidos por factores sociales, científicos y económicos. Por lo tanto, muchas compañías farmacéuticas comercializan sus productos tanto en el mercado interno como externo; es por ello que sus actividades se encuentran ampliamente reguladas por las respectivas autoridades sanitarias y organismos nacionales e internacionales, con políticas que aseguren la integridad de sus operaciones industriales, permitiendo así garantizar la seguridad, calidad y eficacia de los productos comercializados[36].

Debido a la alta inversión económica asociada a los gastos de investigación y desarrollo, comercialización, fabricación y control de calidad, los laboratorios farmacéuticos que han desarrollado un medicamento innovador tienen a su disposición derechos de patentes, lo que quiere decir que tienen el permiso de comercializar, de manera exclusiva, los medicamentos o fármacos durante cierto período, y una vez finalizado este, cualquier laboratorio farmacéutico que cumpla con el marco regulatorio puede hacer uso del principio activo para el desarrollo del medicamento[36].

2.1.1 Historia de la Industria Farmacéutica

La industria farmacéutica surge a partir de actividades asociadas a la obtención y desarrollo de sustancias medicinales. A partir del siglo XIX boticarios, químicos o dueños de herbolarios recolectaban de manera local, o incluso de otros continentes, partes secas de distintas plantas; los especieros se encargaban de la importación de productos con fines medicinales, destacando el opio de Persia o la ipecacuana de Suramérica. Los comerciantes de aceites y gomas comercializaban productos químicos y minerales que eran utilizados por parte de los boticarios y químicos para la elaboración de extractos, mezclas, tinturas, lociones, pomadas, píldoras, entre otros que se comenzaron a comercializar a granel[37].

La investigación de distintas plantas permitió la extracción de principios activos empleados en la elaboración de diversos productos medicinales. Sin embargo, los extractos de quina, opio, belladona, centeno cornudo y digitalina comenzaron a presentar variaciones en cuanto a su

actividad farmacológica. Durante 1820, Joseph Pelletier logra aislar alcaloides como atropina, quinina y estricnina, permitiendo normalizar la extracción comercial de estos principios activos. La compañía farmacéutica T.H. Smith Ltd., en Edimburgo, Escocia, fue una de las primeras compañías que logró la extracción de alcaloides de manera comercial; los esfuerzos químicos permitieron la difusión de pruebas químicas en las farmacopeas, obligando así a los fabricantes de estos productos el establecimiento de laboratorios[37].

Por tanto, fue así como los principios activos y medicamentos químicos bajo las exigencias farmacológicas, microbiológicas y bioquímicas comenzaron a sufrir una serie de transformaciones en su naturaleza y fisionomía, donde las raíces, cortezas, hojas, semillas y frutos a partir de los cuales se elaboraban remedios en las droguerías comenzaron a desaparecer durante el siglo XIX, para dar paso a medicamentos desarrollados bajo los pilares de la ciencia, estética e industria. Los avances en materia científica a lo largo de la historia han permitido la resolución de problemas de índole farmacocinética, fisiológica y técnica (sabores y olores desagradables, problemas respecto a su solubilidad, disgregación, biodisponibilidad) a partir de recursos farmacotécnicos[38].

En 1885, la compañía farmacéutica Bayer comercializa como analgésico el primer fármaco semisintético, la acetofenidina, bajo la marca Phenacetin, del cual deriva el paracetamol, que actualmente se emplea como analgésico. En 1899, dentro del laboratorio farmacéutico de esta misma compañía, se logra aislar el ácido acetilsalicílico, comercializándose a nivel mundial como Aspirina®, marcando así la historia de la historia de la industria farmacéutica[35].

2.1.2 Buenas Prácticas de Manufactura

Constituyen un conjunto de normas que deben ser implementadas, por parte de los laboratorios farmacéuticos, para asegurar la calidad de los medicamentos, las cuales deben ser supervisadas por parte del Estado como ente regulador[36]. De acuerdo con la OMS[39], corresponden al aspecto de garantía de calidad que garantiza el control y la fabricación de medicamentos de

acuerdo con a los estándares de calidad adecuados para su uso, y según las especificaciones del producto. La industria farmacéutica debe cumplir una serie de principios y directrices que permitan asegurar la calidad, seguridad y eficacia de los productos, para lo cual considera los siguientes puntos[40].

- Organización y personal
- Edificios e instalaciones
- Equipo
- Materiales y productos
- Documentación
- Producción
- Garantía de calidad
- Control de calidad
- Producción y análisis por contrato
- Validación
- Quejas, reclamos y retiro de productos
- Autoinspección y auditorias de calidad
- Vigilancia y verificación.

2.1.3 Buenas Prácticas de Laboratorio

De acuerdo con la OMS[41], su propósito es promover la obtención de datos de calidad, así como proporcionar una herramienta que garantice la gestión de estudios del laboratorio, incluyendo su desarrollo, presentación de informes y archivo. Sus principios se consideran un conjunto de estándares que aseguran la integridad y calidad de los estudios elaborados (de los cuales se debe garantizar la trazabilidad de los datos), para lo que se deben asignar roles y responsabilidades para el mantenimiento de una buena gestión operativa de los estudios; por lo tanto, esta organización

enfatiza la importancia en los puntos descrito en el cuadro 1, los cuales corresponden a recursos, procedimientos, resultados y la gestión de garantía de calidad.

Cuadro 1. Descripción de la gestión de estudios de laboratorio

Puntos	Descripción
Recursos	Personal, la organización, las instalaciones y el equipo
Procedimientos	Elaboración de protocolos y procedimientos operativos estándar
Resultados	Informes finales y archivos
Garantía de calidad	Seguimiento de los procesos de investigación

Fuente: elaboración propia a partir de referencia[41].

2.1.4 La Industria Farmacéutica en Costa Rica

Las exportaciones en el país han crecido un 26%, tras comparar el primer semestre del 2021 respecto al primer semestre del 2020[42], las cuales representan uno de los incrementos más grandes durante los últimos cinco años. El sector farmacéutico ha sido uno de los grupos beneficiados: de acuerdo con PROCOMER[43], las exportaciones en el país por parte del sector químico farmacéutico experimentaron un incremento del 10% durante enero a octubre del 2021, tras su comparación respecto al mismo periodo durante el año 2020.

Respecto a la adquisición de productos farmacéuticos por parte de la población nacional, aproximadamente un 70% de estos son costeados por medio de la Caja Costarricense de Seguro Social, correspondiendo al 30% restante los gastos reportados por medicamentos adquiridos en los servicios de salud privados. En el país se comercializan más de 3 000 productos, de estos los innovadores representan el 27%, los genéricos de marca corresponden al 66,5% y sin marca el 6,5%; esto muestra un valor en el mercado aproximado de USD de $351 270 139[44].

Costa Rica importa cerca del 60% de los medicamentos, y solo un 40% se elaboran de manera local[44]. La cadena de valor de medicamentos en Costa Rica exhibe un alto grado de complejidad, asociada a la gran cantidad de agentes que se encuentran incorporados en ella; esa misma comienza a partir de los laboratorios farmacéuticos. Actualmente, en el país se encuentran 27 compañías encargadas de la elaboración de medicamentos, que cuentan con laboratorio dentro del territorio nacional, nueve de los cuales son de carácter extranjero y 18 corresponden a capital costarricense, de los que tres pertenecen al Estado (dos de la CCSS y una del Instituto Clodomiro Picado, adscrito a la Facultad de Microbiología de la UCR) [45].

Entre algunos de los laboratorios farmacéuticos establecidos en el territorio costarricense, se encuentran Abbot, Calox, Alcames, Newport Pharmaceuticals, Gutis, Raven, Chemo, Lisan, Medipharma, Ancla y el laboratorio de Seguridad Social (que produce algunos medicamentos y analiza la calidad de los usados de manera institucional). Tanto los laboratorios farmacéuticos nacionales como internacionales les proporcionan los distintos medicamentos a las distribuidoras de medicamentos, entre las cuales destacan Farmanova Intermed, CEFA, Cofasa, Cofasc, Condefa y Technofarma; estas se encargan del abastecimiento de las diversas farmacias que se encuentran dentro del territorio nacional, para su posterior adquisición por parte de la población[44].

2.1.5 Laboratorio Farmacéutico Nacional

Atribuido a un tema de confidencialidad acordado con el establecimiento farmacéutico, no se proporcionan detalles del laboratorio farmacéutico nacional donde se desarrolló el presente trabajo de investigación; por lo tanto, se proporciona una breve descripción de esa compañía, considerada como necesaria.

Es una empresa cuya misión radica en mejorar la salud de la población por medio de distintas especialidades farmacéuticas, tanto dentro del mercado nacional como internacional.

Cumple con las buenas prácticas de laboratorio, las buenas prácticas de manufactura y los estándares de calidad, que permiten asegurar la elaboración de medicamentos seguros y eficaces; se encarga de la fabricación de distintas formas farmacéuticas sólidas, líquidas y semisólidas, como lo son jarabes, tabletas, suspensiones, cápsulas, cremas, gotas y geles.

La compañía farmacéutica se enfoca en la elaboración de medicamentos multifuentes. Actualmente solo cuenta con un medicamento innovador; es por esta razón que a partir del 2021 comenzó el desarrollo de perfiles de disolución comparativos, con la finalidad de evaluar su formulación y lograr, a futuro, la comercialización de medicamentos equivalentes terapéuticos a partir de estudios in vitro, que permitan dar paso al desarrollo de estudios in vivo en el extranjero.

2.2 Principio activo y Medicamento

Un principio activo es una sustancia pura, que se encuentra químicamente definida y caracterizada, obtenida a partir de fuentes naturales o sintetizadas en el laboratorio, que presenta una acción biológica de la cual se pueden aprovechar o no sus efectos terapéuticos[46]. A diferencia suya, los excipientes son sustancias que se adicionan de manera intencional a la formulación de una forma farmacéutica distinta del principio activo, lo que permite su preparación, mejora su estabilidad, contribuyen a modificar las propiedades organolépticas o fisicoquímicas del principio activo y su biodisponibilidad[47].

Un medicamento es una forma farmacéutica que se encuentra constituida por uno o más principios activos. Además de distintos excipientes necesarios en la formulación, los medicamentos deben contar con los controles analíticos (que permitan garantizar su pureza, composición, entre otras) farmaco-toxicológicos con respecto a su actividad y estudios sobre sus posibles efectos adversos previo a su comercialización[46].

2.2.1 Medicamento Innovador

De acuerdo con la OMS[48], los medicamentos innovadores son aquellos que cuentan con estudios que garantizan su calidad, seguridad y eficacia en estudios previos y posteriores a su comercialización; por lo tanto, son la primera opción para emplearse como medicamentos de referencia. Sin embargo, en caso de que los mismos no se encuentren en el mercado o no se puedan obtener fácilmente, se puede considerar como medicamento de referencia el producto farmacéutico más utilizado (medicamento líder) o el que se introdujo por primera vez en el mercado. Una autoridad reguladora nacional puede designar al medicamento de comparación, considerando en orden de preferencia los siguientes aspectos:

- Un producto innovador cuya seguridad, calidad y eficacia han sido demostradas, y cuente con autorización para su comercialización nacional.
- Un producto líder en el mercado donde se comercializa.
- Un producto de comparación recomendado por la OMS, el cual debe encontrarse incluido en la lista internacional de productos de comparación, o el sugerido en el contexto del equipo de precalificación.
- Un producto innovador que ha sido aprobado por parte de una autoridad regulatoria estricta, es decir, un país que se encuentre asociado a la ICH.
- Un producto que ha sido aprobado en un país asociado a la ICH.

2.2.2 Medicamento Genérico/Multiorigen

El constante aumento del gasto en medicamentos a nivel mundial, atribuido al crecimiento poblacional e incremento en la esperanza de vida de la población, ha repercutido en el presupuesto por parte de los gobiernos, generando preocupaciones dentro de los sistemas de seguridad social, autoridades sanitarias y en la población en general; esto ha originado la búsqueda de alternativas que contribuyan a reducir su impacto en la economía, una alternativa es la adquisición de

medicamentos conocidos por la mayor parte de la población como medicamentos genéricos, denominados dentro del mercado farmacéutico como medicamentos multiorigen o multifuentes[9].

Un medicamento genérico es un producto farmacéutico que contiene un principio activo conocido y desarrollado por otra entidad, el cual cuenta con ensayos clínicos elaborados por el medicamento innovador, permitiendo así demostrar su eficacia y seguridad hacia la población; por lo tanto, un medicamento genérico presenta un menor costo económico atribuido a su menor inversión en los procesos de desarrollo y comercialización, en comparación con el medicamento innovador[49].

Por lo tanto, un medicamento genérico es un equivalente farmacéutico, al contener cantidades idénticas de los mismos principios activos del producto farmacéutico al que es equivalente, en idéntica forma farmacéutica y vía de administración, pero puede diferir en cuanto a los excipientes empleados y en su proceso de fabricación; por ello no necesariamente presenta los mismos efectos terapéuticos en la población[49]. El RTCA 11.03.59:11 Productos farmacéuticos, medicamentos para uso humano. Requisitos de registro sanitario[50] emplea el término producto farmacéutico multiorigen y lo conceptualiza como un medicamento equivalente farmacéutico o una alternativa farmacéutica que podría o no ser un equivalente terapéutico, y si un producto farmacéutico multiorigen es equivalente terapéutico este se considera intercambiable.

De acuerdo con el Reglamento de inscripción, control, importación y publicidad de medicamentos de Costa Rica[51], dos equivalentes farmacéuticos pueden demostrar distinta actividad farmacológica y biodisponibilidad. Según Álvarez Heredia[52], la biodisponibilidad de un fármaco se define como la cantidad y velocidad en que el principio activo se absorbe a partir de la forma farmacéutica que lo contiene y llega al sitio de acción farmacológica; este se puede expresar como la fracción de medicamento administrada capaz de llegar a circulación sistémica.

Los estudios de bioequivalencia permiten determinar la velocidad y cantidad de principio activo que pasa de una determinada forma farmacéutica a circulación sistémica, además de llevar a cabo la comparación respecto a la biodisponibilidad de dos formulaciones que contienen la misma cantidad de principio activo, permitiendo así establecer la bioequivalencia terapéutica y, por lo tanto, intercambiabilidad de dos medicamentos[53].

2.3 Tabletas recubiertas

Una tableta es una forma farmacéutica sólida constituida por uno o varios principios activos y sus excipientes; su recubrimiento constituye un proceso por el cual se aplica un material a la superficie de la tableta, que permite brindar ciertas características que se desean para ese material según sea su necesidad, como mejorar sus propiedades organolépticas, facilitar su deglución, mejorar la estabilidad del fármaco al protegerlo del ambiente externo, proteger el principio activo contra el ambiente gástrico y mejorar la resistencia mecánica del medicamento[54]. Estas pueden encontrarse cubiertas por una o más capas de una mezcla de distintas sustancias como resinas, plastificantes, gomas de azúcar, entre otras[55].

2.4 Antibióticos

De acuerdo con Paredes et al[56], los antibióticos son sustancias químicas que se obtienen a partir de distintas especies de microorganismos que desarrollan actividad antimicrobiana; estos constituyen un elemento clave para combatir las enfermedades infecciosas, permitiendo reducciones en la tasa de morbimortalidad asociadas a estas patologías[57]; su obtención se presenta de manera natural a partir de cultivos de microorganismos, los cuales pueden ser hongos o bacterias y de manera sintética a partir de un núcleo básico de un agente de origen natural, con la finalidad de mejorar sus propiedades o reducir los efectos no deseados[56].

Por su parte, Seija et al.[58], indica que los antibióticos constituyen un grupo de sustancias heterogéneas que presentan distinto comportamiento farmacodinámico y farmacocinético, capaces de ejercer una acción de manera específica sobre la estructura o función del microorganismo, con un grado mínimo de toxicidad hacia las células del ser humano, pero con la capacidad de controlar y reducir los microorganismos viables, permitiéndole al sistema inmunológico eliminar los microorganismos restantes; por lo tanto, constituyen moléculas de origen natural, sintéticas o semisintéticas capaces de inducir la muerte o inhibir el crecimiento de bacterias, virus y hongos.

2.4.1 Antibióticos Macrólidos

2.4.1.1 Historia

Los macrólidos fueron descubiertos en 1942 por Gardner y Chain, quienes describieron la pricomicina, el primer compuesto del grupo[59], pero no fue hasta 1950 que Brockmann y Henckel lograron aislarlo de una cepa de Saccharopolyspora erythraea[60]. Durante 1952, en Laboratorios Eli Lilly, a partir de una muestra de suelo proveniente de la isla Panay en Filipinas, Mc Guire y colaboradores obtuvieron la eritromicina[59, 61], la cual fue comercializada con el nombre de iloticina[62], una polihidroxicetolactona, sintetizada por productos metabólicos de la cepa Saccharopolyspora erythraea[61].

En la década de 1950 se aislaron una serie de macrólidos como la carbomicina en 1952, la leucomicina, metimicina y griseomicina en 1953, narbomicina, angolamicina, espiramicina y oleandomicina en 1955, la miamicina en 1957, entre otros. Después se llevaron a cabo ciertas modificaciones estructurales en este grupo, conllevando al desarrollo de subgrupos de macrólidos, tales como los azálidos, siendo el primer miembro la azitromicina y cetólidos tal como la telitromicina, entre otros antibióticos introducidos en la práctica clínica[63].

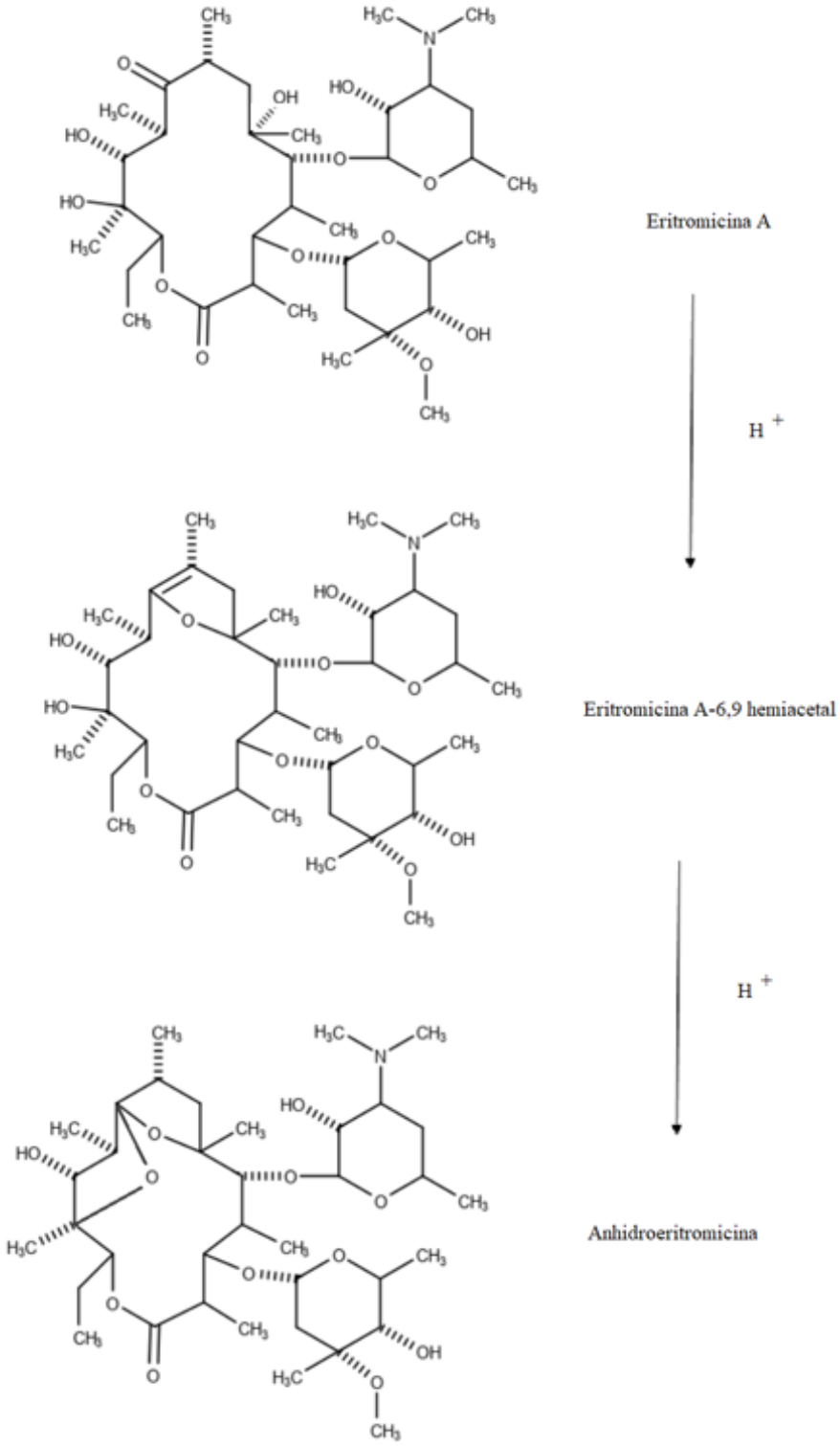
2.4.1.2 Estructura y Clasificación

Son compuestos que presentan, en su estructura química, un anillo lactónico macrocíclico unido por medio de un enlace glucosídico a diversos desoxiazúcares aminados[64]. Este término se reserva para nombrar a la familia de antibióticos formada por compuestos que presentan un anillo de 14, 15 o 16 átomos de carbono[65], los cuales presentan una buena actividad antibacteriana[59].

Los macrólidos se caracterizan por ser bases débiles muy liposolubles, con una baja estabilidad a pHs bajos, al perder aproximadamente un 90% de su actividad por cada unidad de pH que disminuye[66]. La eritromicina, macrólido característico, al ser el primer compuesto utilizado de la familia[67] presenta una vida media de eliminación corta, interacciones medicamentosas[61], irritación gastrointestinal[59] y una alta susceptibilidad al ácido gástrico; por lo tanto, su administración por vía oral ha presentado inconvenientes al originar productos sin actividad antimicrobiana.

En condiciones ácidas, la eritromicina sufre un ataque por parte del grupo hidroxilo que se encuentra en la posición 6 a la cetona, que se ubica en la posición 9 del anillo macrolactónico, lo que produce un hemiacetal que se deshidrata y posteriormente reacciona con el hidroxilo que se encuentra en la posición 12, dando origen a una unión espiroquetal fisiológicamente irreversible y, por lo tanto, un compuesto inactivo[59] (ver figura 1).

Figura 1. Degradación de la eritromicina en condiciones ácidas



Fuente: Fiese et al.[68].

Esto ha propiciado la síntesis de derivados semisintéticos con la modificación estructural del anillo de la eritromicina, mejorando sus propiedades biológicas y farmacocinéticas; estos se pueden clasificar según la cantidad de átomos de carbono que componen el anillo de la lactona macrocíclica y de acuerdo con su origen en natural o semisintético. Dicha clasificación se puede observar en la figura 2; entre los macrólidos de 14 átomos se pueden encontrar la eritromicina, oleandomicina, oxitromicina, diritromicina, fluritromicina, claritromicina, entre otros; los macrólidos con 15 átomos de carbono son la tulatromicina, azitromicina y gamitromicina; y los que presentan 16 átomos de carbono son la josamicina, rokitamicina, kitasamicina, tilosina, midecamicina, miocamicina, espiramicina y tilmicosina[67].

Figura 2. Clasificación general de los principales antibióticos macrólidos

	Macrolide antibiotics				
	14C		15C	16C	
	Natural	Semisynthetic	Semisynthetic	Natural	Semisynthetic
Macrolides	Erythromycin (SA)	Clarithromycin (IA)	–	Spiramycin (SA)	Miocamycin (SA)
	Oleandomycin (SA)	Roxithromycin (IA)	–	Josamicyn (IA)	Rokitamycin (SA)
	Megalomicin	Flurithromycin (IA)	–	Rosaramicin (SA)	Tilmicosin (LA)
	–	Troleandomycin (SA)	–	Tylosin (SA)	Tildipirosin (LA)
	–	Diritrhomycin (LA)	–	Mycinamicin	Tylvalosin (SA)
	–	–	–	Carbomycin (SA)	–
	–	–	–	Leucomycin (IA)	–
	–	–	–	Midecamycin (SA)	–
Azalides	–	–	Azithromycin (LA)	–	–
	–	–	Gamithromycin (LA)	–	–
	–	–	Tulathromycin (LA)	–	–
Ketolides	Picromycin	Telithromycin (IA)	–	–	–
	–	Cethromycin (IA)	–	–	–
	–	Modithromycin (LA)	–	–	–
Fluoroketolides	–	Solithromycin (IA)	–	–	–

Fuente: Gomes et al.[69].

2.4.1.3 Azitromicina

2.4.1.3.1 Historia

La azitromicina es considerada como el antibiótico más vendido a nivel mundial, según la Organización Mundial de Propiedad Intelectual[70]. Fue descubierta en 1970 por parte de un equipo

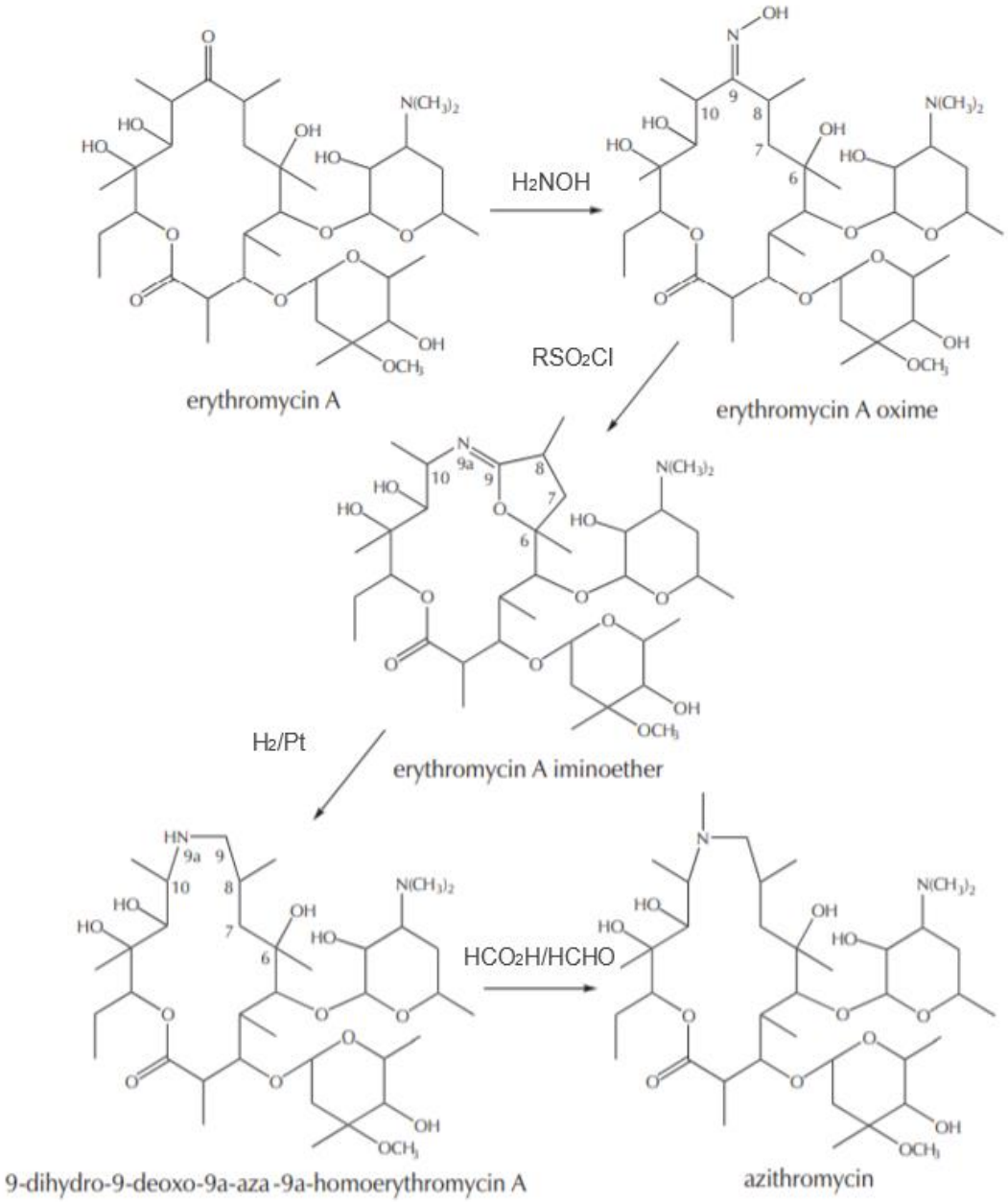
de investigadores de Pliva; desde los primeros ensayos mostró gran eficacia y capacidad de permanecer por mayor tiempo en el tejido orgánico de animales, en comparación con otros antibióticos similares.

En 1981, la compañía farmacéutica presentó la solicitud de patente para dicho fármaco aún en su etapa de experimentación, y en 1986 el laboratorio farmacéutico Pfizer logró un acuerdo de licencia para la comercialización de dicho medicamento a nivel mundial, bajo el nombre de Zithromax®. No obstante, Pliva conservó el derecho de venta del medicamento en Europa central y oriental, y no fue hasta 1988 que comenzó su comercialización con su marca registrada bajo el nombre de Sumamed®[70].

2.4.1.3.2 Síntesis

La obtención de la azitromicina es uno de los mayores logros en la historia científica croata; la misma se sintetizó a partir de la oximación de la eritromicina A con hidroxilamina. Posteriormente, por medio de la transposición de Beckmann debido al cloruro de sulfonilo alcalino, se forma el imino éter de eritromicina A; este, al sufrir una hidrogenación catalítica, se reduce a 9-deoxo-9a-aza-9a-homoeritromicina A, y finalmente por medio de la reacción de Eschweiler-Clarke (reacción de metilación) se introduce un nitrógeno en el anillo macrocíclico, dando lugar a la azitromicina. Su ruta de síntesis se puede ejemplificar en la figura 3.

Figura 3. Síntesis de azitromicina



Fuente: Baniæ Tomišiæ[71].

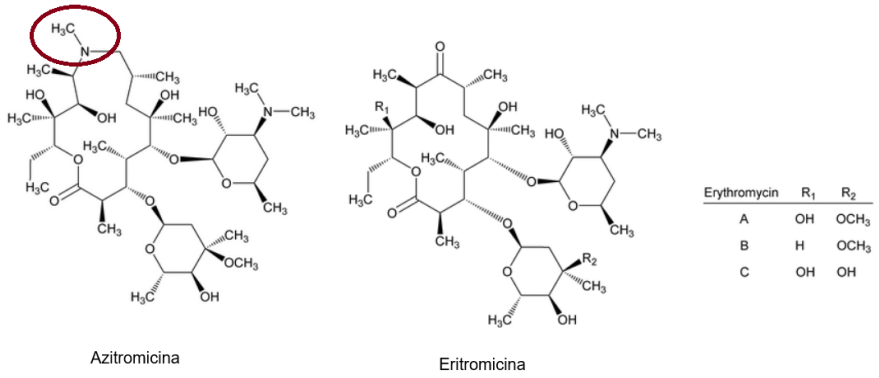
2.4.1.3.3 Características físico-químicas

La azitromicina es un polvo blanco o casi blanco, con un peso molecular de 748,98 g mol $^{-1}$ se solubiliza en cloruro de metileno y etanol anhidro, pero es prácticamente insoluble en solventes acuosos. Exhibe pseudopolimorfismo y existe de manera monohidrato y dihidrato; su forma anhidra es inestable, al convertirse en dihidrato cuando se almacena a temperatura ambiente; de manera monohidratada se transforma a dihidrato, el cual exhibe mayor estabilidad[72].

Su nombre químico corresponde a 2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-13-[(2,6-Dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl-α-l-ribo-hexopyranosyl)oxy]-2-ethyl3,4,10-trihydroxy-3,5,6,8, 10,12,14-heptamethyl-11-[[3,4,6-trideoxy-3-(dimethylamino)-β-d-xylo-hexopyranosyl]oxy]-1-oxa-6-azacyclopentadecan-15-one dihydrate y CAS 117772-70-0 como forma dihidrato[73]. La azitromicina, además de estar como materia prima en la USP, se encuentra como tabletas, cápsulas, suspensión oral e inyectables[74].

Este macrólido semisintético ácido estable con una pKa de 8,5[75], perteneciente a la subclase de antibióticos constituidos por anillo macrocíclico de lactona de 15 átomos de carbono conocidos como azalidos[76], muestra una mayor estabilidad en medio ácido, penetración tisular y actividad antibacteriana, además de una menor incidencia respecto a las reacciones adversas y una vida media más larga (repercutiendo en su régimen posológico) en comparación con la eritromicina[67, 77], compuesto químico del cual se deriva. Su diferencia estructural radica en la sustitución de una molécula de nitrógeno, en lugar del grupo carbonilo en la posición 9 del anillo de aglicona de la molécula de eritromicina[77]; como se ejemplifica en la figura 4, al carecer de dicho carbonilo, no se produce la reacción interna de cetalización, responsable de la degradación en medio ácido de la eritromicina.

Figura 4. Comparación de la estructura química de la azitromicina y eritromicina



Fuente USP[78, 79].

Este azálido presenta mayor actividad ante bacterias gram-negativas (Moraxella, Neisseria, espiroquetas, Haemophilus, Chlamydia trachomatis, enterobacterias y Mycobacterium avium), pero de manera leve una menor actividad ante cocos gram-positivos (S. aureus, Streptococcus) que la eritromicina[80].

2.4.1.3.4 Propiedades farmacocinéticas

Este antibiótico, al ser estable a los ácidos gástricos, se puede administrar con el estómago vacío, cuya biodisponibilidad es del 37% por vía oral[75, 81]. Tras su administración oral, sus concentraciones séricas son más bajas en comparación con la eritromicina. Debido a su rápida distribución hacia los compartimentos extravasculares, la azitromicina penetra muy bien en la mayoría de tejidos a excepción del líquido cefalorraquídeo, se libera de manera lenta hacia los tejidos, lo que ocasiona una vida media tisular de 2-4 horas, generando una prolongada fase de eliminación, con una vida media de eliminación de aproximadamente tres días: estas características farmacocinéticas son las responsables de sus ventajas con respecto a su régimen de dosificación, en comparación con otros macrólidos, correspondiendo así a una pauta posológica cada 24 horas y una reducción en cuanto a la duración del tratamiento[77].

2.4.1.3.5 Mecanismo de acción

Comparte el mecanismo de acción antibacteriano de los macrólidos, los cuales presentan una actividad antimicrobiana lenta, tiempo-dependiente y con efecto post-antibiótico[67]; son considerados bacteriostáticos que actúan inhibiendo la síntesis proteica ribosomal al afectar el ciclo de alargamiento de la cadena peptidil, uniéndose de manera específica a la subunidad 50S del dominio V del 23 ARN ribosomal, ocasionando una supresión en la síntesis proteica y una detención en el crecimiento bacteriano[82]. Sin embargo, a elevadas concentraciones y en medio alcalino y/o frente a microorganismos como Streptococcus pyogenes y Streptococcus pneumoniae, pueden comportarse como bactericidas[67].

2.4.1.3.6 Usos

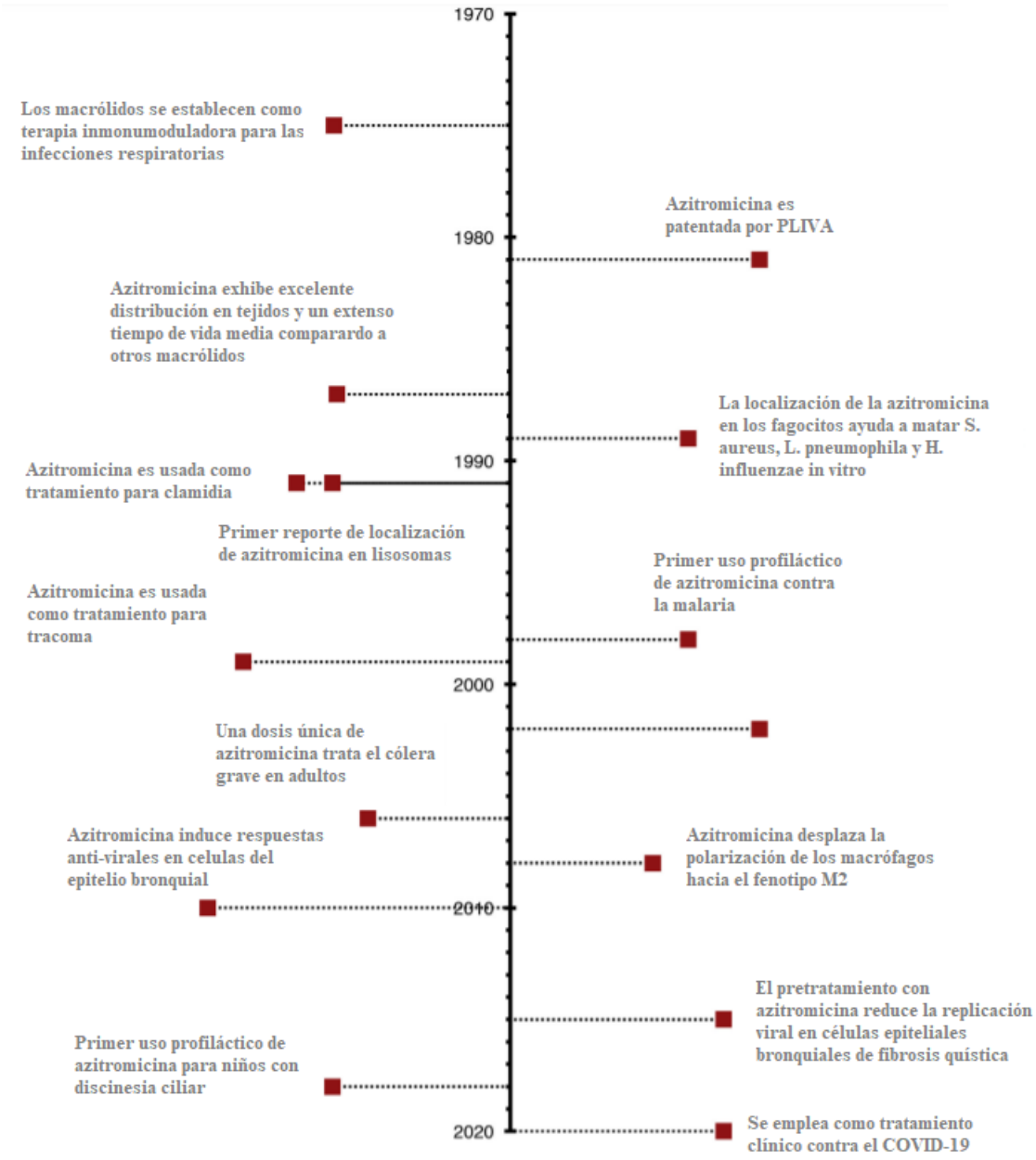
Se administra por vía oral o intravenosa; su espectro de actividad abarca gérmenes aeróbicos grampositivos, como Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes y Streptococcus aureus, gramnegativos como Haemophilus influenzae, Haemophilus parainfluenza, Moraxella catarrhalis, Bordetella pertussis y atípicos como Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare, Mycoplasma pneumoniae, Legionella pneumophila, Chlamydia pneumoniae y Chlamydia trachomatis[83].

Por lo tanto, es indicada para el tratamiento de neumonía, faringitis causada por *Streptococcus pyogenes*, empleada en procesos infecciosos de las vías respiratorias superiores, de la piel e infecciones de transmisión sexual, como clamidia, gonorrea y cancroide[84]. También se utiliza para el tratamiento y prevención de ciertas infecciones bacterianas, en mayor frecuencia las causantes de infecciones del oído medio, sinusitis, bronquitis y para el tratamiento de fiebre tifoidea[83].

Este fármaco se captura de manera rápida y extensa por el medio intracelular, y permanece en los macrófagos pulmonares, en el tejido pélvico, genital y amigdalino; por esta razón presenta

utilidad contra bacterias intracelulares atípicas[83]. La azitromicina es un compuesto que ha sido empleado desde su descubrimiento en el tratamiento de una gran cantidad de patologías. La figura 5 ilustra un recorrido de los usos que ha tenido la misma desde su descubrimiento.

Figura 5. Usos de la azitromicina a partir de su descubrimiento

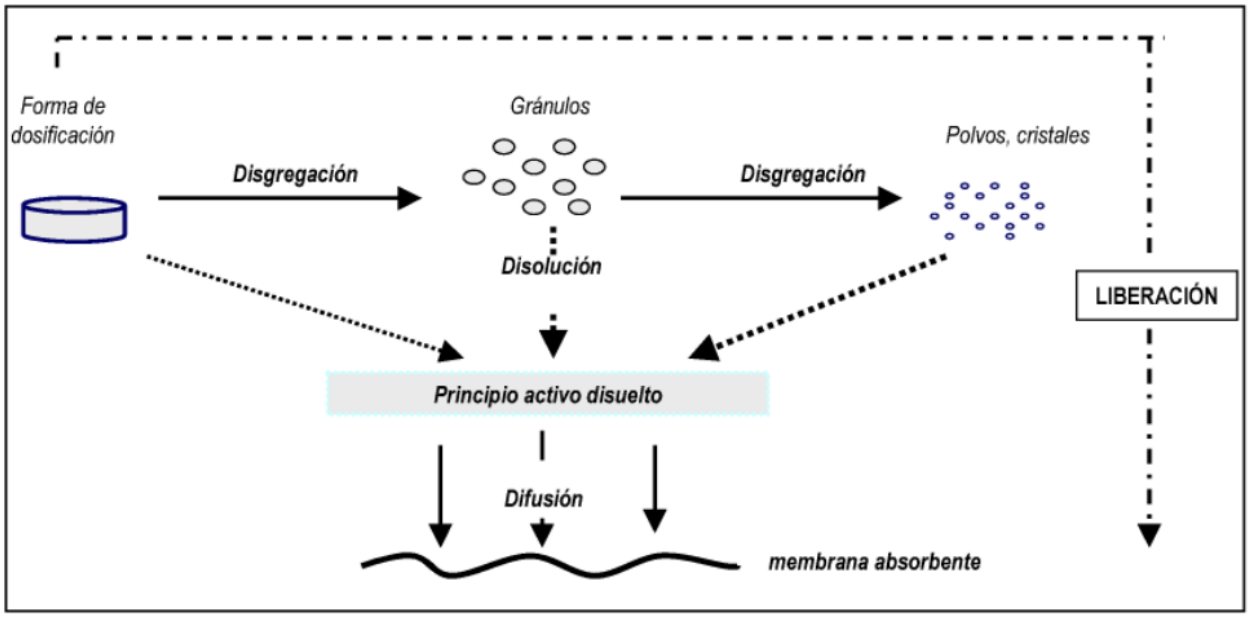


Fuente: Anton et al.[85].

2.5 Disolución de una forma farmacéutica sólida

La disolución es un proceso en el cual una sustancia sólida se solubiliza en el disolvente con la finalidad de producir una solución; esta depende de la afinidad entre la sustancia sólida y el disolvente e implica la liberación de moléculas entre las dos fases. El proceso de disolución para una forma farmacéutica sólida va a comenzar con la humectación y penetración del disolvente en el fármaco, para su posterior desintegración y/o disgregación, en partículas finas o gránulos para disolverlo en el medio (ver figura 6). Su disolución se puede ver afectada por distintos factores relacionados con la formulación, fabricación, condiciones de la prueba de disolución y con las propiedades fisicoquímicas de la sustancia y el medio de disolución[86].

Figura 6. Disolución de una forma farmacéutica sólida



Fuente: López Guzmán[53].

2.5.1 Factores que afectan la velocidad de disolución

2.5.1.1 Factores relacionados con las condiciones de la prueba de disolución

2.5.1.1.1 Temperatura

La disolución de la mayoría de los sólidos corresponde a procesos endotérmicos; de acuerdo con la ley de Le Chatelier, en un proceso de disolución endotérmico al aumentar la temperatura incrementa la solubilidad del sólido, generando un aumento en la velocidad de disolución del sólido. Por otro lado, según la ecuación de Nernst-Brunner (ecuación 1) la relación entre la velocidad de disolución y el coeficiente de difusión de una molécula es directamente proporcional y, de acuerdo con la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación 2), al aumentar la temperatura el coeficiente de difusión se incrementa; por lo tanto, un aumento de temperatura conduce a un incremento en la velocidad de disolución[87].

$$\frac{dC}{dt} = \frac{DS}{Vh} * (C_s - C) \qquad (1)$$

Donde dC/dt corresponde a la velocidad de disolución de una droga, C_s la concentración de saturación, S el área superficial del sólido, C la concentración en el seno de solución, V el volumen de solución y h el espesor de la capa estanca. Para la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación 2, que se observa a continuación) D es el coeficiente de difusión, ºK la viscosidad, T la temperatura, r el radio de la partícula, R la constante de los gases y N el número de Avogadro[87].

$$D = \frac{RT}{6\pi\eta r N} \qquad (2)$$

2.5.1.1.2 Agitación

Según la teoría de Nernst y Brunner, la velocidad de agitación es inversamente proporcional al espesor de la capa líquida que rodea las partículas; es por ello que al aumentar la intensidad de la agitación se reduce el espesor del film, lo que favorece la difusión de las moléculas al seno de la solución. Por lo tanto, a mayor agitación mayor será la velocidad de disolución del fármaco, estableciéndose una relación proporcional entre estas variables[87].

2.5.1.1.3 Composición del medio de disolución

El pH es un parámetro fundamental por considerar en todos los productos de carácter iónico, ya que su solubilidad varía según sea el pH del medio, la velocidad de disolución aumenta al incrementar el pH para un ácido débil, mientras que en el caso de las bases débiles sucede lo contrario. Además, de acuerdo con la ecuación 2, el coeficiente de difusión de una molécula presenta un comportamiento inversamente proporcional a la viscosidad del medio; de esta manera, a mayor viscosidad del medio menor será su velocidad de disolución[87].

Otro factor a considerar es la presencia de sales en el medio de disolución, porque estas pueden aumentar o disminuir la velocidad de disolución del sólido, la adición de agentes tensoactivos en el medio de disolución contribuye a aumentar la velocidad de disolución de los sólidos al reducir la tensión superficial, ya que mejoran la humectación de las partículas, favoreciendo su contacto con el disolvente[87].

2.5.1.2 Factores relacionados con las propiedades fisicoquímicas del fármaco

2.5.1.2.1 Solubilidad

La solubilidad en medio acuoso es considerada una propiedad fisicoquímica de importancia para la determinación de las características de formulación y administración del fármaco de una forma de dosificación. La USP[88] la define como la capacidad que presenta un disolvente para disolver determinado soluto y se expresa en unidades de concentración, ya sea molaridad, molalidad, fracción molar, relación molar, peso/peso o peso/volumen.

La determinación de la solubilidad de las materias primas empleadas en la formulación de productos farmacéuticos permite comprender los posibles problemas de administración de fármacos por vía oral, y el control de calidad de estos. La solubilidad de los fármacos se encuentra influenciada por las propiedades fisicoquímicas que presenten (tales como área superficial, tamaño de partícula, forma de cristal) y las del medio de disolución (como pH, tensión superficial, polaridad, sales, tensoactivos y codisolventes añadidos). La solubilidad de los principios activos se establece de acuerdo con el sistema de clasificación biofarmacéutica[88].

2.5.1.2.2 Área superficial

A mayor tamaño de partícula mayor será su área superficial; de acuerdo con la ecuación de Nernst-Brunner (ecuación 1), la velocidad de disolución presenta una relación directamente proporcional al área superficial, ya que existirá mayor contacto entre el sólido y el medio de disolución, lo que resultará en un incremento de la velocidad de disolución[86].

2.5.1.3 Factores relacionados con el proceso de formulación

Los excipientes empleados en el proceso de formulación de un medicamento influyen en la velocidad de disolución de este. Para las formas de dosificación de liberación inmediata se emplean excipientes que mejoren las propiedades de liberación del fármaco o la solubilidad del principio activo; por ejemplo, los desintegrantes como el almidón facilitan la ruptura y disgregación en gránulos o partículas de una tableta, y en el caso de fármacos poco solubles; la adición de tensoactivos como el polisorbato mejoran la solubilidad del principio activo; estos promueven la humectación del fármaco mediante la formación de micelas y la reducción de la tensión superficial de las partículas hidrofóbicas del fármaco respecto al medio de disolución. Por otra parte, algunos excipientes pueden disminuir la velocidad de disolución del fármaco; por ejemplo, los lubricantes hidrofóbicos, como los estearatos, pueden reducir el grado de humectación del fármaco[86].

En las formulaciones de productos farmacéuticos con bioequivalencia in vitro, se debe mantener un control sobre las materias primas y los procesos empleados, que permitan asegurar que no influyan sobre la calidad y el rendimiento del producto, para lo cual se encuentra la guía SUPAC-IR, con el propósito de asegurar la igualdad entre el producto antes de su modificación y después de esta[33].

2.5.1.4 Factores relacionados con el proceso de fabricación

Los factores que se encuentran implicados en el proceso de fabricación de formas farmacéuticas sólidas pueden presentar un impacto respecto a sus características de disolución; por ejemplo, la granulación en húmedo mejora el grado de humectación de fármacos poco solubles, al incorporar propiedades hidrófilas en la superficie de los gránulos, aumentando así la velocidad de disolución del fármaco [86].

En el proceso de compresión de tabletas se puede presentar un incremento del área superficial, causado por un rompimiento de las partículas en otras más finas, mejorando la velocidad de disolución del medicamento. Sin embargo, también se puede presentar una reducción de esta causada por una mejor unión de las partículas del fármaco, inhibiendo así la penetración de solvente. Al realizar una alta compresión, se puede producir una capa sellante con mayor firmeza y más eficaz, reduciendo la humectación de la tableta[86]; por lo tanto, se debe mantener un control sobre pruebas, como la dureza y friabilidad.

2.5.2 Importancia de la disolución en la absorción por vía oral de fármacos

La dosificación por vía oral de medicamentos es considerada la vía de administración más común en la población. La importancia de la disolución en la absorción oral de formas farmacéuticas sólidas se reconoció hasta en el año 1957, cuando Nelson llevó a cabo su publicación tras una investigación sobre el hallazgo de una correlación en los niveles de sales de teofilina en sangre, tras su administración por vía oral y su tasa de disolución in vitro[86].

La absorción sistémica de un fármaco tras la administración de una forma farmacéutica sólida (comprimidos y cápsulas) se puede describir en cuatro pasos: el primero implica la administración del medicamento en su sitio de absorción; en el segundo paso tiene lugar la disolución, ya sea en el estómago o intestino delgado (los dos primeros pasos no son necesariamente secuenciales); en el tercer paso se presenta la permeación del fármaco disuelto a través de la membrana gastrointestinal; y por último, el fármaco absorbido pasa a través del hígado y llega a la circulación sistémica[86].

Esta descripción muestra que el vaciamiento gástrico, la disolución, la absorción por medio de la membrana intestinal y el metabolismo son considerados los procesos críticos en la absorción, tras la administración oral de una forma farmacéutica sólida. Cuando el proceso de disolución se lleva a cabo de manera lenta con respecto a los otros procesos (común en fármacos poco solubles), la disolución es el paso limitante en su velocidad de absorción, siendo así la velocidad de disolución

determinante con respecto a la velocidad global del proceso de absorción del fármaco, influyendo en su biodisponibilidad[86].

2.6 Sistema de Clasificación Biofarmacéutica

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB) es una herramienta que clasifica los principios activos según su grado de solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal, permitiendo conocer los factores limitantes que intervienen en el proceso de absorción oral y establecer cuándo un estudio de disolución in vitro es suficiente evidencia para demostrar la justificación de equivalencia terapéutica del fármaco. Este método contempla la permeabilidad intestinal, el grado de solubilidad acuosa junto con la velocidad de disolución del fármaco, como los aspectos determinantes con respecto a la biodisponibilidad que pueda presentar una forma farmacéutica sólida de liberación inmediata administrada por vía oral[89].

Al ser el SCB un marco científico para la clasificación de distintos principios activos, permite designarlos dentro de cuatro clases, siendo estas: clase I, que presenta la característica de mostrar una alta solubilidad y permeabilidad; clase II, donde se asignan las drogas que exhiben una baja solubilidad y alta permeabilidad; clase III para medicamentos que muestran una alta solubilidad y baja permeabilidad; y la clase IV para drogas con una baja solubilidad y permeabilidad[90]. Esta clasificación se puede observar en el cuadro 2.

Cuadro 2. Clasificación de los principios activos según el sistema de clasificación biofarmacéutico

Clase	Solubilidad	Permeabilidad
I	Alta	Alta
II	Baja	Alta
III	Alta	Baja
IV	Baja	Baja

Fuente: elaboración propia a partir de referencia[90].

De acuerdo con Baena et al.[90], un fármaco es considerado de alta solubilidad cuando esté en su mayor dosis (según recomendación de la OMS o disponible en el mercado en una forma farmacéutica sólida por vía oral) es soluble en 250mL o en menor volumen de medio acuoso dentro de un rango de pH de 1,2 a 7,5 de acuerdo con la FDA y de 1,2 a 6,8 según la OMS. Con respecto a la permeabilidad, se clasifica como un fármaco con una alta permeabilidad si la cantidad absorbida en humanos es superior al 85% de acuerdo con la OMS y en un 90% según la FDA.

Según el SCB, los medicamentos que presenten principios activos contemplados dentro de la lista de la clase I, caracterizados por mostrar una alta solubilidad y permeabilidad, no deberán presentar estudios de bioequivalencia in vivo, ya que para las formas farmacéuticas sólidas administradas por vía oral de liberación inmediata, cuando la disolución in vivo es rápida con respecto al vaciamiento gástrico y el medicamento presenta una alta permeabilidad, será poco probable que la velocidad y cantidad de fármaco absorbido dependan de la disolución; por lo tanto, se podrá demostrar equivalencia terapéutica con estudios in vitro (bioexención)[89].

Las correlaciones in vitro-in vivo son un modelo matemático que permite predecir la relación con respecto a una característica in vitro, que presenta una forma de dosificación y una

variable in vivo, donde la característica in vitro más empleada es la fracción disuelta en cierto periodo de tiempo y la fracción absorbida la variable in vivo. El cuadro 3 describe la correlación in vivo-in vitro esperada según la clasificación del SCB[90].

Cuadro 3. Correlación in vivo-in vitro esperada de medicamentos según el principio activo de acuerdo con el sistema de clasificación biofarmacéutico

Clase	Correlación in vivo-in vitro esperada
I	Se presenta correlación in vivo-in vitro si la velocidad de disolución es menor que la velocidad de vaciamiento gástrico. De lo contrario, la correlación es limitada o puede no existir.
II	Se espera correlación in vivo-in vitro si la velocidad de disolución in vitro es similar a la velocidad in vivo, exceptuando los casos en que la dosis sea muy elevada.
III	La absorción (permeabilidad) es el paso determinante y la correlación in vivo-in vitro, limitada o no, se presenta.
IV	La correlación in vivo-in vitro es limitada, o simplemente puede no existir.

Fuente: elaboración propia con base en la referencia[84].

2.7 Ensayos In vitro

2.7.1 Ensayo de Disolución

El ensayo de disolución es una técnica analítica de carácter farmacopeico, que permite determinar la velocidad de disolución de un producto farmacéutico, bajo determinadas condiciones[51], se realiza con la finalidad de verificar que el principio activo se disuelva al menos

lo mínimo permitido, según las especificaciones indicadas en la monografía individual de la farmacopea oficial[91].

La disolución de productos farmacéuticos sólidos se ha convertido en una de las pruebas de mayor importancia en el desarrollo y fabricación de estos. De acuerdo con Chow, et al.,[92] permite la evaluación in vitro del comportamiento del medicamento en distintas formulaciones orales, y presenta un efecto significativo en la biodisponibilidad y el rendimiento clínico que puede mostrar un medicamento, resultando útil en los procesos de desarrollo y estimación del rendimiento de nuevas formulaciones orales, al permitir examinar el proceso de liberación de fármacos de las formas de dosificación[86], además de permitir evaluar la estabilidad de las formulaciones, su desarrollo y cambios en su formulación[92].

Los procesos de formulación y fabricación de los medicamentos deben diseñarse y optimizarse de manera que permitan cumplir las características de disolución deseadas. La variabilidad entre las formulaciones y los procesos de fabricación impactarán sobre el rendimiento del medicamento, el cual puede manifestar una relación entre los atributos del producto con respecto al rendimiento clínico[93]; por lo tanto, la liberación de manera in vitro del principio activo de la forma de dosificación dependerá de las características propias de este, los excipientes utilizados y la tecnología empleada para su formulación.

Por su parte, EMA[94] indica que en el desarrollo de un medicamento se emplea la prueba de disolución como una herramienta que permite la identificación de los factores que pueden influir en la biodisponibilidad del fármaco, así que posterior a la determinación de su composición y fabricación se lleva a cabo dicha prueba, que permite controlar la calidad del producto farmacéutico; además, en ciertos casos se puede utilizar para renunciar a un estudio de bioequivalencia in vivo. Por ello, según dicha agencia, esta prueba puede presentar varios propósitos:

1. Prueba de calidad del medicamento:

    - La prueba de disolución permite ser una herramienta de control de calidad para la demostración de consistencia en la fabricación de distintos lotes.
    - Permite obtener información sobre los lotes de prueba que se utilizan en los estudios de biodisponibilidad/bioequivalencia y estudios clínicos, cruciales para el respaldo de las especificaciones de control de calidad.
    - Permite la obtención de información del medicamento de referencia usado en los estudios de biodisponibilidad/bioequivalencia y ensayos clínicos.

2. Para ciertos casos como sustituto de estudios de bioequivalencia in vivo:

    - Permite demostrar similitud entre distintas formulaciones de una sustancia activa y el medicamento de referencia (bioexenciones basadas en el sistema de clasificación biofarmacéutica).
    - Investigar consistencia de los lotes de prueba y referencia que se emplearán para el desarrollo de los estudios.

La FDA[33] establece que el tiempo de vaciamiento gástrico medio es de 15-20 minutos en ayuno; por tanto, un medicamento que experimente una disolución del 85% en 15 minutos utilizando HCl 0,1N va a presentar un comportamiento como solución; por consiguiente, no presentará problemas de biodisponibilidad, porque cuando la disolución es menor al vaciamiento gástrico se debe realizar un perfil de disolución empleando diversos puntos.

2.7.1.1 Aparatos para la prueba de disolución

La USP[95] establece cuatro aparatos distintos para realizar las pruebas de disolución; su uso depende del tipo de la forma farmacéutica y de la indicación de la monografía individual de cada medicamento. El aparato I corresponde a paletas, el II a canastas, el III a cilindro alternativo, y por

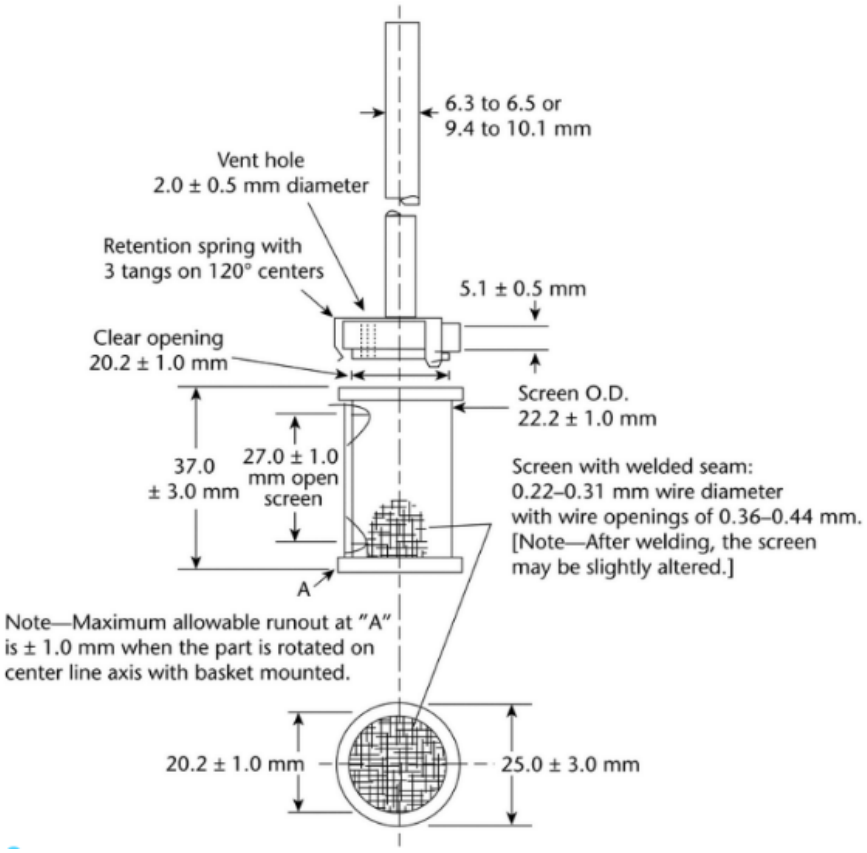
último el aparato IV es denominado celda de flujo continuo. Sin embargo, para el desarrollo de dicha investigación se considerarán solamente el aparato I y II de la USP.

2.7.1.1.1 Aparato I (Aparato de canasta)

El aparato I de canastas consta de un recipiente, que puede encontrarse recubierto y hecho de vidrio u algún otro material inerte y transparente, un eje de transmisión de metal, un motor y una canasta con forma cilíndrica. El recipiente se debe sumergir en un baño de agua que presenta un movimiento suave y constante a una temperatura de 37± 0.5 °C, controlado por medio de un dispositivo de calentamiento. Ninguna de las partes que conforman el equipo, incluyendo el entorno, debe aportar movimiento, agitación o alguna vibración significativa, externa a los movimientos propios del elemento de agitación[95].

Es preferible que las cubetas permitan la observación de la muestra (útil para controlar visualmente la disgregación de la forma farmacéutica) y el elemento de agitación durante la prueba; se usa un dispositivo que permite seleccionar y mantener la velocidad de rotación del eje según la especificación de la monografía individual dentro de un ± 4%, Los componentes del eje y de la cesta del elemento de agitación se encuentran diseñados de acero inoxidable 316 u otro material inerte. Para el desarrollo de cada prueba resulta imprescindible colocar cada una de las unidades de dosificación en la canasta seca, y la distancia entre el fondo del recipiente y el de la cesta deben encontrarse en 25 ± 2 mm durante el ensayo[95].

Figura 7. Aparato 1 (canasta)

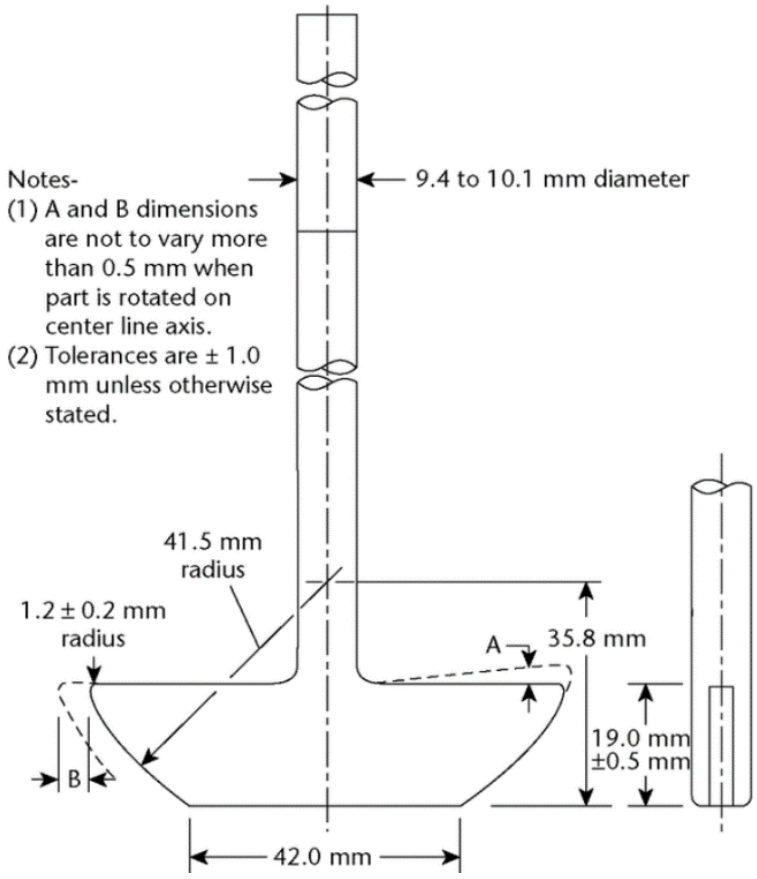


Fuente: USP[95].

2.7.1.1.2 Aparato II (Aparato de paleta)

Se debe emplear el conjunto del aparato I, excepto que emplea como elemento de agitación una paleta formada por una cuchilla y un eje, el cual debe girar de manera suave sin algún bamboleo que pueda interferir en los resultados. La paleta debe presentar una distancia de 25 ± 2 mm entre el fondo interior del recipiente y el fondo de la pala durante la prueba. La pala y el eje de la paleta pueden presentar un revestimiento adecuado para que estos sean inertes. La unidad de dosificación debe colocarse en el fondo del recipiente antes de que comience la rotación de la cuchilla; se pueden emplear piezas de material no reactivo en caso de que la unidad de dosificación pueda flotar[95].

Figura 8. Aparato 2 (paleta)



Fuente: USP[95].

2.7.1.2 Perfil de disolución comparativo

De acuerdo con el MINSA, el diseño de los perfiles de disolución comparativos debe permitir evaluar el comportamiento in vitro de productos equivalentes farmacéuticos para discriminar diferencias entre los dos productos ensayados. El medicamento a comparar debe evaluarse contra el producto farmacéutico considerado de referencia por parte de MINSA, y deben realizarse 12 unidades del mismo lote para los dos productos a comparar en cada medio de disolución. Para su desarrollo deben considerarse una serie de variables (independientes del fármaco), ya que el pH, la temperatura, el volumen, la composición del medio de disolución y su agitación afectan el comportamiento in vitro de los medicamentos; por lo tanto, deben controlarse de manera que correspondan a las condiciones fisiológicas[2].

Respecto a los perfiles de disolución comparativos, la FDA[33] establece que la implementación de ellos permite determinar la igualdad de productos ante cambios en cuanto a su manufactura, estipulados en la guía SUPAC IR. Además, estos resultan útiles al permitir eximir de requisitos de bioequivalencia de un producto al apoyar las exenciones.

2.7.1.2.1 Condiciones experimentales para el desarrollo de estudios de perfiles de disolución in vitro

Los aparatos empleados para el desarrollo de estudios de perfiles comparativos deben encontrarse debidamente calificados y calibrados; estos deben presentar sus características y especificaciones estandarizadas, y se deben emplear en el desarrollo de metodologías analíticas validadas. La disolución in vitro debe realizarse a tres diferentes valores de pHs; estos deben ser similares a los del jugo gástrico e intestinal y uno intermedio, y para esto se debe emplear una solución de pH 1.2 para fluido gástrico simulado sin enzimas, una solución amortiguadora de acetato a pH 4.5 y otro de pH 6.8 para fluido intestinal simulado sin enzimas[33], a menos que se pueda justificar la utilización de otros medios de disolución[94].

En el caso de principios activos poco solubles o insolubles en agua, se podrá hacer uso de tensoactivos como el lauril sulfato de sodio, y su utilización debe justificar ampliamente[90]. Si el principio activo no es soluble en los medios de disolución descritos anteriormente, se permitirá la utilización del medio de disolución oficial en la USP o el recomendado por la FDA; para esto la prueba debe evaluarse en al menos tres lotes de fabricación diferentes, y se justificará su uso[2].

Cuando un principio activo, según el sistema de clasificación biofarmacéutico, es considerado altamente soluble, no deberían presentarse problemas de biodisponibilidad, siempre que se disuelva de manera adecuada en el rango de pH fisiológico y los excipientes no afecten su biodisponibilidad. En caso de que el fármaco se disuelva más del 85% en 15 minutos, los perfiles

de disolución se pueden considerar similares sin llevar a cabo una evaluación matemática adicional[94].

El equipo a utilizar para cápsulas y productos con tendencia a flotar debe ser el de las canastas, el que corresponde al aparato I de la USP, mientras que para el caso de las tabletas el aparato 2 de la USP (paletas) es el indicado, esto a menos de que se acumulen partículas en el fondo del vaso, debido a la manera en que se desintegren; para este caso se podrán emplear canastas en la prueba[88]. La velocidad de agitación deberá ser de 100rpm en caso de utilizar el aparato I y 75rpm si se usa el equipo II; la temperatura del medio de disolución debe encontrarse en 37 ºC ± 0.5 ºC y el volumen debe ser de 900 ml, a excepción de que se justifique la utilización de un volumen diferente, el cual no debe ser menor a 500mL[2].

Según EMA[94], los tiempos de muestreo de los perfiles de disolución deben realizarse en intervalos que permitan obtener datos significativos, considerando tomarlos al menos cada 15 minutos para formas farmacéuticas de liberación inmediata. Es recomendable un muestreo con mayor frecuencia en el periodo de mayor cambio en el perfil de disolución (cuando se observe un mayor cambio en el porcentaje de principio activo disuelto). Para productos que se disuelven de manera rápida, donde la disolución se completa en 30 minutos, se debe hacer un muestreo con intervalos de 5 o 10 minutos.

De acuerdo con el MINSA[2], para las formas de dosificación de liberación inmediata se recomienda realizar tiempos de muestreo a los 10, 15, 20, 30, 45 y 60 minutos, y los tiempos de muestreo deben ser exactamente los mismos, tanto para el medicamento de prueba como para el de referencia. Los cálculos del perfil de disolución comparativo solo deben considerar una muestra más después de que ambos medicamentos se disuelvan en un 85%, incluyendo el primer tiempo de muestreo en los cálculos. Estas condiciones experimentales se resumen en el cuadro 4.

Cuadro 4. Condiciones experimentales para el desarrollo de perfiles de disolución comparativos de formas farmacéuticas de liberación inmediata

Condiciones	Aparato	
	Aparato I (canastas)	**Aparato II (paletas)**
Forma farmacéutica	Cápsulas (tendencia a flotar)	Tabletas
Velocidad de agitación	100rpm	75rpm
Temperatura	37 ºC ± 0.5 ºC	
Volumen del medio	900mL	
Tiempos de muestreo	10, 15, 20, 30, 45 y 60 minutos	
Medio de disolución	Fluido gástrico pH 1.2 Solución amortiguadora de acetato pH 4.5 Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8	

Fuente: elaboración propia a partir de las referencias[2, 94,33].

2.8 Método analítico

Un método analítico corresponde al conjunto ordenado de procedimientos u operaciones de trabajo que permiten generar una respuesta a un requerimiento analítico específico; el mismo se precisa según las sustancias concretas que permita determinar la matriz y la técnica analítica empleada para obtener los resultados[96, 97]. Según el Ministerio de Salud[1], ese método se define como la adaptación de manera específica de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionado.

El desarrollo de un método analítico puede implicar la adaptación de uno existente, realizando los cambios necesarios que permitan adecuarlo a una nueva aplicación cuando la matriz

y el analito a determinar son iguales o presentan propiedades semejantes, ya que probablemente los principios de separación, identificación y cuantificación sean similares. En caso de que la adaptación de una metodología existente no sea adecuada para el desarrollo de una metodología, será necesario elaborarla a partir de la experiencia, conocimiento e investigación[97].

Posterior a su desarrollo, deberá determinarse si el método analítico cumple con las características de desempeño para su implementación en el laboratorio[98]. Sus especificaciones son relativas al comportamiento del método, las cuales incluyen información sobre precisión, intervalo de trabajo, límite de detección, posibles interferencias y su veracidad[93]. Dentro de la industria farmacéutica deben emplearse métodos analíticos validados, lo que permite obtener resultados de manera objetiva con un alto grado de confianza[97].

2.9 Validación de métodos analíticos

De acuerdo con Soledad Rodríguez[99], la validación de un método analítico corresponde al proceso para establecer, de manera experimental y documental, que el mismo presenta las características de desempeño adecuadas para el cumplimiento de los requisitos de distintos parámetros que se requieren para el fin propuesto; esta se establece mediante la realización de estudios sistemáticos dentro del laboratorio, según las necesidades de la prueba.

Los parámetros de calidad corresponden a los criterios cuantitativos empleados para determinar si una metodología es apta o no para resolver un problema analítico, los cuales se emplean en la validación de métodos analíticos (para demostrar la validez de estos en la resolución de un determinado problema analítico) y permiten la materialización o expresión numérica de características de calidad, tales como; precisión, exactitud, sensibilidad, selectividad, entre otros[100].

Según el Reglamento técnico centroamericano de validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos[24], todos los métodos analíticos tanto oficiales como no oficiales deben validarse; los primeros únicamente deben demostrar la linealidad y precisión del sistema, y en el caso de los métodos analíticos no oficiales deberán comprobar su exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad e intervalo según sea su finalidad.

2.9.1 Características para la validación de métodos analíticos

De acuerdo con el MINSA[24], los procedimientos analíticos físico-químicos y microbiológicos deben encontrase debidamente validados; dicho proceso responde al tipo de prueba a desarrollar. Los parámetros de desempeño de los procedimientos físico-químicos y potencia microbiológica se clasifican en cuatro categorías, en la primera se designan aquellos métodos analíticos que tienen la finalidad de cuantificar algún componente del producto farmacéutico, como la determinación del contenido de principio activo.

En la categoría II se encuentran las pruebas empleadas en la determinación del contenido de impurezas o los límites para su control. Esas pruebas pueden ser cuantitativas o cualitativas, para evaluar si la impureza se encuentra presente en la muestra o en los límites superiores o inferiores; ambas pretenden determinar las características de pureza de una muestra, pero los parámetros para la validación de una prueba cualitativa o cuantitativa son distintos[24].

La categoría III contempla las pruebas físico-químicas de desempeño del medicamento; en esta categoría se encuentra la prueba de disolución, sus características a validar serán distintas a otras pruebas, aunque las pueden incluir. En la categoría IV se encuentran las pruebas de identificación, que se llevan a cabo con la finalidad de asegurar la identidad del analito en la muestra, y para esto se compara una propiedad de una muestra contra un estándar de referencia; por ejemplo, el comportamiento cromatográfico, los espectros, la reactividad química y las pruebas microcristalinas[24]. El cuadro 5 describe los parámetros de desempeño y las categorías establecidas por el MINSA[24].

Cuadro 5. Parámetros de desempeño para procedimientos analíticos físico-químicos

Parámetro	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
Exactitud	Sí	Sí	*	*	No
Precisión	Sí	Sí	No	Sí	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	*	Sí
Límite de detección	No	No	Sí	*	No
Límite de cuantificación	No	Sí	No	*	No
Linealidad	Sí	Sí	No	*	No
Intervalo	Sí	Sí	*	*	No

Fuente: MINSA[24].

*Puede requerirse dependiendo de la naturaleza del ensayo.

2.9.2 Parámetros de desempeño para validación de procedimientos analíticos

2.9.2.1 Exactitud

Según Soledad[99], la exactitud es la proximidad de los resultados obtenidos con respecto al valor real, se expresa como el porcentaje de recuperación a partir de una valoración según la cantidad de analito presente en la muestra. De acuerdo con el Ministerio de Salud[1], expresa la cercanía entre el valor verdadero (considerado como material de referencia) y el valor promedio obtenido de manera experimental tras aplicar el procedimiento analítico un cierto número de veces;

el mismo puede determinarse de distintas maneras y se pueden emplear en todos los tipos de análisis.

2.9.2.1.1 Comparación con un método oficial, validado o estandarizado

Consiste en realizar una verificación del método, para esta la muestra se debe analizar empleando el método que se debe validar y un segundo método que se encuentre bien caracterizado y con una exactitud definida; para el mismo se tienen que analizar por ambos métodos seis muestras por replicado a la concentración de trabajo, y se evalúa mediante un análisis de varianza del porcentaje recuperado o del error relativo en porcentaje, para determinar si existe o no diferencia significativa entre la comparación de los métodos[1].

2.9.2.1.2 Adición estándar

Se puede realizar utilizando placebo y enriqueciéndolo con estándar o con muestra en caso de no contar con placebo; para este último se determina por replicado el contenido promedio del analito en la muestra con el método analítico que se va a validar. Posteriormente se enriquecen las muestras, las que se preparan manteniendo constante la cantidad de muestra tomada y adicionando cantidades relativas de estándar; para ambas técnicas se deben preparar muestras a tres niveles de concentración distintas: se recomienda el 80, 100 y 120% de la concentración de trabajo por triplicado[1].

Cuadro 6. Criterios de aceptación para la exactitud.

Concentración del analito	Criterio de aceptación
Ensayo	
	1. Placebo enriquecido • Porcentaje de recuperación esperado debe encontrarse entre el 98%-102%. Lo cual es equivalente a ± 2 % de error relativo. • Al graficar la cantidad recuperada contra la cantidad adicionada, debe obtenerse un coeficiente de correlación de 1.00, una pendiente de 1.00 y el intercepto debe ser 0.00. Lo cual puede ser corroborado estadísticamente. **2. Muestra enriquecida** • Los porcentajes de recuperación obtenidos, deben encontrarse dentro del 100% ± 4S, donde S es la mayor desviación estándar obtenida en la determinación de la precisión del método o del sistema. • Al graficar la respuesta del ensayo (cantidad total encontrada), contra la cantidad de analito adicionada, la pendiente debe ser mayor o igual a 0.95 y el intercepto debe ser igual a la concentración inicial.

Fuente: MINSA[1].

2.9.2.1.3 Comparación de las curvas de regresión lineal de estándares con curvas de regresión lineal de placebos enriquecidos (métodos de curvas de respuesta relativa)

Corresponde a una modificación respecto al método de adición estándar al placebo, donde se deben preparar soluciones y estándares a tres niveles de concentración de placebo enriquecido distintas (80, 100 y 120%). Se evalúa la regresión lineal de ambos grupos y se comparan las pendientes e interceptos; su criterio de aceptación indica que no hay efectos de interacción entre matriz y analito cuando no existe diferencia entre los interceptos de los estándares y el placebo enriquecido, y no se encuentra error sistemático proporcional cuando la razón entre las pendientes de las curvas de respuesta para el placebo y estándares es estadísticamente igual a uno[1].

2.9.2.1.4 Comparación de los resultados obtenidos de un estándar o material de referencia certificado

El material de referencia puede ser preparado dentro del laboratorio o adquirirse en el mercado por medio de un suplidor. Se debe comparar el resultado obtenido en el análisis con el método analítico a validar con respecto al valor declarado; este se analiza por replicado y debe obtener un porcentaje de recuperación entre 98-102% o un 2% de error relativo[1].

2.9.2.2 Precisión

Se define como el grado de concordancia entre los resultados obtenidos tras la aplicación de manera repetida de un método analítico a una muestra homogénea. Este parámetro mide el error aleatorio que se presenta[95] con respecto a los criterios de aceptación; para el caso de la repetibilidad y precisión intermedia la desviación estándar relativa debe ser igual o menor al 2%, permitiendo en algunos casos ser igual o menor del 3% y para la reproducibilidad puede ser dos o tres veces la repetibilidad[1].

2.9.2.2.1 Repetibilidad

Evalúa el grado de concordancia entre los resultados tras la aplicación de un método a la misma muestra en repetidas ocasiones por un único analista en un breve tiempo[95] .Se debe evaluar empleando nueve determinaciones que cubran el rango de trabajo; para esto se preparan muestras por triplicado a tres niveles de concentración diferentes, que pueden corresponder al 80%, 100% y 120% de la concentración normal de trabajo. Otra manera sería la determinación de seis muestras al 100% de la concentración de trabajo[21], la cual se puede expresar como la desviación estándar o el coeficiente de variación obtenido tras una serie de mediciones[101].

2.9.2.2.2 Precisión Intermedia

Debe establecerse según las circunstancias en que se pretenda utilizar la metodología analítica; para ello se determinan los efectos de los eventos que influyen de manera aleatoria sobre el procedimiento analítico. Normalmente se suele estudiar la manera en que influyen los equipos, analistas, su análisis en distintos días con la misma muestra homogénea, entre otros[21]; o sea, evalúa las variaciones que se puedan presentar en el laboratorio.

2.9.2.2.3 Reproducibilidad

Evalúa el grado de concordancia en los resultados obtenidos tras aplicar el método a la misma muestra en repetidas ocasiones por diferentes analistas en distintos laboratorios y en diferentes días[100]; este se debe considerar en caso de estandarización de un procedimiento analítico, situación que se puede presentar en caso de inclusión de un procedimiento farmacopeico[21].

2.9.2.3 Especificidad

De acuerdo con ICH[21], este parámetro corresponde a la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de componentes como impurezas, productos de degradación y compuestos propios de la matriz; este es imprescindible para la validación de métodos analíticos cuantificables al permitir asegurar la identidad del analíto; por lo tanto, proporciona un resultado exacto sobre el contenido de un principio activo o excipiente en una muestra.

La especificidad puede realizarse de distintas maneras según sea el tipo de análisis a desarrollar; para los casos donde la matriz de la muestra es variable según su composición y fuente, se debe establecer la especificidad de manera independiente. De acuerdo con el MINSA[1], los análisis que corresponden a potencia, disolución y uniformidad de contenido pueden demostrar la especificidad de la siguiente manera:

2.9.2.3.1 Comparación del comportamiento de la matriz o impurezas con respecto al comportamiento del estándar

Se debe realizar una comparación con respecto a la medición obtenida de una solución estándar del analito y una solución muestra a la concentración esperada del ensayo, tras enriquecerlas con una cantidad equivalente de matriz, donde la solución muestra no debe presentar ninguna señal que interfiera con la señal que se obtuvo en el estándar, en el punto donde se lleva a cabo la medición del analito.

2.9.2.3.2 Comparación del comportamiento de muestra enriquecida con matriz con respecto al comportamiento de estándar enriquecido con matriz

Se debe realizar una solución estándar del analito y una solución muestra a la concentración esperada del método de análisis, y ambas se enriquecen con una cantidad equivalente de matriz. Se hace una comparación de ambas soluciones enriquecidas; para estas no se debe presentar ningún tipo de señal en la solución muestra, que interfiera con la señal obtenida del estándar en el punto donde se lleva a cabo la medición del analito.

2.9.2.3.3 Comparación del comportamiento de muestras enriquecidas con analito con respecto al comportamiento de estándar enriquecido con analito

Se realiza una solución estándar del analito y una solución muestra a la concentración de trabajo esperada; ambas se enriquecen con una cantidad equivalente de analito. Las mediciones de estas soluciones enriquecidas deben ser lo más cercanas posibles en el punto en el que se lleva a cabo la medición del analito; esto indica que la matriz no aporta alguna señal que interfiera con la medición. Algunos autores recomiendan hacer la comparación del patrón enriquecido y las muestras a cinco niveles diferentes de concentración del analito, permitiendo determinar el grado de interferencia según la concentración del analito; estos datos se pueden obtener de la linealidad del método utilizando la adición estándar.

2.9.2.3.4 Procedimientos adicionales para verificar la especificidad

En caso de contar con un detector de arreglo de diodos o con espectrometría de masas, se puede realizar un ensayo de pureza de pico; también se puede llevar a cabo un reanálisis del pico, esto cuando el analito de interés es recogido y reanalizado bajo distintas condiciones cromatográficas, o con métodos que sean sensitivos a la estructura del analito, y por comparación de resultados cuando la muestra es analizada por dos o más métodos de separación o detección.

2.9.2.4 Linealidad e intervalo

La linealidad es la capacidad de un método para proporcionar respuestas relacionadas de manera lineal con la concentración de analito en un determinado intervalo o rango de concentraciones; en otras palabras, de obtener resultados directamente proporcionales con la concentración del analito en la muestra[100] el intervalo varía según el tipo de determinación a realizar; por lo tanto, el MINSA[1] proporciona una sugerencia del intervalo de trabajo que se puede abarcar en cada prueba (ver cuadro 7):

Cuadro 7. Intervalo de trabajo para la determinación de la linealidad según la prueba

Prueba	Intervalo de trabajo
Ensayo	80-120% de la concentración de trabajo.
Impurezas	50-120% de la especificación.
Uniformidad de contenido	70-130% de la concentración de trabajo o alguna modificación del mismo, dependiendo de la naturaleza de la forma dosificada.
Disolución	± 20% sobre la especificación, en el caso de un producto de liberación controlada donde el criterio de aceptación cubra un 30% posterior a una hora y el 90% posterior a las 24 horas, se debe validar como mínimo el rango desde un 10% hasta un 110%.

Fuente: MINSA y USP [1, 101].

Con respecto al rango, la USP[101] indica que es el intervalo comprendido entre los niveles superior e inferior del analito, donde el procedimiento analítico demuestra que es capaz de llevar a cabo la determinación de la precisión, la linealidad y la exactitud de manera adecuada; se expresa

bajo las mismas unidades que se obtuvieron de los resultados de la prueba, los cuales pueden ser en porcentaje, partes por millón, entre otros.

2.9.2.4.1 Linealidad e intervalo del sistema

Se deben preparar, de manera independiente, soluciones del estándar por lo menos a cinco niveles de concentración diferentes dentro del intervalo que muestra el cuadro 7, esto según sea el tipo de análisis a llevar a cabo. Las soluciones se deben preparar por triplicado para la evaluación estadística de la regresión lineal del sistema, para esto se grafican los datos obtenidos versus la concentración del analito, verificando datos atípicos mediante mediciones adicionales. Se debe realizar un análisis de varianza de la regresión lineal, para calcular el coeficiente de regresión de al menos tres curvas independientes y los residuos (valor real de la concentración-cálculo por la ecuación de regresión para cada valor de X)[1].

2.9.2.4.2 Linealidad e intervalo del método

De acuerdo con el MINSA[1], se deben preparar soluciones de muestra o placebo enriquecido a cinco niveles de concentraciones distintas dentro del intervalo establecido en el cuadro 7, según sea el tipo de análisis a desarrollar. Ellas deben prepararse por triplicado para la evaluación estadística de la regresión lineal del método; con los datos obtenidos se grafica la respuesta de la medición versus la concentración del analito, verificando datos atípicos mediante mediciones adicionales. Se lleva a cabo un análisis de varianza de la regresión lineal, para calcular el coeficiente de regresión con al menos tres curvas independientes y los residuos (valor real de la concentración-cálculo por la ecuación de regresión para cada valor de X). Se determina que existe linealidad si se cumplen los siguientes criterios:

- Homocedasticidad (varianza constante en todas las concentraciones de trabajo analizadas).

- El análisis de varianza de regresión lineal debe demostrar el paso del intercepto por cero, y una desviación que no sea significativa respecto a la regresión.
- Distribución de manera aleatoria de los residuos (tendencias sistemáticas indican que no hay linealidad).
- El coeficiente de correlación de la correlación se debe encontrar entre 0.98 y 1.00, y el mismo al cuadrado debe ser superior a 0.995.

2.9.3 Documentación para la validación analítica

Para llevar a cabo una validación, se requiere de un método que ha sido probado y ajustado de acuerdo con las necesidades de la prueba a desarrollar. La validación analítica debe demostrar la obtención de resultados adecuados según sean sus exigencias, tanto para el método de análisis como para el sistema analítico, las cuales deben encontrarse debidamente documentadas; por lo tanto, en primera instancia se debe desarrollar un protocolo de validación para la posterior realización de la validación y la evaluación de los resultados obtenidos, y con esto hacer el informe de validación[102].

2.9.3.1 Protocolo de validación

El primer paso para validar un método analítico es elaborar un protocolo, el cual corresponde a un documento que incluye las instrucciones para la evaluación de las características de desempeño del método; si este cumple con los criterios de aceptación establecidos en dicho protocolo, el mismo se considera validado[103]. De acuerdo con la OMS[104] el protocolo debe incluir como mínimo título, objetivo, alcance, responsabilidades, recursos (materiales y métodos), diseño experimental, criterios de aceptación, un procedimiento para manejar las desviaciones; la documentación que se va a proporcionar junto con los resultados y formularios del informe en caso necesario, descripción de las muestras (materias primas, productos intermedios y terminados), referencias; además ese protocolo debe encontrarse debidamente fechado y autorizado.

2.9.3.2 Informe del estudio de validación

Para la revisión de la validación del método analítico, por parte de la Autoridad Reguladora, debe presentarse un informe del estudio de validación, que debe contener los resultados de dicha evaluación. De manera específica, el mismo debe contar con una descripción detallada del procedimiento analítico y de los parámetros de desempeño evaluados, acordes con las categorías de la prueba, la evaluación y los cálculos estadísticos para la verificación de los parámetros de desempeño, así como un resumen de los resultados instrumentales (áreas y absorbancias) y de la validación[105].

Por último, deben adjuntarse las conclusiones, las cuales deben entregarse en español o acompañadas de su respectiva traducción, al igual que para los resultados. La documentación que se presente podrá ser rechazada si se detectan incongruencias técnicas o científicas, además de alguna falla en el diseño experimental o en la elaboración de la validación, así como un soporte estadístico inadecuado de las conclusiones[105].

2.10 Herramientas estadísticas empleadas en la evaluación de la validación

El empleo del modelo de regresión lineal para el análisis de datos demanda el uso objetivo de instrumentación, que permita verificar e interpretar su significancia estadística dentro de cierto intervalo de confianza. Este modelo se encuentra compuesto por la pendiente, el intercepto y las variables (¨x¨ y ¨y¨), la primera (pendiente) indica la sensibilidad que presenta un método; por lo tanto, al aumentar su valor también aumenta la sensibilidad y menor será el coeficiente de variación, lo que quiere decir que mayor será la linealidad del método. Con respecto al intercepto, se asocia con las interferencias o errores sistemáticos presentes en el método, el cual debe incluir el 0 para el cumplimiento de proporcionalidad[106].

Cuadro 8. Herramientas estadísticas para el análisis de resultados

Herramienta	Descripción
Coeficiente de correlación (r)	Permite determinar el grado de asociación entre dos variables; cuando esta se acerca a 1 indica que a medida que aumenta el valor de la variable ¨x¨ lo hace la variable ¨y¨[107].
Coeficiente de determinación (r^2)	Es una medida cuantitativa que indica la bondad de ajuste; permite conocer el grado de asociación entre las variables ¨x¨ y ¨y¨[107, 108].
Desviación estándar	Corresponde a la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de las deviaciones en relación con la media, dividida por los grados de libertad[109].
Coeficiente de variación	Relación entre la desviación estándar y la media aritmética, que se emplea para comparar la dispersión de un conjunto de datos[109].
Homocedasticidad	Característica de un modelo de regresión lineal, donde la variabilidad del error es constante; para su determinación se emplean los gráficos de residuos. Los residuos corresponden a la diferencia entre el valor observado y el predicho[107].
Prueba F (Fisher)	Para el abordaje de esta prueba se debe elaborar un modelo de regresión, el cual consiste en plantear la siguiente hipótesis: – H_0: indica que no existe correlación entre las variables (la variable independiente no explica la variación de ¨y¨). – H_a: indica que la variable independiente explica la variabilidad de ¨y¨. Para la evaluación de la hipótesis se contrasta el valor del $F_{crítico}$ obtenido contra 0.05, para una confianza del 95%, donde se rechaza la hipótesis nula cuando el F es menor o igual a 0.05, lo que indicaría que la variable independiente permite explicar la variabilidad de ¨y¨[107].

Prueba t-Student	Permite comparar los datos de dos variables y determinar si las diferencias son estadísticamente significativas, para el cual se compara el valor de t (obtenido de manera experimental contra el valor obtenido de la t-student (bilateral) para cierto nivel de confianza (suele emplearse el 95% de confianza para un α de 0.05)[17,110]. En caso de obtener un $t_{experimental}$ con un valor inferior al $t_{tabulado}$ para el intercepto se determina que el intercepto no es estadísticamente diferente de 0, en el caso de la pendiente al ser mayor el $t_{experimental}$ respecto al $t_{tabulado}$, se determina que es estadísticamente diferente de 0 [17, 110].

Fuente: elaboración propia.

2.11 Cromatografía Líquida de Alta Resolución

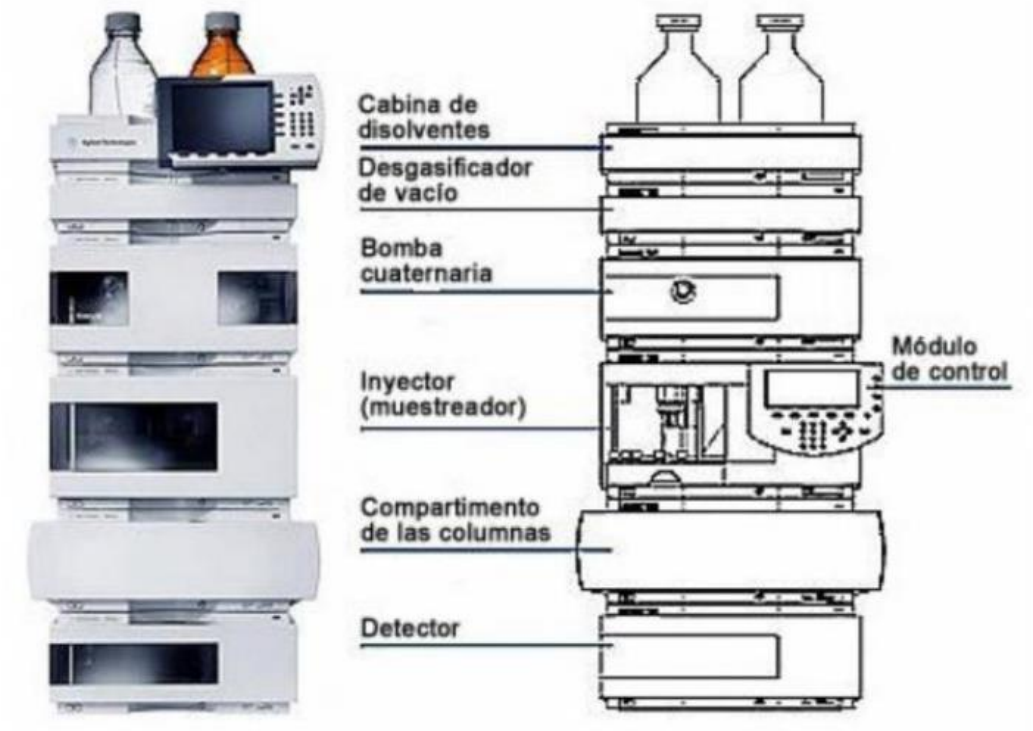
La cromatografía es una técnica analítica de separación de múltiples etapas, donde los componentes que constituyen una muestra se distribuyen en dos fases, siendo estas una fase estacionaria y una fase móvil; la primera se encuentra formada por un sólido o un líquido soportado sobre un sólido o gel, la cual puede empaquetarse en una columna, distribuirse como película, esparcirse como una capa u otras técnicas; mientras que la fase móvil se podría encontrar de forma líquida, gaseosa o como un fluido súper crítico. La separación por cromatografía se puede realizar por medio de diferencias entre las propiedades fisicoquímicas que presentan las moléculas como su masa, volumen y tamaño, y también se puede llevar a cabo por medio de intercambio iónico, distribución de masa u adsorción[111].

De acuerdo con la USP[112], la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) es una técnica analítica que permite la separación y análisis de los componentes químicos de una mezcla, por medio del grado de afinidad que presenten ante las dos fases, de acuerdo con las necesidades del

método analítico. Según Suarez et al.[111], la fase móvil se encarga de llevar la muestra a través de la fase estacionaria, por lo que los componentes que presenten una mayor afinidad hacia la fase estacionaria se desplazarán con menor velocidad, en comparación con aquellos que tengan menor afinidad. Un cromatógrafo líquido de alta resolución se encuentra compuesto por las siguientes partes (ver figura 9):

- Una cabina con los reservorios para los disolventes
- Un desgasificador
- Bomba cuaternaria
- Inyector
- Compartimiento para las columnas
- Detector.

Figura 9. Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC)



Fuente: Zumbado Fernández[113].

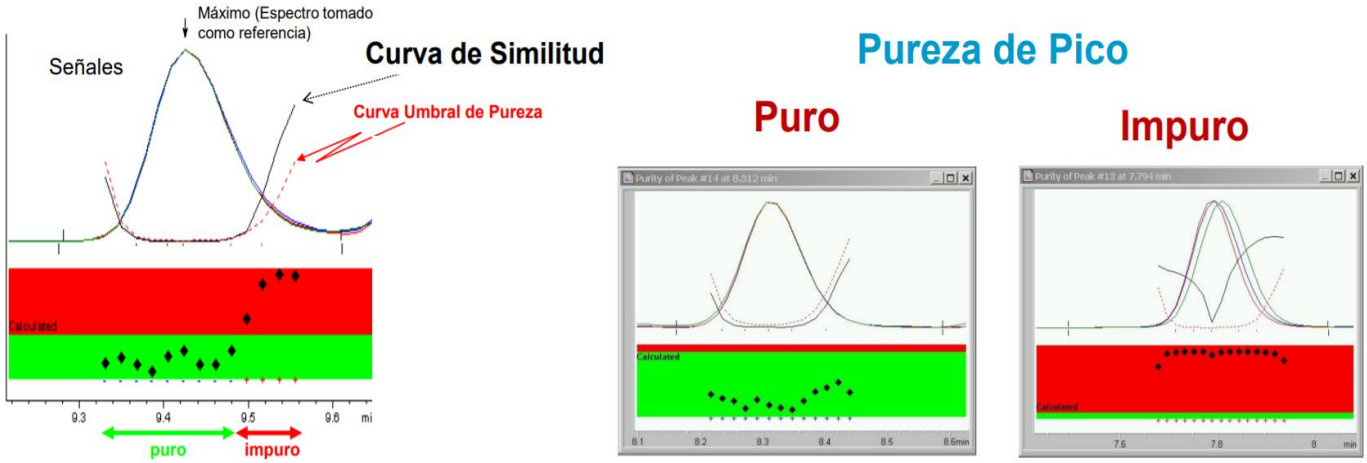
Los reservorios contienen la fase móvil a utilizar en el análisis, los cuales son un disolvente o una mezcla de disolventes USP[113], que se encuentran situados en la parte superior del sistema cromatográfico, normalmente en reservorios de un litro y llegan a la bomba a través de tuberías con la capacidad de resistir los distintos disolventes. Estas tuberías presentan, en el extremo que se encuentra en contacto con el reservorio, filtros para retener partículas que pueden encontrarse en la fase móvil, y que podrían eventualmente generar daños en el equipo. La fase móvil se puede encontrar de manera isocrática, donde los componentes van a encontrarse en la misma proporción; en otras palabras, su composición se mantiene de manera inalterada o mediante un gradiente de elución, que resulta útil cuando el método requiere la modificación de las proporciones de los solventes que constituyen la fase móvil[113].

La fase móvil es impulsada a través de una bomba por todo el sistema cromatográfico, la que debe trabajar de manera continua sin ninguna interrupción durante todo el análisis. Por medio del sistema de tuberías la fase móvil llega al inyector, donde entra en contacto con la columna cromatográfica, la cual es la parte del sistema donde ocurre la separación de los compuestos que conforman la muestra (esta presenta diversas características como su longitud, diámetro interno y composición, que juegan un rol importante en la separación de compuestos). Actualmente, este módulo cuenta con automuestreadores encargados de realizar la inyección de las muestras preparadas de manera automática, los cuales se programan, mediante el software, según sea la cantidad de muestras, el volumen de inyección y el intervalo de tiempo[113].

A salir de la columna cromatográfica, la fase móvil, junto con los componentes de la muestra, pasan por el detector, el cual genera una serie de señales a partir de los analitos en función de la concentración, masa y de su velocidad de elución por medio de la fase móvil. Existen distintos tipos de detectores que se pueden emplear en un HPLC, y para fines de la presente tesis, solo se considerará el detector UV-V con arreglo de diodos, el cual permite obtener el espectro de absorción de cada componente eluido, por medio de un barrido en un amplio intervalo de longitudes de onda[113].

De acuerdo con Agilent Technologies[114], el HPLC serie 1200 con arreglo de diodos permite identificar picos puros o impuros, mediante la presencia de puntos por debajo del umbral de pureza, lo cual se puede observar en las secciones roja (picos impuros) y verde (picos puros), y para su mejor comprensión se adjunta la figura 10.

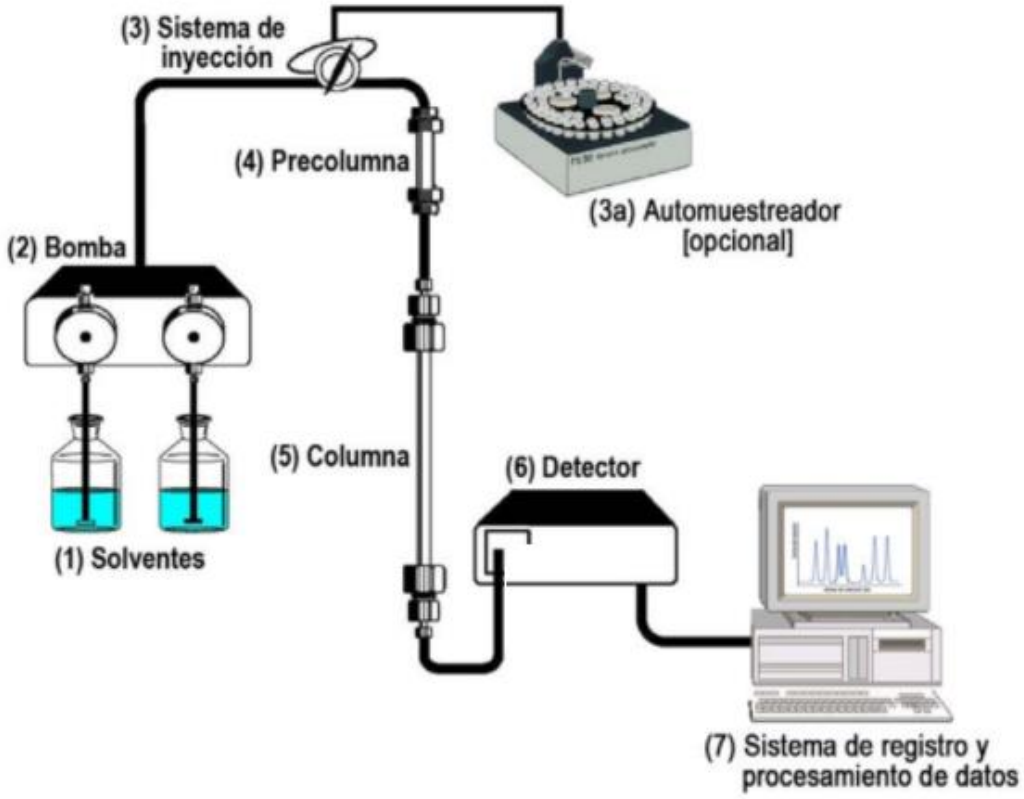
Figura 10. Pureza de picos en un detector con arreglo de diodos marca Agilent



Fuente: Masana Isidre[114].

El registro de la señal emitida por el detector permite la obtención de un cromatográma[108], el cual constituye la representación gráfica de la respuesta del detector en función del tiempo de elución del analito[111]; este se puede observar a través de un software, y de esta manera es posible cuantificar e identificar los distintos compuestos de interés que conforman la muestra por medio de los tiempos de retención, que representan el volumen necesario de fase móvil que permitió la elución del analito y su cuantificación a partir del área del pico cromatográfico[115]. La descripción del proceso de funcionamiento de un cromatógrafo líquido de alta resolución se puede observar en la figura 11.

Figura 11. Esquema de un cromatógrafo líquido de alta resolución



Fuente: Zumbado Fernández[113].

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

El presente apartado de la investigación pretende describir el procedimiento empleado para el desarrollo metodológico del perfil de disolución comparativo, así como el propuesto para su validación y su comprobación, mediante el uso de la guía técnica para la presentación y evaluación de los estudios de perfiles de disolución comparativos, la guía de validación de métodos analíticos por parte del MINSA, el listado acumulado de medicamentos de referencia y la USP.

3.1 Enfoque

El enfoque de esta investigación es de tipo cuantitativo; según Hernández et al.[34], esta corresponde a un enfoque secuencial y probatorio, el cual busca medir de manera precisa las variables en un determinado contexto. La recolección de datos se basa en la observación, medición y documentación mediante la utilización de distintos instrumentos estandarizados, los cuales son considerados por la comunidad científica como válidos y confiables; estos son analizados por medio de métodos estadísticos, que permiten determinar ciertas pautas de comportamiento y así pretender comprobar distintas teorías; por lo tanto, este tipo de investigación es objetiva, permitiendo la replicación de datos para confirmar o predecir algún fenómeno en estudio.

El enfoque se origina a partir de una idea que se ha delimitado, de la que se han establecido objetivos y preguntas de la investigación, la implementación de una revisión bibliográfica construye una perspectiva teórica, la cual va a permitir que surjan distintas hipótesis y variables que se deben analizar y evaluar; para esto es necesario la elaboración de un diseño que permita medir y analizar las variables, que darán como resultado una serie de conclusiones[34].

La adaptación de una metodología a analítica para un perfil de disolución y su respectiva validación conlleva ciertas pruebas dentro del laboratorio, para determinar si este cumple con las características de desempeño adecuadas para su utilización, la evaluación de los parámetros que

determinan su funcionalidad generará una serie de datos, necesarios para realizar un análisis de estos parámetros y permitir extraer diversas conclusiones de manera objetiva[34].

3.2 Diseño de la investigación

El diseño de esta investigación es experimental, el cual, de acuerdo con Hernández et al. consiste en un estudio donde se manipulan de manera intencional una o más variables independientes, para analizar los posibles efectos sobre una o más variables dependientes; en otras palabras, implica mantener bajo control la investigación. Para el desarrollo de un método analítico, para un perfil de disolución, se deben evaluar los posibles reactivos, condiciones, concentraciones y otras variables necesarias para permitir la obtención de una metodología robusta, la cual posteriormente será evaluada de acuerdo con los atributos desarrollados, ya que en una validación se deben emplear las mismas características implementadas en la elaboración del método[34].

Cuadro 9. Operacionalización de variables

Objetivo	Variable	Concepto	Indicador	Instrumento
Desarrollar, a partir del método interno utilizado en la prueba de disolución de tabletas recubiertas de 500mg de azitromicina del Laboratorio Farmacéutico Nacional, un método que permita la aplicación de un análisis de un perfil de	Adaptación del procedimiento analítico.	Conjunto de operaciones para realizar o ejecutar un análisis.	Tiempo de retención del analito. Porcentaje disuelto.	Metodología analítica para la disolución. Guía técnica para la presentación y evaluación de los estudios de perfiles de disolución comparativos del MINSA.

disolución comparativo empleando los medios de disolución a pH 1.2, 4.5 y 6.8.				
Demostrar el cumplimiento de las características de desempeño de validación analítica para la metodología analítica del perfil de disolución de Azitromicina tabletas recubiertas de 500mg al departamento de Control de Calidad.	Validación.	Proceso de demostración experimental y documental de que un método analítico es adecuado para su fin.	Linealidad del método y del sistema. Especificidad. Precisión. Exactitud.	Hoja de cálculo de Excel. Guía de validación de métodos analíticos del MINSA.
Comprobar las características de desempeño del perfil de disolución en un producto farmacéutico (Azitromicina) de referencia oficial del MINSA.	Comprobación.	Evaluación de la complejidad del procedimiento.	Tiempo de retención del analito. Porcentaje disuelto.	Método analítico validado.

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 10. Cronograma para la validación del perfil de disolución de azitromicina tabletas recubiertas de 500mg

Cronograma para la validación y elaboración de la metodología analítica para el perfil de disolución comparativo																
Actividad	2021															
	Mes															
	Setiembre					Octubre				Noviembre				Diciembre		
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3
Búsqueda de reglamentación nacional e internacional sobre perfiles de disolución.																
Capacitación del uso del HPLC (Agilent 1200) y Disolutor (Vankel).																
Determinación de solubilidad del principio activo en los medios de disolución, análisis de potencia y disolución de tabletas de Zithromax® (prueba preliminar método USP e interno respectivamente).																
Desarrollar la metodología, realización de pruebas preliminares.																
Búsqueda de reglamentación nacional e internacional sobre validación.																
Diseño del protocolo de validación.																
Elaborar la validación para el medio de pH 1.2.																
Elaborar la validación para el medio de pH 4.5.																
Elaborar la validación para el medio de pH 6.8.																
Cálculo de los resultados de la validación.																

Realización del informe de validación.																
Realización del perfil de disolución a pH 1.2.																
Realización del perfil de disolución a pH 4.5.																
Realización del perfil de disolución a pH 6.8.																

Fuente: elaboración propia.

3.3 Pruebas iniciales para la optimización del método de análisis

- Determinación de la solubilidad del principio activo en los medios de disolución, para el desarrollo del perfil comparativo.
- Evaluación de las condiciones cromatográficas de la prueba de disolución empleado en el Laboratorio Farmacéutico Nacional, para su uso en el desarrollo del perfil de disolución comparativo.
- Evaluación de la estabilidad de la azitromicina en los medios de disolución.
- Cuantificación del porcentaje de principio activo disuelto en el primer tiempo de muestreo.

3.4 Instrumentación para el desarrollo metodológico del perfil de disolución y su validación

3.4.1 Equipos e instrumentación

Los recursos empleados en el desarrollo del método analítico, su validación y comprobación, tales como la cristalería analítica de laboratorio, los reactivos, las materias primas, las tabletas y los equipos (ver cuadro 11) verificados y calibrados empleados para su cuantificación,

que permitieron concretar la elaboración del presente trabajo de investigación, fueron facilitados por parte del Laboratorio Farmacéutico Nacional.

Cuadro 11. Equipos para el desarrollo del método analítico del perfil de disolución y de la validación

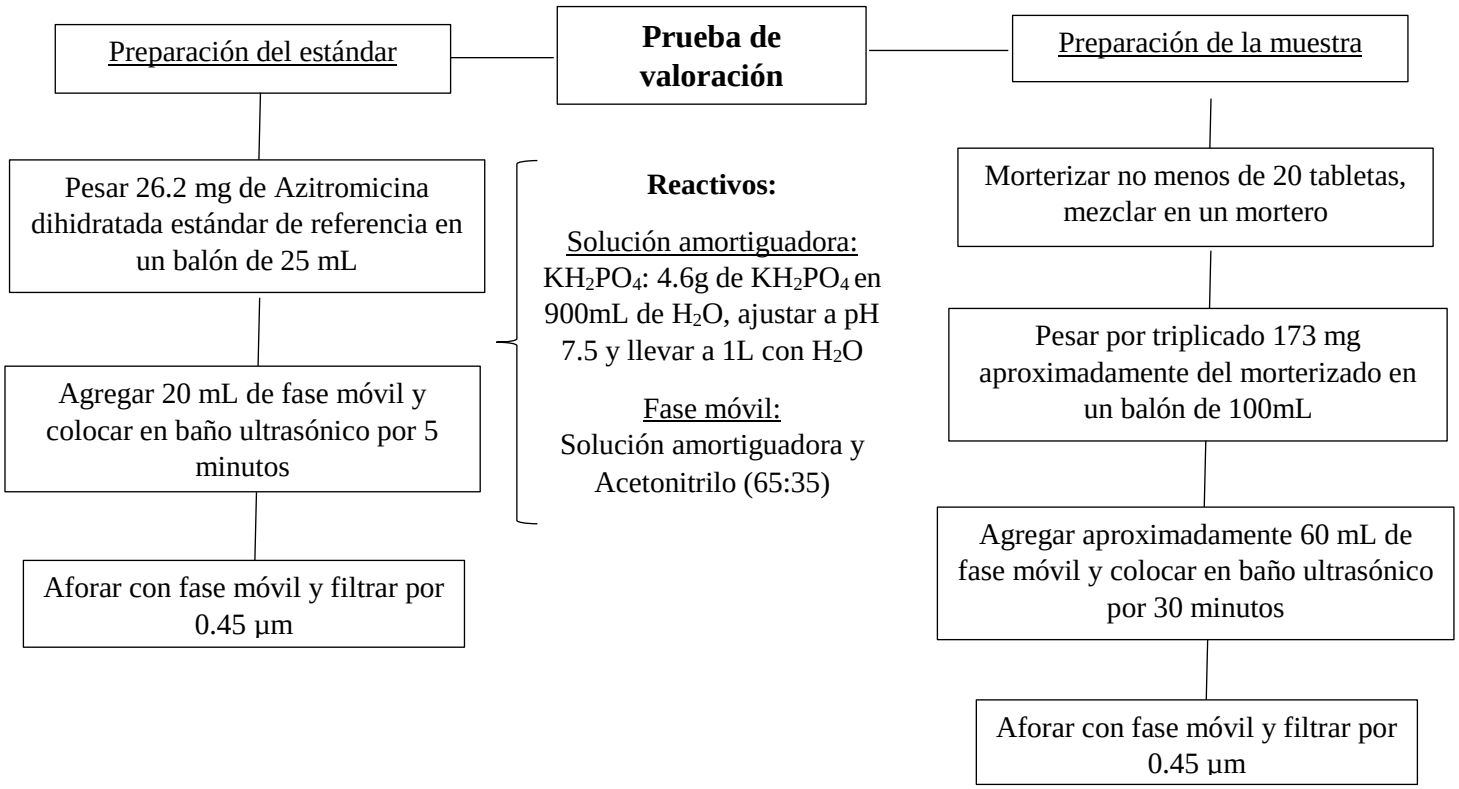
Equipo	Marca
Disolutor	Vankel
Cromatógrafo líquido de alta resolución	Agilent, serie 1200
Balanza analítica	OHAUS
Baño ultrasónico	BRANSON

Fuente: elaboración propia.

3.5 Metodología para la valoración de tabletas recubiertas de Zithromax® 500mg

Con la finalidad de determinar el porcentaje de ingrediente activo presente en los lotes de las tabletas recubiertas de Zithromax® 500mg, que se emplearán en la comprobación de la validación del perfil de disolución, se llevó a cabo la prueba de valoración, según la USP[78]. De esta manera, se podrá determinar si los lotes son aptos para su uso en la investigación. La figura 12 describe su preparación.

Figura 12. Metodología de la prueba de valoración



Fuente: elaboración propia a partir de la referencia[78].

Cuadro 12. Condiciones cromatográficas para la valoración

Sistema Cromatográfico	
Fase móvil	Acetonitrilo: solución amortiguadora (65:35)
Columna	C18 de 25cm x 4.6mm; 5µm
Longitud de onda	210nm
Temperatura	30 ºC
Volumen de inyección	100 µL
Flujo	2mL/min

Fuente: elaboración propia.

Fórmulas para determinar la valoración

$$\text{Cn Std (mg/mL)} = \frac{\text{Peso Std (g)} \times \text{Potencia Std (mg/g)} \times (100\text{-H}/100)}{\text{FD Std (mL)}}$$

$$\text{Cn Mt (mg/tab)} = \frac{\text{Área Mt} \times \text{Cn Std (mg/mL)} \times \text{FD Mt (mL)} \times \text{FG} \times \text{PP (g/tab)}}{\text{Área Std} \times \text{Peso Mt (g)}}$$

$$\% = \text{mg/tab} \times 100$$

Cuadro 13. Simbología para el cálculo de resultados

Simbología	Descripción
H	Humedad del estándar
Cn	Concentración
Std	Estándar
Mt	Muestra
PP	Peso promedio de la tableta
FD	Factor de dilución
FG	Factor gravimétrico (0.9541)
FD Std	Factor de dilución del estándar
FD Mt	Factor de dilución de la muestra

Fuente: elaboración propia.

3.5.1 Evaluación de la solubilidad de azitromicina en los medios de disolución establecidos por el MINSA para el desarrollo del perfil de disolución

Para establecer la metodología analítica del perfil de disolución, se debe evaluar la solubilidad del principio activo, con la finalidad de determinar si se solubiliza en los medios a utilizar (pHs 1.2; 4.5 y 6.8)[2]. Para esta prueba la USP establece el término descriptivo de solubilidad con base en las partes de solvente que se requieren para una parte de soluto (ver cuadro 14).

Cuadro 14. Determinación de la solubilidad aproximada de sustancias

Término descriptivo	Partes de solvente requeridos por una parte de soluto
Muy soluble	Menos de 1
Libremente soluble	De 1 a 10
Soluble	De 10 a 30
Escasamente soluble	De 30 a 100
Ligeramente soluble	De 100 a 1000
Muy ligeramente soluble	De 1000 a 10,000
Prácticamente insoluble o insoluble	100 y más

Fuente: USP[116].

3.6 Metodología para el desarrollo del perfil de disolución

El desarrollo del perfil de disolución comparativo se hizo a partir de una adaptación analítica del método interno de la prueba de disolución implementada en el Laboratorio Farmacéutico Nacional, a la cual se le anexaron los lineamientos estipulados por parte del MINSA[2] en su guía técnica para la presentación y evaluación de los estudios de perfiles de disolución

comparativos para formas de dosificación de liberación inmediata, para adecuar la metodología analítica a las necesidades de un perfil de disolución.

3.6.1 Descripción de la preparación del perfil de disolución pH 1.2

3.6.1.1 Reactivos

- Solución de HCl a pH 1.2: disolver 38.02g de cloruro de potasio y 35mL de ácido clorhídrico en 5600mL de agua. Ajustar a un pH de 1.2 con cloruro de potasio o ácido clorhídrico y llevar a un volumen de 6 litros.
- Solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio: disolver 4.6g de fosfato monobásico de potasio en un recipiente de capacidad adecuada, agregar 900ml de agua, agitar con pastilla magnética hasta disolver completamente, ajustar a pH 7.5 con hidróxido de sodio 1N y diluir con agua hasta un volumen de 1000ml.
- Fase móvil: mezcla isocrática de acetonitrilo: solución amortiguadora (65: 35).

3.6.1.2 Preparación del estándar

- Pesar exactamente cerca de 29,1mg de Azitromicina dihidratada, estándar de referencia secundario (equivalente a 27,8mg de Azitromicina) en un balón de 100 mL (concentración 0.278mg/mL).
- Agregar 50 mL de medio de disolución y colocar en baño ultrasónico durante 15 minutos para disolver.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente y aforar a volumen con diluyente.
- Filtrar por 0.45 μm.

3.6.1.3 Preparación de la muestra

- Colocar cada una de las 6 tabletas en cada frasco de disolución.
- Disolver según las condiciones anteriormente mencionadas.
- Al finalizar la prueba, tomar muestras filtradas por 1 µm.
- Transferir 5ml a un balón de 10ml y diluir a volumen con diluyente (concentración 0.278mg/mL).
- Posteriormente, filtrar por 0.45 µm.

3.6.2 Descripción de la preparación del perfil de disolución pH 4.5

3.6.2.1 Reactivos

- Solución amortiguadora de acetato pH 4.5: disolver 17.9g de acetato de sodio trihidratado y 8ml de ácido acético glacial; en 5600mL de agua. Ajustar a un pH de 4.5 con ácido acético glacial y llevar a un volumen de 6 litros.
- Solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio: disolver 4.6g de fosfato monobásico de potasio en un recipiente de capacidad adecuada, agregar 900ml de agua, agitar con pastilla magnética hasta disolver completamente, ajustar a pH 7.5 con hidróxido de sodio 1N y diluir con agua hasta un volumen de 1000ml.
- Fase móvil: mezcla isocrática de acetonitrilo: solución amortiguadora (65: 35).

3.6.2.2 Preparación del estándar

- Pesar exactamente cerca de 29.1mg de Azitromicina dihidratada, estándar de referencia (equivalente a 27.8mg de Azitromicina) en un balón de 100 mL (concentración 0.278mg/mL).

- Agregar 50 mL de medio de disolución y colocar en baño ultrasónico durante 15 minutos para disolver.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente y aforar a volumen con diluyente.
- Filtrar por 0.45 μm.

3.6.2.3 Preparación de la muestra

- Colocar cada una de las 6 tabletas en cada frasco de disolución.
- Disolver según las condiciones anteriormente mencionadas.
- Al finalizar la prueba tomar muestras filtradas por 1 μm.
- Transferir 5ml a un balón de 10ml y diluir a volumen con diluyente.
- Posteriormente, filtrar por 0.45 um.

3.6.3 Descripción de la preparación del perfil de disolución pH 6.8

3.6.3.1 Reactivos

- Solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio pH 6.8: disolver 40.8g de fosfato monobásico de potasio y 5.37g de hidróxido de sodio en 5600mL de agua. Ajustar a un pH de 6.8 con hidróxido de sodio o ácido fosfórico y llevar a un volumen de 6 litros.
- Solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio: disolver 4.6g de fosfato monobásico de potasio en un recipiente de capacidad adecuada, agregar 900ml de agua, agitar con pastilla magnética hasta disolver completamente, ajustar a pH 7.5 con hidróxido de sodio 1N y diluir con agua hasta un volumen de 1000ml.
- Fase móvil: Mezcla isocrática de acetonitrilo: solución amortiguadora (65: 35).

3.6.3.2 Preparación del estándar

- Pesar exactamente cerca de 29.1mg de Azitromicina dihidratada, estándar de referencia (equivalente a 27.8mg de Azitromicina) en un balón de 100 mL.
- Agregar 50 mL de medio de disolución y colocar en baño ultrasónico durante 15 minutos para disolver.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente y aforar a volumen con diluyente.
- Filtrar por 0.45 μm.

3.6.3.3 Preparación de la muestra

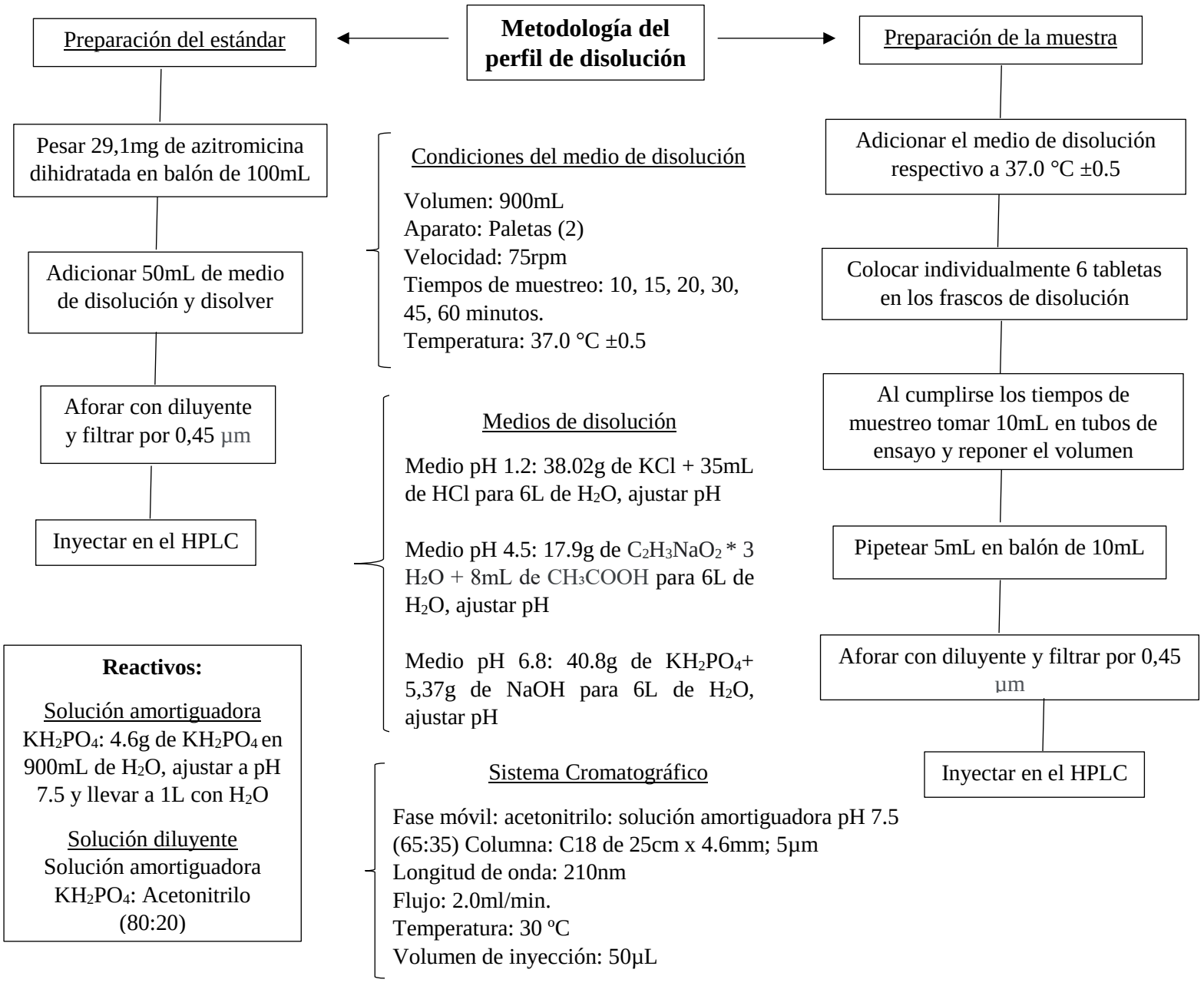
- Colocar cada una de las 6 tabletas en cada frasco de disolución.
- Disolver según las condiciones anteriormente mencionadas.
- Al finalizar la prueba tomar muestras filtradas por 1 μm.
- Transferir 5ml a un balón de 10ml y diluir a volumen con diluyente.
- Posteriormente, filtrar por 0.45 um.

Fórmula para el cálculo de resultados para el perfil de disolución (ver simbología en el cuadro 13)

$$\text{Cn St (mg/mL)} = \frac{\text{Peso Std (g x Potencia Std (mg/g) x (100-H/100)}}{\text{FD Std (mL)}}$$

$$\% = \frac{\text{Area Mt x Cn Std (mg/mL) x FD Mt (mL) x FG x 100}}{\text{Área Std x Etiquetado}}$$

Figura 13. Metodología del perfil de disolución



Fuente: elaboración propia.

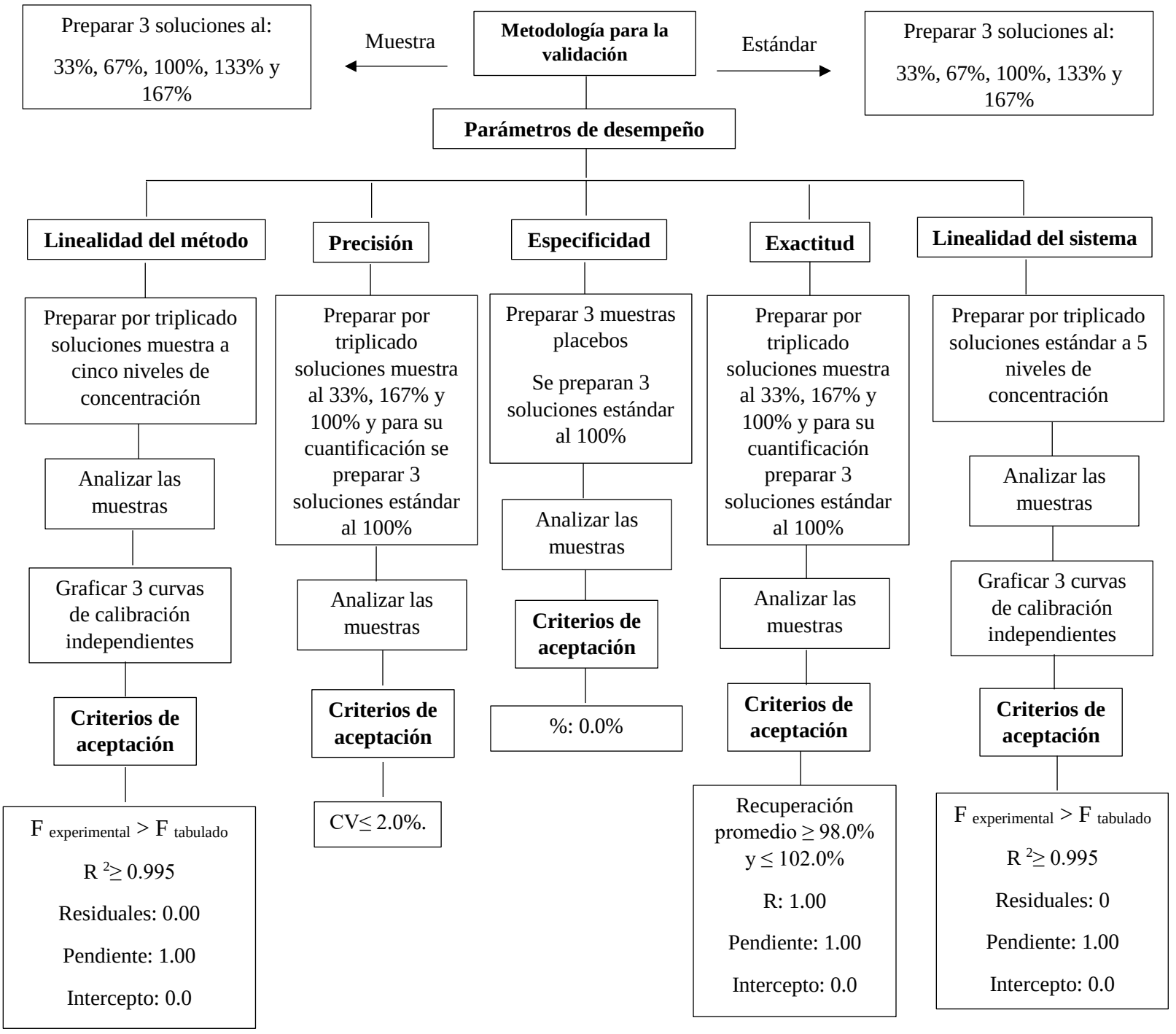
3.7 Validación del perfil de disolución

3.7.1 Metodología para la evaluación de los parámetros de desempeño

La validación de la metodología del perfil de disolución comparativo se llevó a cabo de acuerdo con la guía de validación de métodos analíticos del MINSA[1]; los parámetros de evaluación que deben abarcarse para dicha validación corresponden:

- **Especificidad:** realizar una comparación de la matriz de la muestra respecto al estándar; para ello se deben preparar por triplicado muestras placebo y se comparan con la señal del estándar. Criterio de aceptación: la solución muestra no debe presentar alguna señal que interfiera con la señal que se obtuvo en el estándar.
- **Linealidad e intervalo del sistema:** preparar por triplicado soluciones estándar a cinco niveles de concentración (33%, 66%, 100%, 133% y 167%), se grafica en tres curvas de calibración independientes y se evalúan estadísticamente. Criterios de aceptación: coeficiente de correlación entre 0.98 y 1.00, el r^2 debe ser mayor a 0.995. El análisis de varianza de la regresión lineal demuestra el paso del intercepto por 0.00, una desviación no significativa respecto a la regresión, una distribución aleatoria de los residuos.
- **Linealidad e intervalo del método:** preparar por triplicado soluciones a cinco niveles de concentración (33%, 66%, 100%, 133% y 167%), se grafican en tres curvas de calibración independientes y se evalúan estadísticamente. Criterios de aceptación: coeficiente de correlación entre 0.98 y 1.00, el r^2 debe ser mayor a 0.995. El análisis de varianza de la regresión lineal demuestra el paso del intercepto por 0.00, una desviación no significativa respecto a la regresión, una distribución aleatoria de los residuos.
- **Exactitud:** preparar muestras por triplicado a tres niveles de concentración (33%, 100% y 167). Criterios de aceptación: la recuperación promedio debe ser mayor a 98.0% y menor a 102.0%. El coeficiente de variación debe ser menor a 2.0%, el coeficiente de correlación es de 1.00, la pendiente es igual a 1.00 y el intercepto es de 0.00.
- **Precisión:** utilizar muestras preparadas en la exactitud. Criterios de aceptación: el coeficiente de variación debe ser menor a 2.0%.

Figura 14. Descripción de la metodología para la validación del perfil de disolución

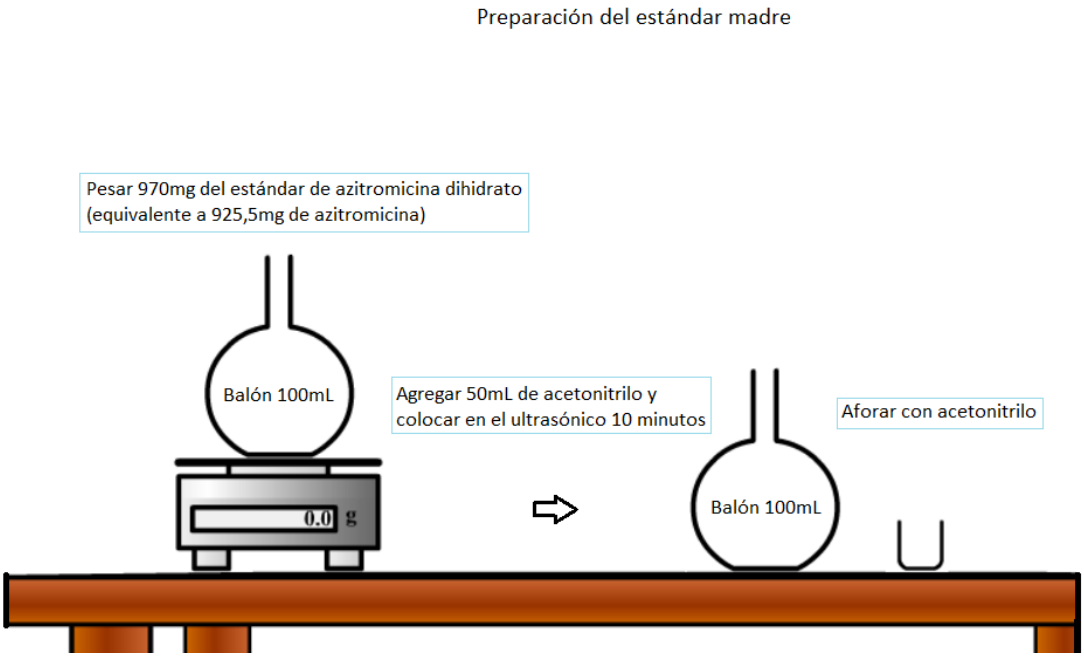


Fuente: elaboración propia a partir de referencia[1].

3.7.1.1 Metodología para la preparación de las soluciones muestra y estándar

Las soluciones estándar y muestras se prepararon a cinco niveles de concentración distintos, correspondiendo al 33%, 66%, 100%, 133% y 167%. Para cada uno de estos lo único que varía entre cada nivel es la cantidad añadida de la solución estándar madre. El cuadro 15 muestra las alícuotas agregadas en cada concentración y el buffer empleado, ya que se debieron preparar soluciones estándar para cada medio de disolución, pH 1.2, 4.5 y 6.8. La solución estándar madre se prepara a una concentración teórica de 9.2550mg/mL en acetonitrilo (ver figura 15), mientras que las soluciones muestras y estándares a 0.2777mg/mL como concentración normal de trabajo (correspondiendo al 100%).

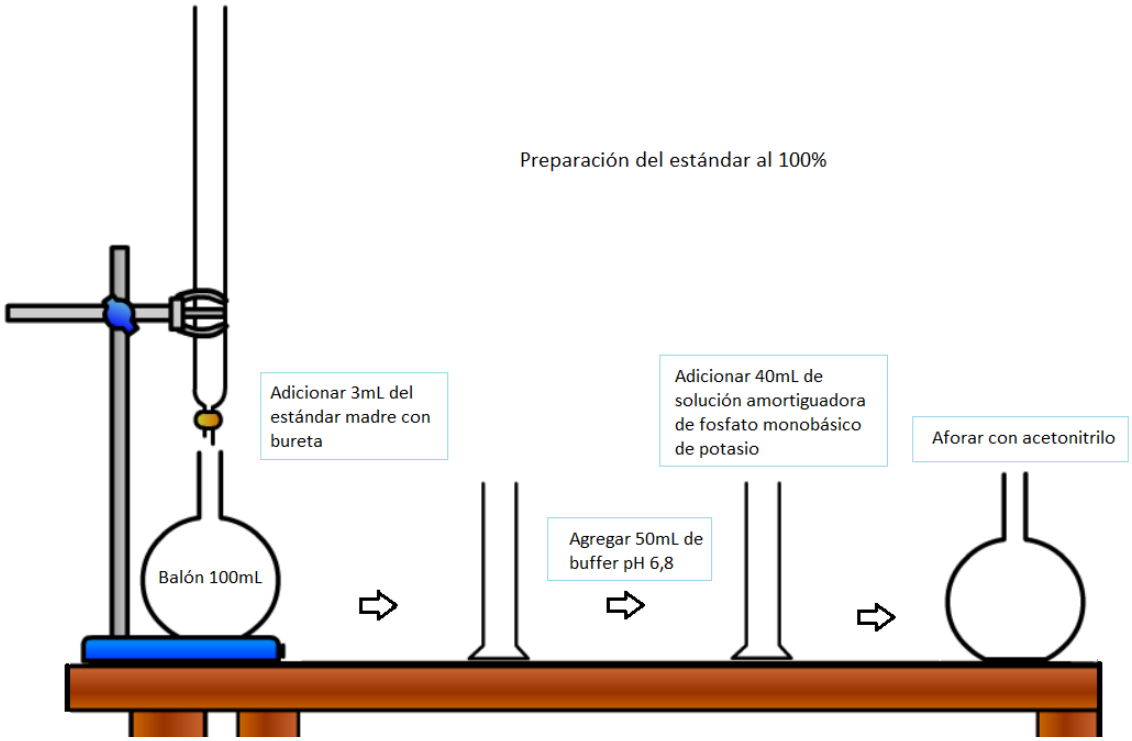
Figura 15. Metodología analítica para la preparación del estándar madre



Fuente: elaboración propia.

Para la preparación de las soluciones estándar, se agrega la alícuota de la solución estándar madre en un balón aforado de 100mL, según el nivel de concentración a preparar, y se adiciona una proporción que corresponde al 50% del volumen del balón aforado del medio de disolución correspondiente (soluciones amortiguadoras a pHs 1.2, 4.5 y 6.8. Se sonifica, se agrega un 40% del volumen del balón aforado de la solución amortiguadora, se sonifica y se lleva a volumen con acetonitrilo. Dicha metodología se puede ilustrar en la figura 16.

Figura 16. Metodología para la preparación de los estándares a pH 6.8

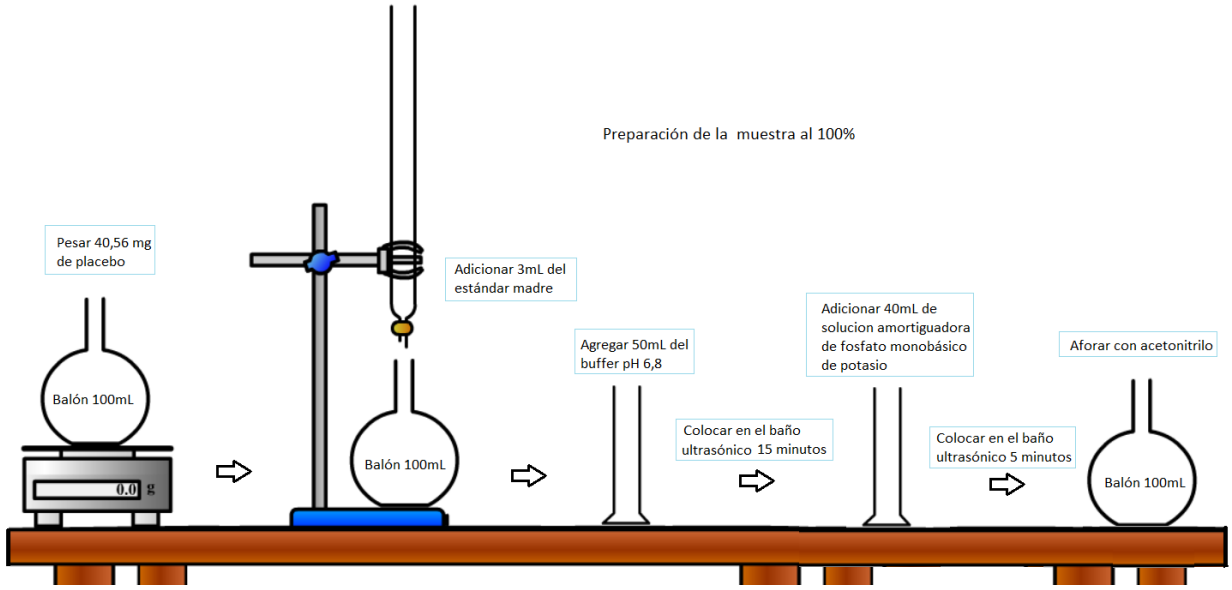


Fuente: elaboración propia.

Con respecto a la preparación de las soluciones muestras se agrega la alícuota según el nivel de concentración a elaborar (ver cuadro 17) a un balón aforado, en el que se pesaron los excipientes, y se adiciona una proporción que corresponde al 50% del volumen del balón aforado del medio de disolución correspondiente, se sonifica, se agrega un 40% del volumen del balón

aforado la solución amortiguadora, se vuelve a sonificar y se lleva a volumen con acetonitrilo (ver figura 17).

Figura 17. Metodología para la preparación de las muestras a pH 6.8



Fuente: elaboración propia.

Cuadro 15. Material volumétrico empleado en la preparación de las muestras y estándares

Concentración (porcentaje)	**Balones (mL) ± 0.1**		**Alícuota (mL) bureta de 10mL ± 0.03**	
	Estándar	Muestra	Estándar	Muestra
33	100	100	1	1
66	100	100	2	2
100	100	100	3	3
133	100	100	4	4
167	100	100	4.5	4.5

Fuente: elaboración propia.

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN Y RESULTADOS

La azitromicina se encuentra dentro grupo II de acuerdo con el SCB, lo que quiere decir que presenta una baja solubilidad en medios acuosos (permitiendo explicar su baja biodisponibilidad) y una alta permeabilidad[117]. Es por esta razón que un perfil de disolución comparativo permitirá la evaluación de la formulación respecto al medicamento de referencia en el país, correspondiendo la velocidad de disolución del fármaco un parámetro crítico, para lo cual resulta necesaria la implementación del método analítico, que cumpla con las características de desempeño adecuadas para el fin propuesto; en otras palabras, una metodología analítica debidamente validada.

4.1 Pruebas preliminares para el desarrollo del perfil de disolución comparativo

4.1.1 Valoración de tabletas recubiertas de Zithromax® de 500mg

Con la finalidad de determinar la cantidad de principio activo que se encuentra presente en el lote de tabletas recubiertas de Zithromax® de 500mg, fabricado por Laboratorios Pfizer de México, al ser el medicamento de referencia en el país según el MINSA[3] y, por lo tanto, el lote a utilizar para corroborar la metodología analítica del perfil de disolución comparativo, se llevó a cabo la prueba de valoración empleando el método analítico oficial de la USP.

Los resultados de la prueba de valoración se presentan en el cuadro 16, donde el promedio obtenido fue de 94.9%, con un RSD de 1.3%. De acuerdo con la monografía oficial de la USP[72], la azitromicina tabletas debe contener no menos de 90.0% y no más de 110.0% de principio activo, con un RSD igual o menor a 2.0% (evaluación de precisión entre los datos). Ambos datos se encuentran dentro de los parámetros establecidos; por lo tanto, se considera que el lote es apto para su utilización en el desarrollo del método analítico.

Cuadro 16. Resultados de la valoración de Zithromax® 500mg tabletas recubiertas

Muestra	Recuperación (%)
1	94.3
2	94.0
3	96.4
Promedio	94.9
RSD	1.3

Fuente: elaboración propia.

4.1.2 Evaluación de la solubilidad del principio activo en los medios de disolución para el desarrollo del perfil comparativo

Para determinar la solubilidad aproximada de la materia prima de azitromicina en la solución amortiguadora de acetato a pH 4.5, para la solución amortiguadora de fosfato a pH 6.8 y la solución de ácido clorhídrico a pH 1.2 se siguió la metodología descrita en la USP, en su apartado ¨descripción y solubilidad¨ (ver cuadro 14), donde se observó que la cantidad mínima de medio de disolución que logró disolver 0.25g de principio activo fue de 1.5mL (para cada uno de los pHs), lo cual indica que se requieren seis partes del solvente por cada parte del soluto; por lo tanto, según la clasificación descrita en el cuadro 14, la azitromicina es libremente soluble en los medios de disolución que deben emplearse en el perfil de disolución comparativo.

4.1.3 Evaluación de las condiciones cromatográficas de la prueba de disolución empleado en el Laboratorio Farmacéutico Nacional para su uso en el desarrollo del perfil de disolución comparativo

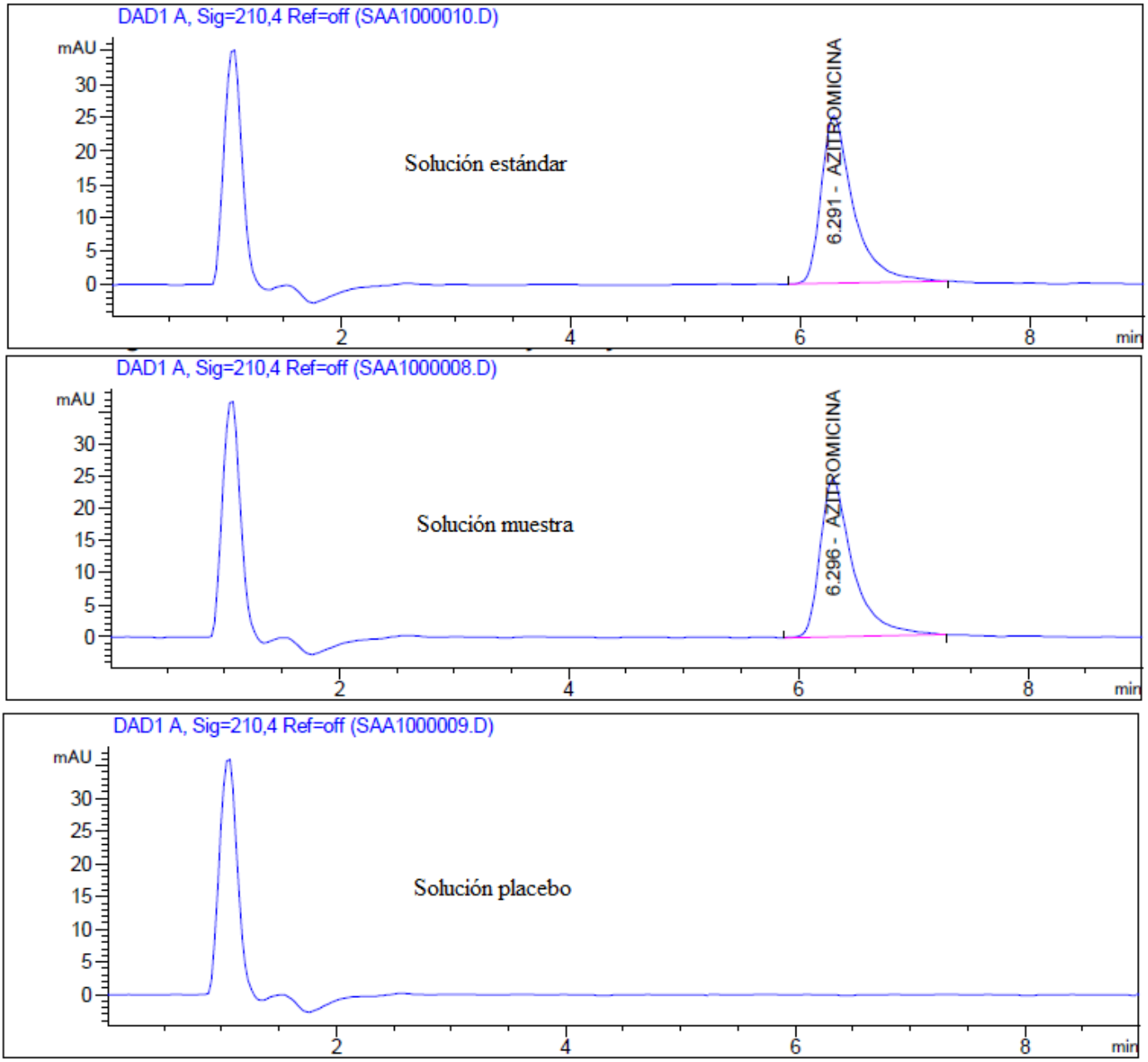
Con la finalidad de evaluar si las condiciones cromatográficas del método interno de la prueba de disolución, descritas en la figura 13, son aptas para emplearse en el desarrollo del perfil de disolución comparativo, se preparó una solución muestra y una solución estándar a la

concentración normal de trabajo, utilizando como disolventes los medios de disolución a pHs 1.2, 4.5 y 6.8, tanto con el medicamento genérico como con el medicamento de referencia, tomando como referencia la longitud de onda establecida en la monografía oficial de la USP[72], la cual indica que la misma corresponde a 210nm. Se inyectaron 50µL de cada una de las soluciones en un cromatógrafo líquido de alta resolución con arreglo de diodos, lo que permitió corroborar la longitud de onda para la determinación del compuesto.

Las figuras 18, 19 y 20 demuestran que la solución muestra corresponde al mismo compuesto que la solución estándar, al coincidir los tiempos de retención del pico principal de las dos soluciones, también se observa una forma similar del pico de interés. Además, para determinar que ningún componente de la matriz interfiera respecto a la señal de la azitromicina, se inyectan los placebos de cada medio de disolución (pHs 1.2, 4.5 y 6.8), con la finalidad de determinar posibles interferencias. Los resultados obtenidos en el cromatograma se contrastan con la cromatografía de las soluciones muestras y estándares, y la especificidad del método posteriormente se evalúa en la validación del método; sin embargo, es fundamental determinar posibles interferencias cromatográficas para un desarrollo de un método analítico.

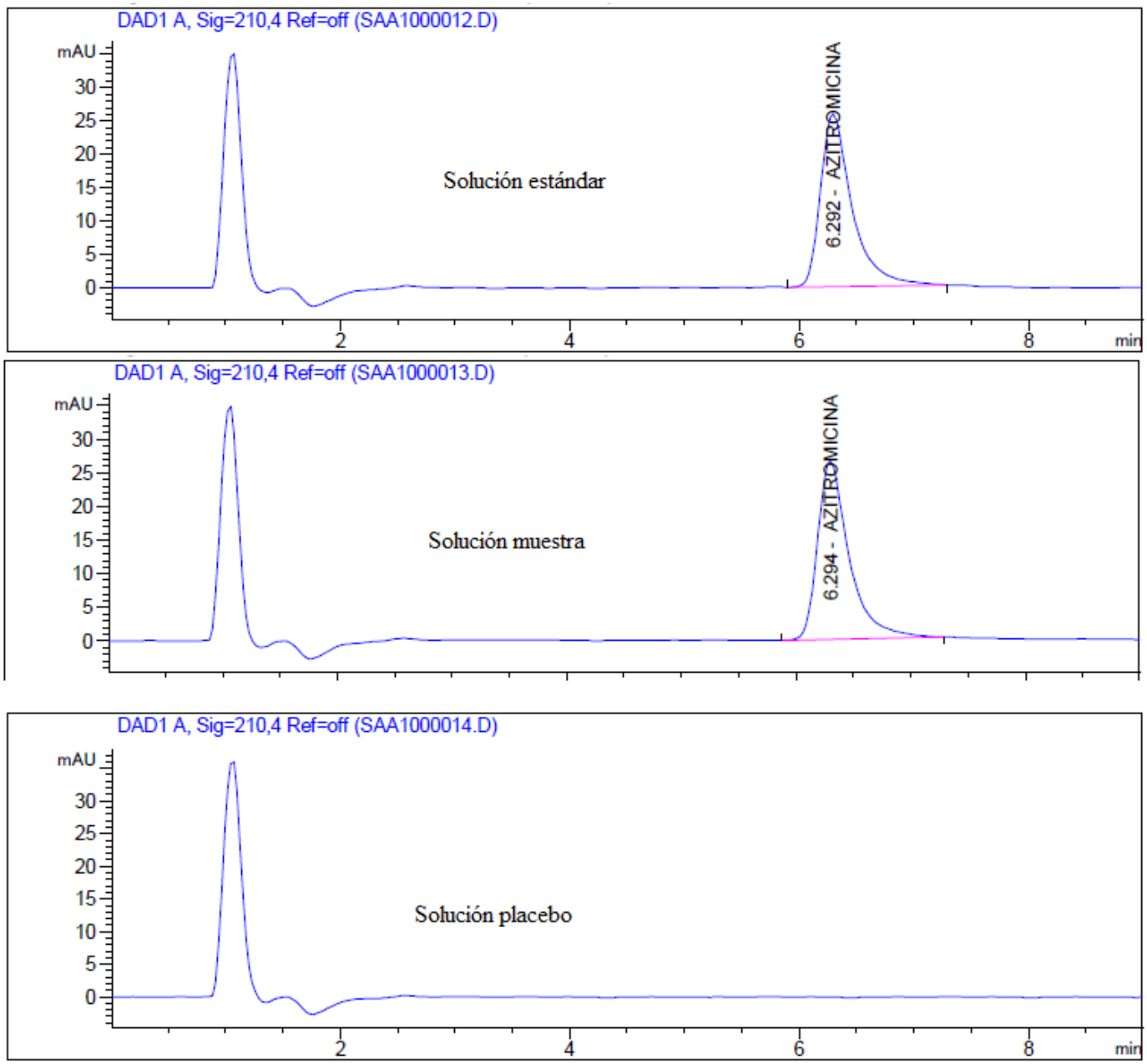
De acuerdo con la cromatografía de cada medio de disolución, se puede observar que el placebo no presenta ningún pico que coincida con el tiempo de retención del analito; por lo tanto, ningún componente de las matriz de las tabletas, tanto del medicamento genérico como de referencia, interfiere en la longitud de onda (se omiten los espectros del medicamento de referencia al presentar el mismo comportamiento, el análisis es para determinar la presencia de posibles interferencias en el sistema cromatográfico).

Figura 18. Comparación de espectros cromatográficos entre el estándar, muestra y placebo del medicamento genérico en el medio de disolución a pH 1.2



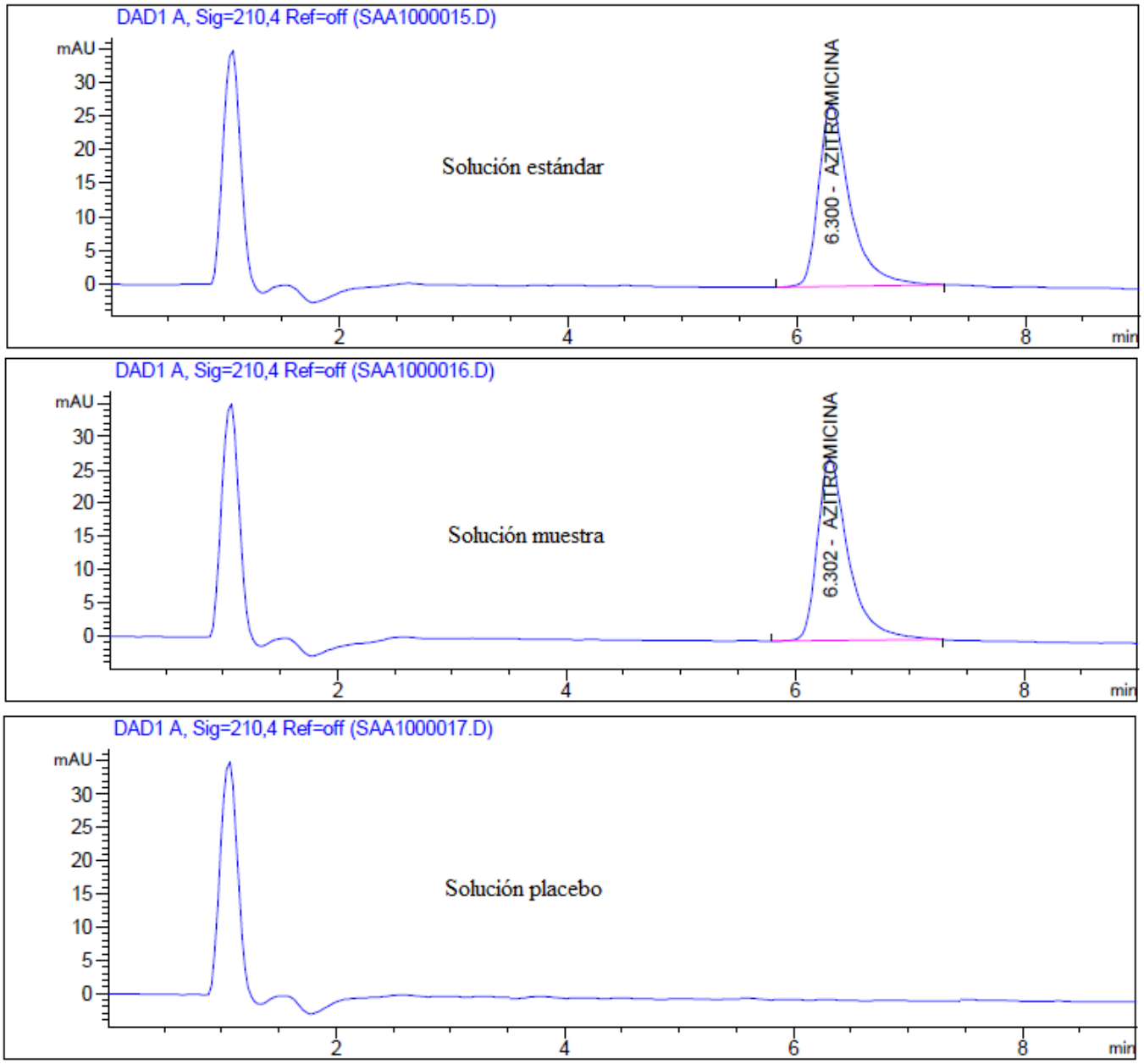
Fuente: elaboración propia.

Figura 19. Comparación de espectros cromatográficos entre el estándar, muestra y placebo del medicamento genérico en el medio de disolución a pH 4.5



Fuente: elaboración propia.

Figura 20. Comparación de espectros cromatográficos entre el estándar, muestra y placebo del medicamento genérico en el medio de disolución a pH 6.8



Fuente: elaboración propia.

Posterior a la inyección de los estándares y muestras, se determina que se obtienen valores de áreas aptas para su cuantificación (ver cuadro 17), ya que picos muy concentrados tienden a

deformarse después de varias inyecciones y tras áreas muy bajas existe mayor variabilidad entre las inyecciones; por ello se conserva el loop de 50µL para la metodología analítica, los valores de las áreas obtenidas tanto para las soluciones estándar y muestras del medicamento de referencia y el genérico corresponden a una concentración aproximada a la concentración de trabajo (no se lleva a cabo la cuantificación de ellos).

Cuadro 17. Evaluación de las muestras en los medios de disolución a pH 1.2, 4.5 y 6.8

Medio	Medición de muestras del medicamento de referencia	Medición de muestras del medicamento genérico	Medición de estándar
pH 1.2	1145.3356	1108.3356	1139.4564
pH 4.5	1153.4781	1169.5745	1140.7468
pH 6.8	1135.2165	1130.6338	1138.4224

Fuente: elaboración propia.

Tras determinar que el sistema cromatográfico se comporta de manera estable (observar línea base con comportamiento de misma tendencia entre inyecciones) y obtener una cromatografía con áreas adecuadas y picos de forma similar, se determina que las condiciones cromatográficas (descritas en la figura 13, metodología del perfil de disolución), se determina que estas son aptas para ser utilizadas en el perfil de disolución comparativo.

4.1.4 Determinación de la cantidad mínima de principio activo que se disuelve del perfil de disolución en el primer tiempo de muestreo

Con la finalidad de cuantificar la cantidad mínima de principio activo que se disuelve en el disolutor durante el primer tiempo de muestreo (valor mínimo a obtener del perfil de disolución),

correspondiendo este a los 10 minutos, se analizaron dos muestras del medicamento genérico y el de referencia en la solución amortiguadora de acetato a pH 4.5, la solución amortiguadora de fosfato a pH 6.8 y la solución de ácido clorhídrico a pH 1.2 y sus respectivos estándares, lo que permitirá definir el rango en que se debe validar el método analítico. Los resultados obtenidos se presentan en el cuadro 18, donde se muestra que el valor mínimo de las disoluciones a pH 1.2 es de 84%, para el pH a 4.5 89% y el pH 6.8 81%.

Cuadro 18. Cantidad de principio activo disuelto del medicamento genérico y de referencia a los 10 minutos en los medios de disolución

Medicamento genérico			**Zithromax®**		
pH 1.2 (%)	**pH 4.5 (%)**	**pH 6.8 (%)**	**pH 1.2 (%)**	**pH 4.5 (%)**	**pH 6.8 (%)**
84	90	89	86	90	81
86	89	93	84	89	93

Fuente: elaboración propia.

4.1.5 Evaluación de la estabilidad de la azitromicina en los medios de disolución

4.1.5.1 Evaluación de la estabilidad en el medio de disolución a pH 1.2

Al aludir que los macrólidos presentan una baja estabilidad a pHs bajos, grupo al cual pertenece la azitromicina[62], se procede a evaluar la estabilidad del principio activo en los medios de disolución, al corresponder dos de los tres pHs empleados en el perfil de disolución a medios ácidos (pH 1.2 y 4.5). Además, la temperatura es un factor adicional que no se considera en la validación de un método analítico para una prueba de desempeño; por lo tanto, se procede a preparar por triplicado soluciones muestras (elaboradas de la misma manera que el estándar del perfil de disolución comparativo) a la concentración normal de trabajo, las cuales se inyectaron inmediatamente posterior a su preparación. Luego se procede a colocarlas en un baño de María a

una temperatura de 37.5°C y a realizar inyecciones a partir del balón cada 10 minutos (aludiendo a que cada inyección en el HPLC tiene una duración de 8 minutos) los resultados obtenidos en este medio de disolución se pueden observar en el cuadro 19.

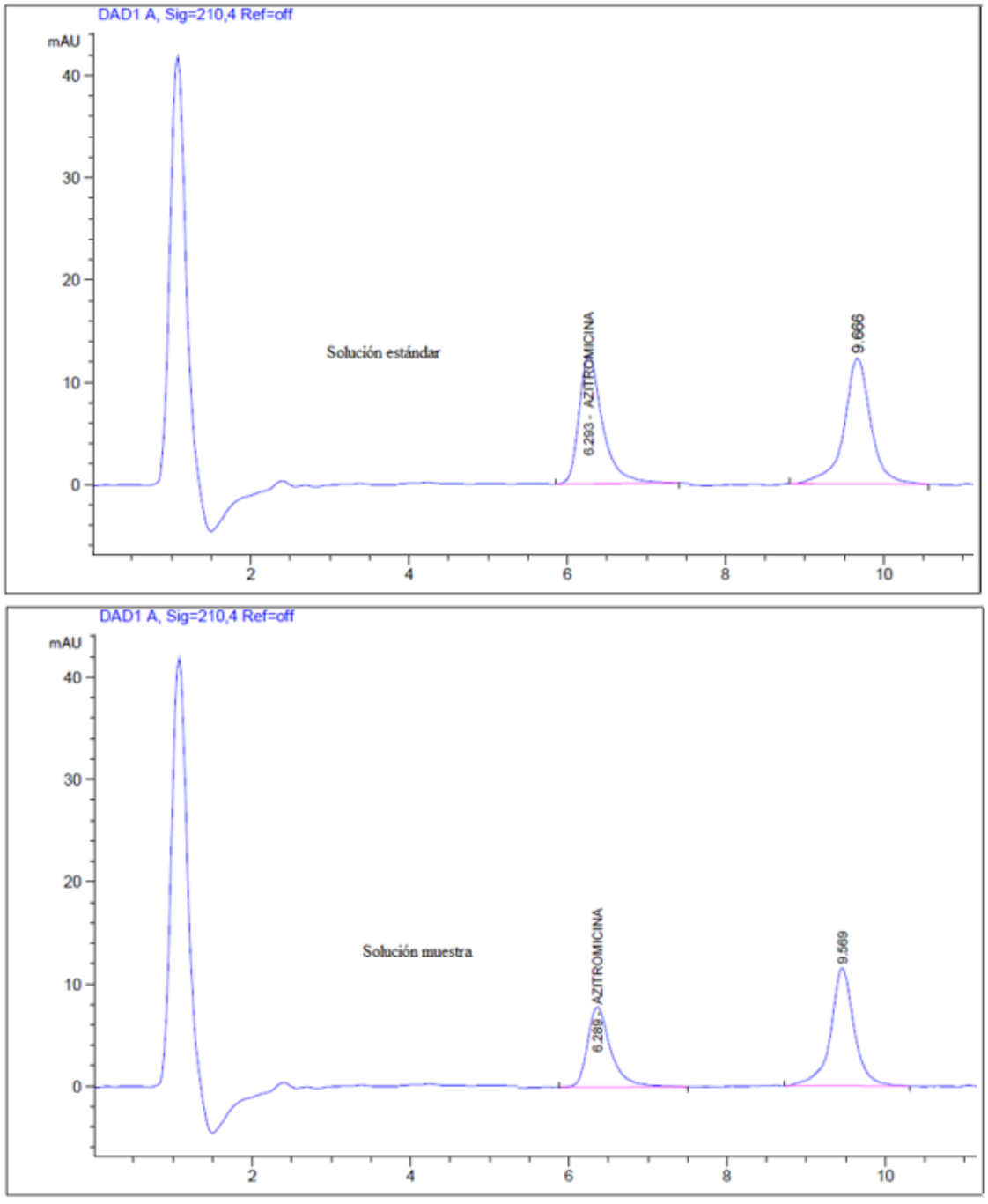
Cuadro 19. Lecturas de las soluciones muestras para la evaluación de la estabilidad del medio de disolución a pH 1.2

Soluciones muestra al 100%	Lectura posterior a su preparación	Lectura a los 10 minutos	Lectura a los 20 minutos
1	1143.4665	1145.3768	1096.2136
2	1152.5493	1151.4598	1103.3456
3	1146.5312	1147.3241	1095.3461

Fuente: elaboración propia.

A los 20 minutos posteriores a la preparación de las soluciones, se observa una reducción del área de estas; además, la presencia de un pico que no se encontraba en la cromatografía (primer cromatograma de las figuras 21 y 22) son indicativos de una degradación del compuesto en el medio de disolución a pH 1.2 y a una temperatura de 37.5 °C; por consiguiente, en este tiempo se interrumpe la inyección cada 10 minutos de las soluciones; aproximadamente una hora después se inyecta la muestra y se contrasta con un estándar con el mismo tiempo (aproximadamente 80 minutos), lo cual se puede observar en la figura 21.

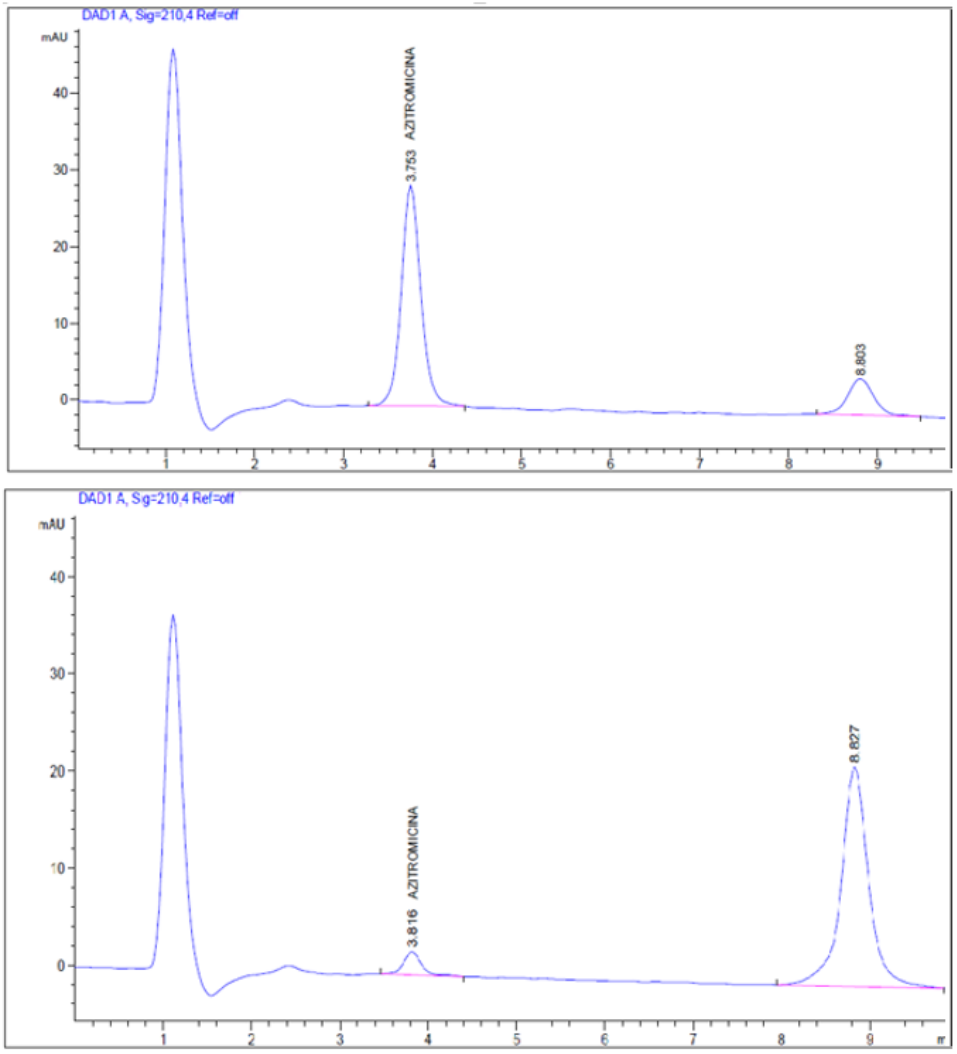
Figura 21. Cromatografía de las soluciones muestras para la evaluación de la estabilidad del medio de disolución a pH 1.2



Fuente: elaboración propia.

A solicitud del departamento de control de calidad se hizo un cambio de columna, pasando de una columna C18 marca Supelco de 4.6 X 250mm de 5µm a una Xterra de 25cm de 4.6 x250mm de 5µ, las cuales corresponden a las asignadas para el producto en el laboratorio farmacéutico. Se observó una alteración de los tiempos de retención, así como una disociación del analito. La figura 22 corresponde a la misma muestra, tras su inyección en una diferencia de aproximadamente 8 horas, donde la magnitud del área total al sumar los dos picos es prácticamente similar en ambos casos.

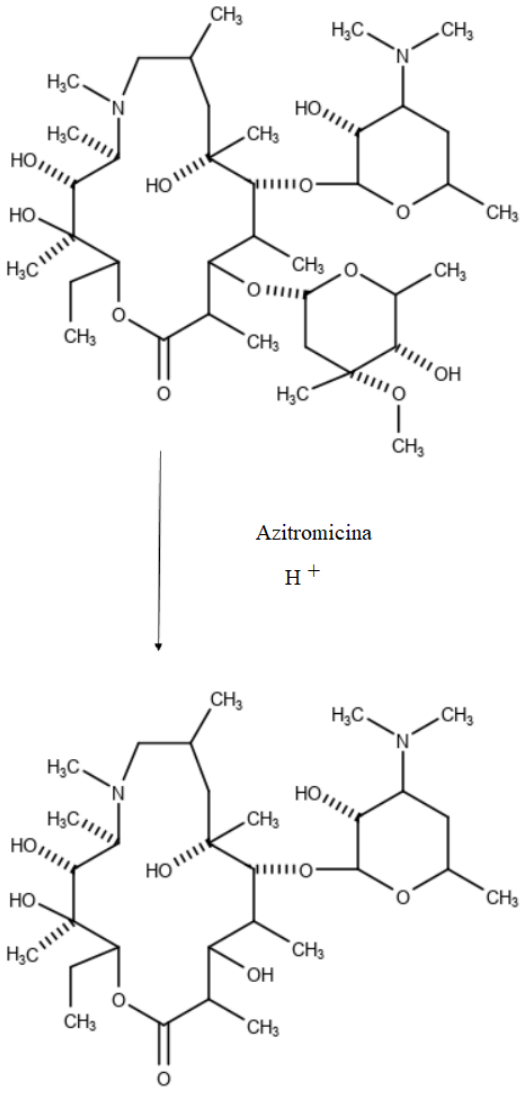
Figura 22. Comparación de la solución muestra a pH 1.2 con 8 horas de diferencia



Fuente: elaboración propia.

De acuerdo con Fiese et al.[68] la azitromicina, a pesar de presentar un nitrógeno con un grupo metilo, que sustituye el carbonilo en la posición 9 del anillo de aglicona de la eritromicina, lo que impide la inactivación por esta vía, se descompone por medio de hidrólisis del enlace éter al azúcar cladinosa en presencia de un medio ácido (ver figura 23). Estos autores indican que, tras un experimento comparativo entre la azitromicina y eritromicina en un medio con un pH de 2 a 37 °C, la azitromicina experimentó una degradación del 10% a los 20.1 minutos.

Figura 23. Vía de descomposición de la azitromicina en medio ácido



Fuente: Fiese et al.[68]

Por lo tanto, el comportamiento inestable del principio activo en la solución amortiguadora a pH 1.2 eventualmente no permitiría la cuantificación del analito en el desarrollo del perfil de disolución, al no contemplar las condiciones del tiempo y la temperatura (en el caso del factor tiempo que no se puede controlar en las muestras del perfil de disolución) que sí se pueden controlar en su validación. Sin embargo, a solicitud del departamento de control de calidad, se elabora la validación y comprobación en este medio de disolución, con la finalidad de indicar que los posibles problemas que se presenten se atribuyen al comportamiento del principio activo en el medio ácido (pH 1.2).

4.1.5.2 Evaluación de la estabilidad en el medio de disolución a pH 4.5

Tras conocer que el medio de disolución a pH 1.2 mostró una degradación a los 20 minutos, se procede a emplear las mismas condiciones, inyectando por triplicado soluciones muestra posterior a su preparación y a los 20, 30 y 60 minutos. Posteriormente, se guarda la solución fuera del baño de María, aludiendo a que la muestra cuando se desarrolle el perfil de disolución solo se va a encontrar por 60 minutos en el disolutor, e inyectarla 18 horas después de su preparación los datos obtenidos se muestran en el cuadro 20.

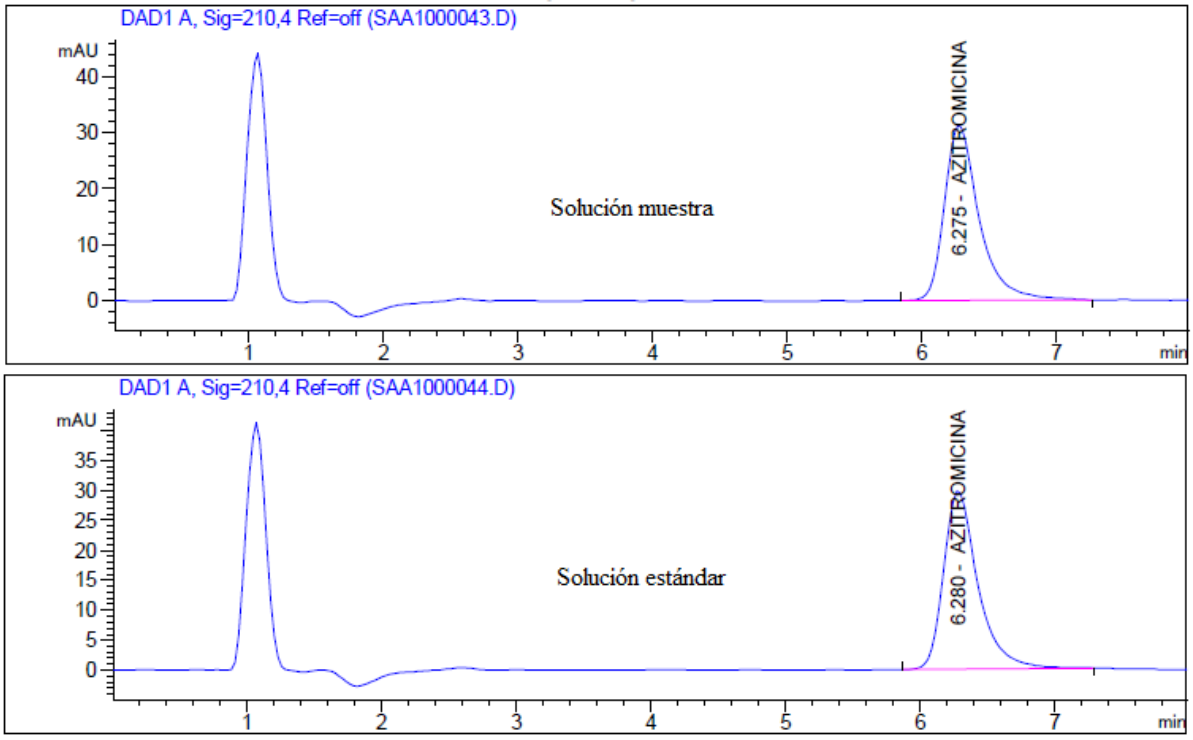
Cuadro 20. Lecturas de las soluciones de las muestras para la evaluación de la estabilidad del medio de disolución a pH 4.5

Soluciones muestra al 100%	Lectura posterior a su preparación	Lectura a los 20 minutos	Lectura a los 30 minutos	Lectura a los 60 minutos	Lectura 18 horas después
1	1133.6791	1134.1825	1136.2190	1135.2136	1137.5241
2	1145.1723	1141.3613	1146.3484	1143.2157	1141.7684
3	1163.3841	1165.5624	1160.2159	1162.4590	1164.2157

Fuente: elaboración propia.

Tras observar los datos obtenidos, se determina que la azitromicina no se disocia en el medio de disolución a pH 4.5; además, se corrobora que no se encuentra presente el segundo pico que apareció en la cromatografía del perfil de disolución a pH 1.2 (ver figura 24). Tras este comportamiento no se evalúa la estabilidad en el medio de disolución a pH 6.8 atribuido a que el compuesto es inestable en medios ácidos.

Figura 24. Cromatografía de las soluciones muestras para la evaluación de la estabilidad del medio de disolución a pH 4.5



Fuente: elaboración propia.

4.2 Validación del método analítico

Para la validación del método analítico se procedió según lo estipulado en el RTCA de Validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos[24], el cual clasifica las pruebas de desempeño en la categoría III, indicando que los parámetros a validar del

método analítico corresponden a la exactitud, precisión, especificidad y linealidad tanto del intervalo como del sistema.

Al tratarse de una validación de una prueba de perfiles de disolución comparativos, se debe considerar la evaluación del método desde un valor mínimo adecuado, porque las pruebas de disolución a los 10 minutos proporcionaron un valor aproximado de la cantidad mínima de principio activo que se podría disolver en el perfil de disolución. Sin embargo, al requerir la preparación de soluciones a cinco niveles de concentración y con la finalidad de evitar valores próximos, se considera realizar su evaluación desde el 33% hasta el 167%; de esta manera se determinaría el comportamiento del método analítico en todo este intervalo de trabajo, ya que lo se busca es que todos los posibles valores obtenidos se encuentren dentro del rango de la validación y que estos no sean muy cercanos. La prueba analítica para determinar el porcentaje de principio activo que se disuelve a los 10 minutos era necesaria, pues en caso de que se hubiese disuelto menos o cerca del 33%, se debe considerar bajar el rango de la validación.

Respecto al medio de disolución a pH 1.2, se prepararon las soluciones muestras y estándares a medida que se iban inyectando en el equipo, de esta manera no se originó el segundo compuesto que aparecía en la cromatografía; su preparación se facilitó al tratarse de alícuotas que debían adicionarse a la solución con excipientes. Con respecto a la solución estándar madre, al encontrarse disuelta en acetonitrilo, no presentó ningún problema de estabilidad.

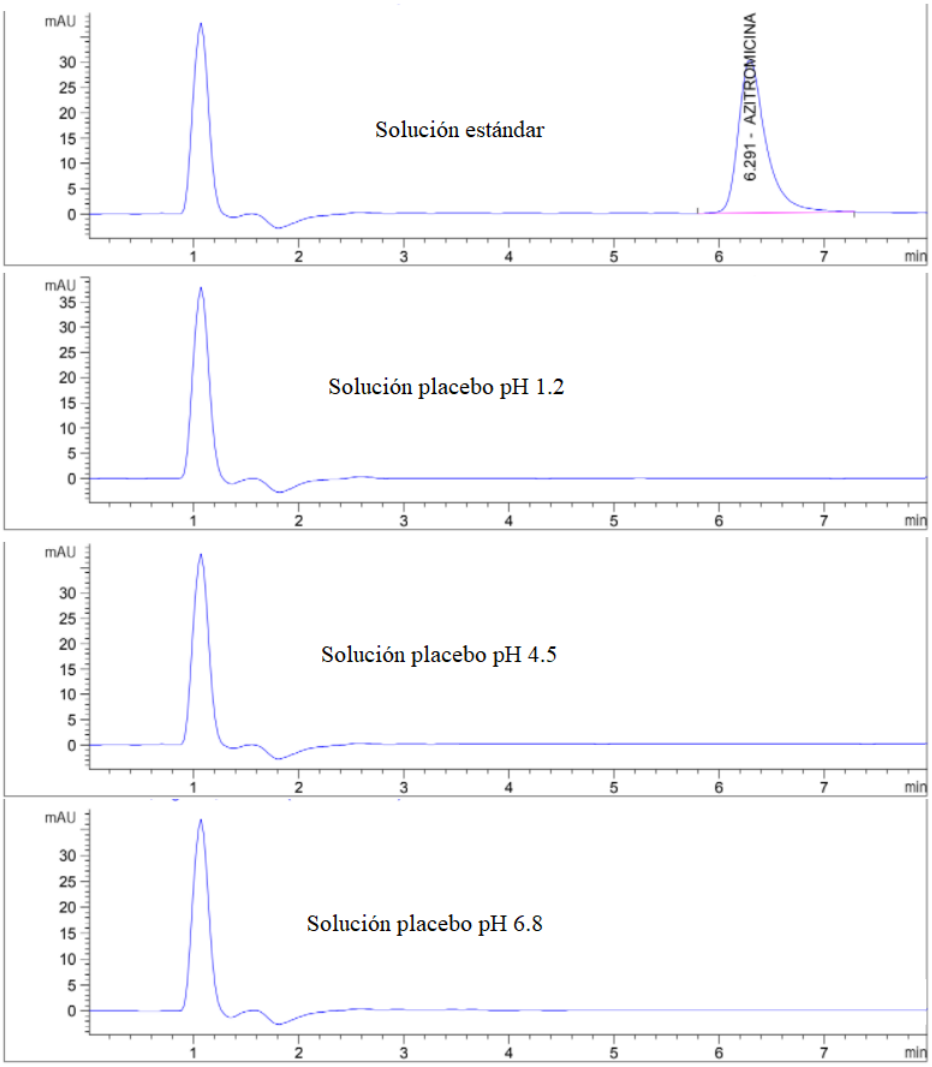
4.2.1 Evaluación de los parámetros de desempeño del perfil de disolución en los medios de disolución a pHs 1.2, 4.5 y 6.8

4.2.1.1 Especificidad

Se determinó la especificidad del método mediante la comparación del comportamiento de la matriz con respecto al comportamiento del estándar. Los resultados (ver figura 25) indican que

no se presentó ningún tipo de señal que interfiriera con la señal del estándar en las soluciones placebo, tras contrastar las tres soluciones placebo de cada medio de disolución contra el estándar al 100% (el estándar para los tres pHs presentó el mismo tiempo de retención); esto indica que el método es específico para la determinación del analito.

Figura 25. Determinación de la especificidad en los tres medios de disolución



Fuente: elaboración propia.

Además, se pueden emplear procedimientos analíticos adicionales para evaluar la especificidad; el cromatógrafo líquido de alta resolución con arreglo de diodos permite determinar la pureza espectral del pico de interés en la cromatografía. Por lo tanto, se evalúa la pureza de las soluciones muestras que se prepararon para la validación de los parámetros y los resultados indican que la curva de similitud y de umbral de pureza permiten demostrar que el compuesto de interés presenta una buena pureza en los tres medios de disolución.

4.2.1.2 Exactitud

Bajo la solicitud del departamento de control de calidad, se evaluó la exactitud del método mediante adición estándar con placebo; de esta manera no se tuvo que optar por solicitar más muestras de producto terminado, que posteriormente podrían ser utilizadas en su evaluación contra el medicamento de referencia en el perfil de disolución comparativo.

Se procede a determinar la exactitud del método al 33%, 100% y 167% de la concentración normal de trabajo. Los cuadros 21, 22 y 23 muestran los resultados obtenidos en los tres medios de disolución (pHs 1.2, 4.5 y 6.8) respectivamente, los cuales deben mostrar un porcentaje de recuperación superior o igual 98.0% y menor o igual a 102.0%, con un coeficiente de variación menor o igual a 2.0%, donde los tres pHs cumplen de manera satisfactoria con los criterios necesarios para la prueba.

Cuadro 21. Resultados de la prueba de exactitud en el medio de disolución a pH 1.2

Muestras	Recuperación promedio (%)	Coeficiente de variación (%)
33%	98.2	1.7
100%	100.4	0.9
167%	101.6	0.8

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 22. Resultados de la prueba de exactitud en el medio de disolución a pH 4.5

Muestras	Recuperación promedio (%)	Coeficiente de variación (%)
33%	99.3	1.5
100%	99.2	0.8
167%	98.8	0.5

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 23. Resultados de la prueba de exactitud en el medio de disolución a pH 6.8

Muestra	Recuperación promedio (%)	Coeficiente de variación (%)
33%	100.4	0.4
100%	99.7	0.4
167%	98.8	0.7

Fuente: elaboración propia.

Al graficar la cantidad recuperada contra la cantidad adicionada, se obtiene un coeficiente de correlación de 1.00 para los tres medios de disolución; además, se llevó a cabo una prueba t tanto para el intercepto como para la pendiente con un nivel de significancia de 0.05 (ver cuadro 24), con la finalidad de demostrar que el intercepto es de 0.00 y la pendiente de 1.00. Se considera que el último es estadísticamente igual a 1.00, pues el valor de $t_{experimental}$ es mayor al $t_{tabulado}$. En el caso del intercepto, se considera que es estadísticamente igual a 0.00, ya que el valor de $t_{experimental}$ es inferior al $t_{tabulado}$.

Cuadro 24. Prueba de t para la pendiente e intercepto

Prueba t para la pendiente		
pH 1.2	**pH 4.5**	**pH 6.8**
$t_{experimental}$: 154.344	$t_{experimental}$: 207.874	$t_{experimental}$: 206.882
Prueba t para el intercepto		
pH 1.2	**pH 4.5**	**pH 6.8**
$t_{experimental}$: -2.323	$t_{experimental}$: 0.605	$t_{experimental}$: 1.628
$t_{tabulado}$: 2.365		

Fuente: elaboración propia.

4.2.1.3 Precisión

La precisión se evaluó mediante la repetibilidad, la cual se determinó con los resultados de la exactitud; por lo tanto, al determinar el coeficiente de variación promedio de los tres niveles de concentración de los cuadros 24, 25 y 26, se obtiene un coeficiente de variación promedio de 1.8% para el pH a 1.2, 0.9% para el pH a 4.5 y 0.8 para el pH a 6.8 (ver cuadro 25). Según el MINSA[1], este parámetro debe ser menor a 2.0%; por consiguiente, se determina que el método es preciso en el intervalo de trabajo para el pH 1.2, 4.5 y 6.8.

Cuadro 25. Coeficiente de variación para la prueba de precisión en el medio de disolución a pH 1.2, 4.5 y 6.8

pH 1.2	pH 4.5	pH 6.8
1.8%	0.9%	0.8%

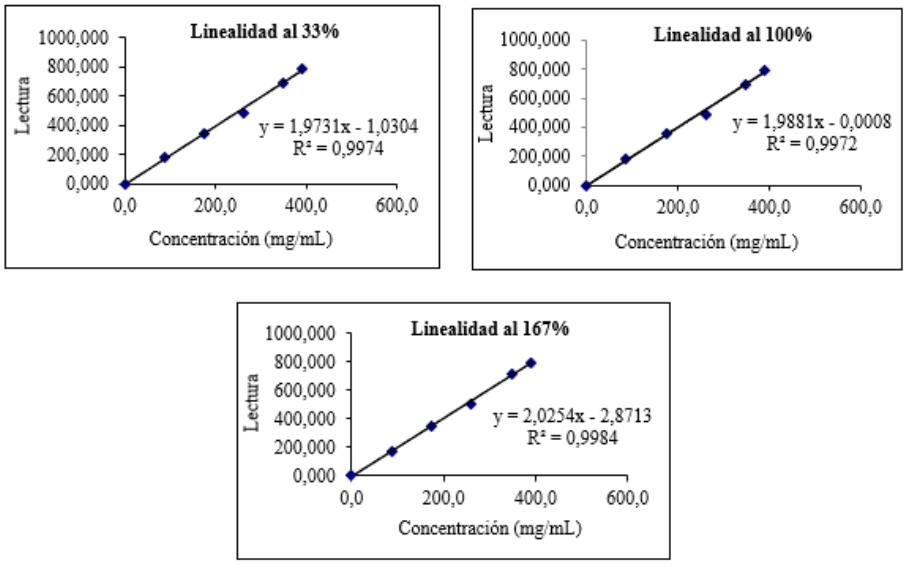
Fuente: elaboración propia.

4.2.1.4 Linealidad e intervalo

Se procedió a evaluar el comportamiento lineal del método y del sistema para el intervalo de trabajo en cada medio de disolución, mediante la elaboración de tres curvas de calibración independientes para la linealidad del sistema y tres más para la evaluación de la linealidad método. El cálculo del r debe encontrarse entre 0.98 y 1.00, los cuales fueron de 1.00 para todas las curvas de calibración, los que se pueden observar en la tabla 32.

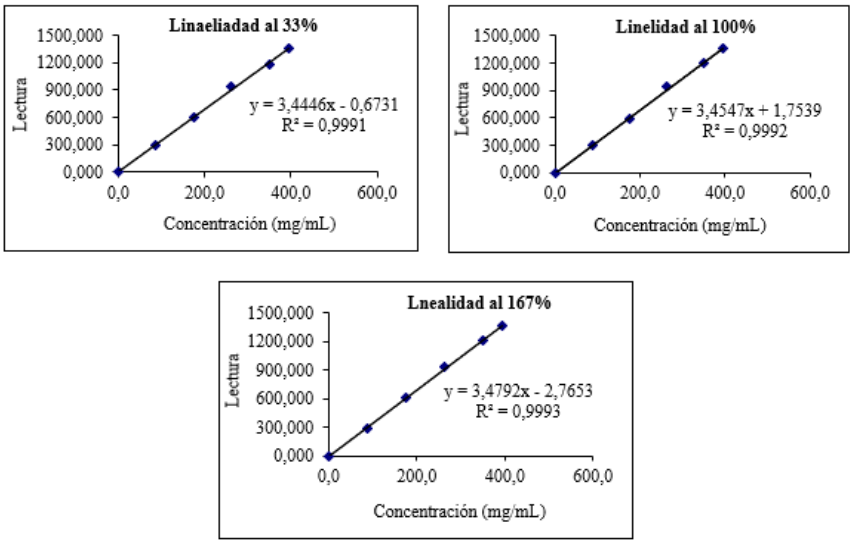
Además, de acuerdo con el MINSA[1], el coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.995 para cada una de las curvas de calibración de los tres medios de disolución. Las figuras 26 hasta la 31 muestran los resultados obtenidos, donde todas las curvas de calibración presentan un valor superior a 0.995, lo que indica que existe una buena correlación lineal entre la concentración y el área obtenida.

Figura 26. Curvas de calibración para evaluación de la linealidad del sistema en el medio de disolución a pH 1.2



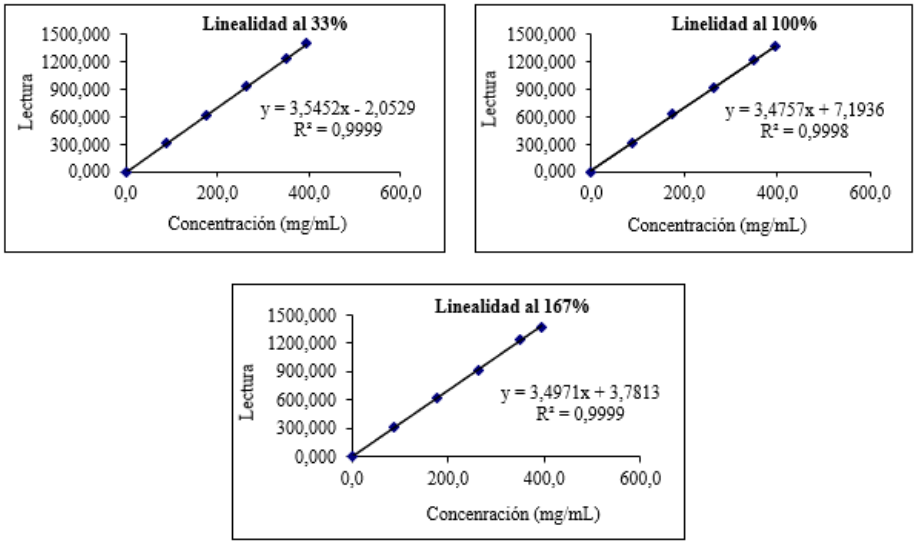
Fuente: elaboración propia.

Figura 27. Curvas de calibración para evaluación de la linealidad del sistema en el medio de disolución a pH 4.5



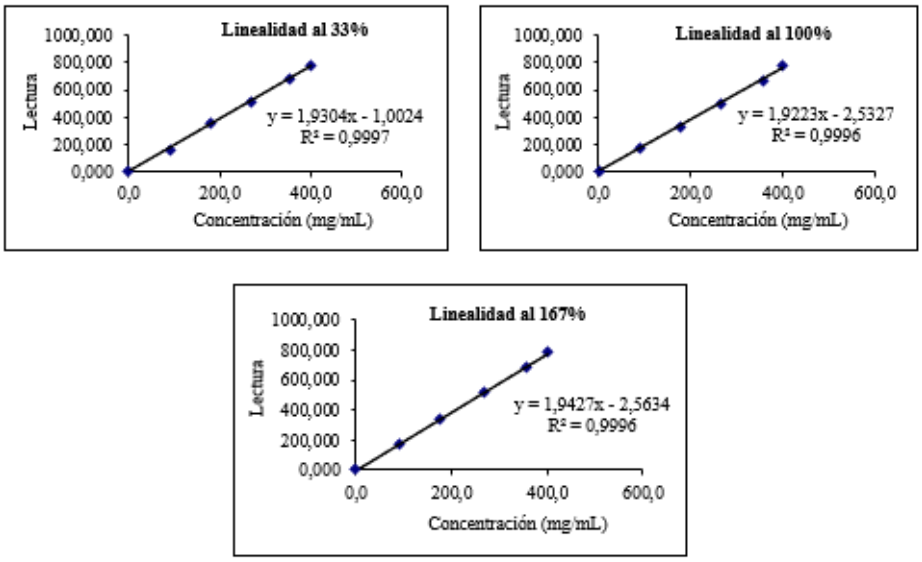
Fuente: elaboración propia.

Figura 28. Curvas de calibración para evaluación de la linealidad del sistema en el medio de disolución a pH 6.8



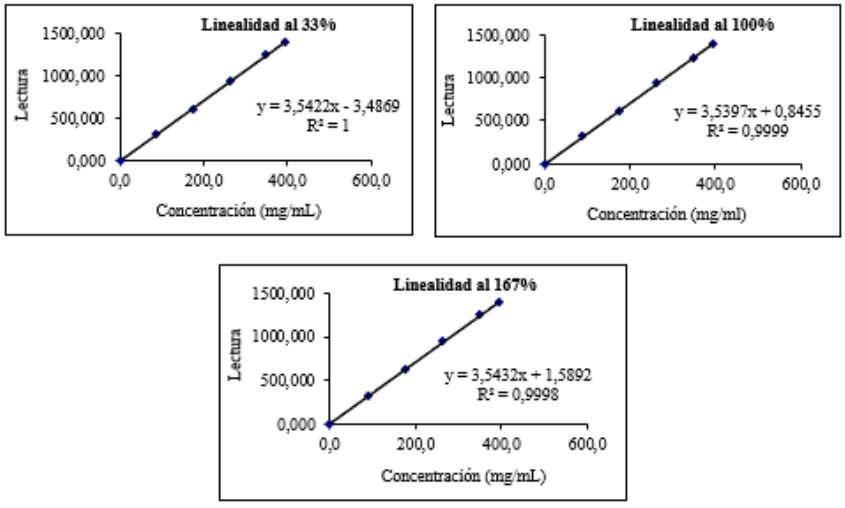
Fuente: elaboración propia.

Figura 29. Curvas de calibración para evaluación de la linealidad del método en el medio de disolución a pH 1.2



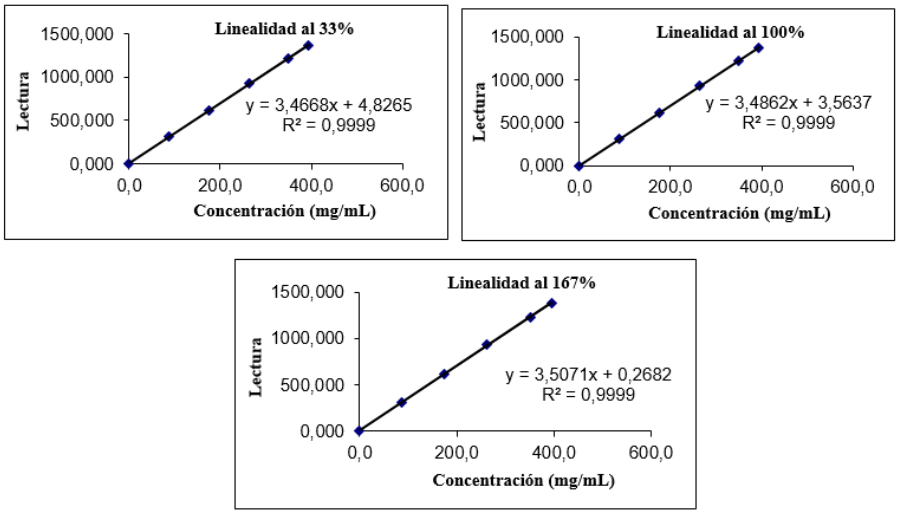
Fuente: elaboración propia.

Figura 30. Curvas de calibración para evaluación de la linealidad del método en el medio de disolución a pH 4.5



Fuente: elaboración propia.

Figura 31. Curvas de calibración para evaluación de la linealidad del método en el medio de disolución a pH 6.8



Fuente: elaboración propia.

Además, se llevó a cabo un análisis de varianza de la regresión lineal, tanto para la linealidad del método como para la linealidad del sistema para los tres medios de disolución mediante la prueba F, en la que los valores de $F_{crítico}$ deben ser menores a 0.05 para un intervalo de confianza de 95%. Los datos obtenidos (observar el cuadro 26) muestran que el $F_{crítico}$ para los tres medios de disolución presentan un valor inferior al parámetro de comparación, por lo cual se determina que no existe desviación estadísticamente significativa respecto a la regresión lineal.

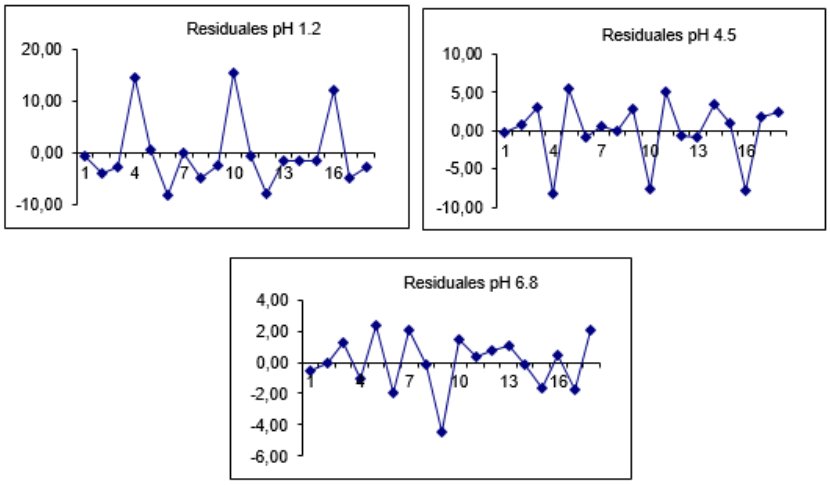
Cuadro 26. Prueba F para el análisis de varianza de la regresión lineal

Medio de disolución pH 1.2	
Linealidad del sistema	Linealidad del método
$F_{crítico}$: 1.96E-16	$F_{crítico}$: 1.19E-21
Medio de disolución pH 4.5	
Linealidad del sistema	Linealidad del método
$F_{crítico}$: 1.34E-19	$F_{crítico}$: 4.51E-25
Medio de disolución pH 6.8	
Linealidad del sistema	Linealidad del método
$F_{crítico}$: 2.25E-23	$F_{crítico}$: 1.91E-25

Fuente: elaboración propia.

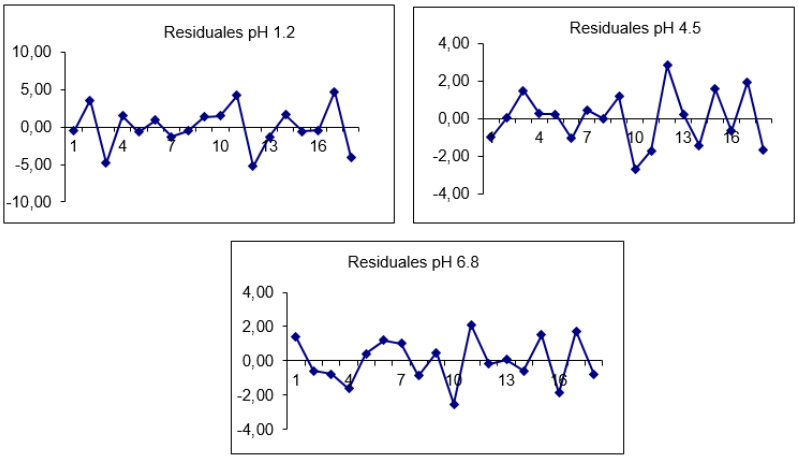
La guía de validación de métodos analíticos del MINSA[1] también indica que se debe cumplir con una distribución aleatoria de los residuos, ya que ante tendencias sistemáticas no existe linealidad. Los resultados obtenidos, que se resumen en el cuadro 29, muestran que el cálculo de los residuos es de 0; es por ello que no existen tendencias sistemáticas. Por lo tanto, se permite demostrar homocedasticidad, y las figuras 32 (residuos de linealidad del sistema) y 33 (residuos de linealidad del método) permiten demostrar su distribución, donde se aprecia que la varianza de los valores se comporta de manera aleatoria.

Figura 32. Distribución de los residuos para la linealidad del sistema



Fuente: elaboración propia.

Figura 33. Distribución de los residuos para la linealidad del método



Fuente: elaboración propia.

Además, mediante una prueba t se determina que la pendiente es estadísticamente igual a uno, debido a que el $t_{experimental}$ es mayor al $t_{tabulado}$ (con un $t_{tabulado}$ de 2.160) para un nivel de significancia de 0.05, esto para los tres medios de disolución tanto en la linealidad del método

como en la linealidad del sistema, lo que permite demostrar que existe una relación lineal entre las variables. Los datos se pueden observar en el cuadro 27.

Cuadro 27. Prueba de t para la pendiente

Medio de disolución pH 1.2	
Linealidad del sistema	Linealidad del método
$t_{experimental}$: 51.663	$t_{experimental}$: 130.425
Medio de disolución pH 4.5	
Linealidad del sistema	Linealidad del método
$t_{experimental}$: 90.657	$t_{experimental}$: 239.150
Medio de disolución pH 6.8	
Linealidad del sistema	Linealidad del método
$t_{experimental}$: 177.011	$t_{experimental}$: 255.534

Fuente: elaboración propia.

Con respecto al intercepto, se considera que el mismo es estadísticamente igual a cero, esto porque el valor de $t_{experimental}$ es inferior al $t_{tabulado}$ (con un $t_{tabulado}$ de 2.160) para los tres medios de disolución, tanto en la linealidad del método como en la del sistema, con un nivel de significancia de 0.05. Los resultados se pueden observar en el cuadro 28.

Cuadro 28. Prueba de t para el intercepto.

Medio de disolución pH 1.2	
Linealidad del sistema	Linealidad del método
$t_{experimental}$: -0.271	$t_{experimental}$: -1.079
Medio de disolución pH 4.5	
Linealidad del sistema	Linealidad del método
$t_{experimental}$: -0.118	$t_{experimental}$: -0.190
Medio de disolución pH 6.8	

Linealidad del sistema	Linealidad del método
$t_{experimental}$: 1.207	$t_{experimental}$: 1.701

Fuente: elaboración propia.

Por eso, ante la evaluación de los criterios para la determinación de linealidad del método y del sistema y el cumplimiento de ellos, se demuestra que existe linealidad tanto del método como del sistema en todo el intervalo de trabajo establecido, el cual abarca desde el 33% hasta el 167% de la concentración normal de trabajo.

Cuadro 29. Resultados de la validación del método analítico para los medios de disolución a pHs 1.2, 4.5 y 6.8

Parámetro	**Criterio de aceptación**	**Resultado**		
		pH 1.2	**pH 4.5**	**pH 6.8**
Especificidad	No se presenta ninguna interferencia	$\overline{X}$ = 0.0%	$\overline{X}$ = 0.0%	$\overline{X}$ = 0.0%
Linealidad e intervalo del sistema	$0.98 \leq r \leq 1.00$	Curva 1: 1.00	Curva 1: 1.00	Curva 1: 1.00
		Curva 2: 1.00	Curva 2: 1.00	Curva 2: 1.00
		Curva 3: 1.00	Curva 3: 1.00	Curva 3: 1.00
	$r^2 \geq 0.995$	Curva 1: 0.997	Curva 1: 0.999	Curva 1: 1.000
		Curva 2: 0.997	Curva 2: 0.999	Curva 2: 1.000
		Curva 3: 0.998	Curva 3: 0.999	Curva 3: 1.000
	Residuales: 0	0	0	0
	Prueba F $F_{crítico} \leq 0.05$	$F_{crítico}$: 1.96E-16	$F_{crítico}$: 1.34E-19	$F_{crítico}$: 2.25E-23
	Prueba t para la pendiente $t_{experimental} > 2.160$	$t_{experimental}$: 51.663	$t_{experimental}$: 90.657	$t_{experimental}$: 77.011

	Prueba t para el intercepto $t_{experimental} < 2.160$	$t_{experimental}$: -0.271	$t_{experimental}$: -0.118	$t_{experimental}$: 1.207
Linealidad e intervalo del método	$0.98 \leq r \leq 1.00$	Curva 1: 1.00	Curva 1: 1.00	Curva 1: 1.00
		Curva 2: 1.00	Curva 2: 1.00	Curva 2: 1.00
		Curva 3: 1.00	Curva 3: 1.00	Curva 3: 1.00
	$r^2 \geq 0.995$	Curva 1: 1.000	Curva 1: 1.000	Curva 1: 1.000
		Curva 2: 1.000	Curva 2: 1.000	Curva 2: 1.000
		Curva 3: 1.000	Curva 3: 1.000	Curva 3: 1.000
	Residuales: 0	0	0	0
	Prueba F $F_{crítico} \leq 0.05$	$F_{crítico}$: 1.19E-21	$F_{crítico}$: 4.51E-25	$F_{crítico}$: 1.91E-25
	Prueba t para la pendiente $t_{experimental} > 2.160$	$t_{experimental}$: 130.425	$t_{experimental}$: 239.150	$t_{experimental}$: 255.533
	Prueba t para el intercepto $t_{experimental} < 2.160$	$t_{experimental}$: -1.079	$t_{experimental}$: -0.190	$t_{experimental}$: 1.701
Exactitud	Recuperación: 98.0% $\leq \overline{X} \leq$ 102.0%	$\overline{X}$ 33%: 98.2%	$\overline{X}$ 33%: 99.3%	$\overline{X}$ 33%: 100.4%
		$\overline{X}$ 100%: 100.4%	$\overline{X}$ 100%: 99.2%	$\overline{X}$ 100%: 99.7%
		$\overline{X}$ 167%: 101.6%	$\overline{X}$ 167%: 98.8%	$\overline{X}$ 167%: 98.8%
	El coeficiente de variación: $\overline{X} \leq 2.0\%$	$\overline{X}$ 33%: 1.7%	$\overline{X}$ 33%: 1.5%	$\overline{X}$ 33%: 0.4%
		$\overline{X}$ 100%: 0.9%	$\overline{X}$ 100%: 0.8%	$\overline{X}$ 100%: 0.4%
		$\overline{X}$ 167%: 0.8%	$\overline{X}$ 167%: 0.5%	$\overline{X}$ 167%: 0.7%
	$0.98 \leq r \leq 1.00$	Curva 1: 1.00	Curva 1: 1.00	Curva 1: 1.00
		Curva 2: 1.00	Curva 2: 1.00	Curva 2: 1.00
		Curva 3: 1.00	Curva 3: 1.00	Curva 3: 1.00
	Prueba t para la pendiente $t_{experimental} > 2.365$	$t_{experimental}$: 154.344	$t_{experimental}$: 207.874	$t_{experimental}$: 206.882

	Prueba t para el intercepto $t_{experimental} < 2.365$	$t_{experimental}$: -2.323	$t_{experimental}$:0.605	$t_{experimental}$: 1.628
Precisión	El coeficiente de variación: $\overline{X} \leq 2.0\%$	$\overline{X}$: 1.8%	$\overline{X}$: 0.9%	$\overline{X}$: 0.8%

Fuente: elaboración propia.

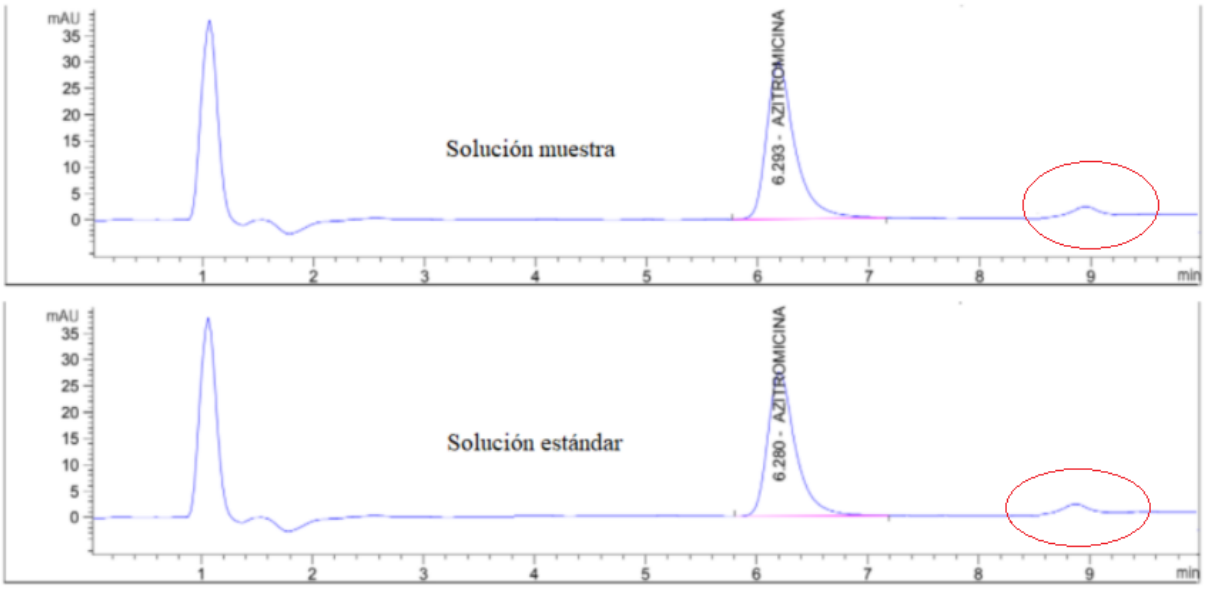
4.3 Comprobación de la metodología del perfil de disolución comparativo

Con el objetivo de reproducir la metodología analítica validada del perfil de disolución comparativo en las condiciones normales de trabajo, se procedió a desarrollar el análisis de este, empleando tabletas recubiertas de Zithromax® 500mg en las soluciones amortiguadoras a pHs 1.2, 4.5 y 6.8. Se tomaron muestras de 10mL en cada tiempo de muestreo, que posteriormente se repusieron con el medio de disolución correspondiente para cada uno de los pHs.

4.3.1 Comprobación de la metodología del perfil de disolución comparativo en el medio de disolución a pH 1.2

Respecto al perfil de disolución a pH 1.2, la disociación del pico de interés en la cromatografía no permitió la cuantificación de él (ver figura 34), ya que el método analítico validado demuestra obtener datos fiables en condiciones de trabajo que no son aptas ni reproducibles para el perfil de disolución a pH1.2. El contraste de la validación del método analítico y del perfil de disolución permiten demostrar que la influencia de los factores asociados al desarrollo de la prueba no permite la elaboración de esta, porque la manera en que se prepara una validación para una prueba de desempeño no corresponde a la manera en que se realiza el análisis del perfil de disolución.

Figura 34. Disociación de la azitromicina en el medio de disolución a pH 1.2



Fuente: elaboración propia.

Por lo tanto, no se puede considerar que el cumplimiento de las pruebas de la guía de validación del MINSA proporcionará un método analítico validado para la prueba de interés, debido a que las características que debe tener todo método analítico validado es asegurar un procedimiento que proporcione resultados reproducibles y confiables, adecuados para el propósito de la prueba analítica[113]. Conforme a esto, el MINSA[1] aclara, en la guía de validación de métodos analíticos, que una validación corresponde a una confirmación por recopilación y análisis de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para el uso específico propuesto.

Dicha validación para el perfil de disolución comparativo eventualmente proporcionará datos confiables bajo las condiciones en que fue elaborada, no así para el desarrollo del perfil de disolución; en otras palabras, no cumple con el propósito para el cual fue diseñado. Además, este medicamento no podrá contar con una metodología analítica apta (validada) para su análisis en el medio de disolución a pH 1.2, atribuido a características inherentes del principio activo.

La degradación de la azitromicina deja en evidencia que su disociación es dependiente del tiempo de exposición en el medio ácido, ya que, según las pruebas anteriormente realizadas, una solución muestra o estándar con menos de 20 minutos en dicho medio, no experimentará una disociación. Caso contrario sucedió en las soluciones que no se inyectaron de manera inmediata posterior a su preparación, y es por ello que las soluciones elaboradas en la validación no presentaron disociación, a diferencia de las muestras del perfil de disolución (prueba analítica donde las muestras no se pueden elaborar de manera inmediata para su inyección en el equipo).

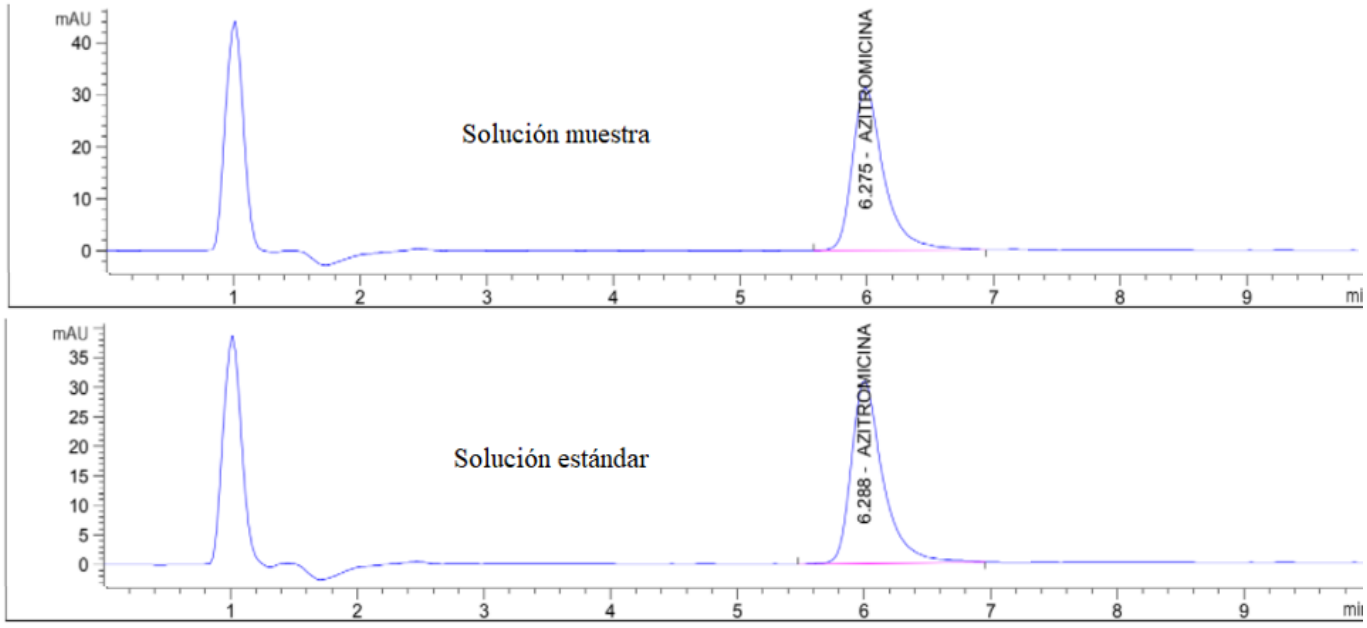
Los resultados cromatográficos demuestran que las soluciones muestras del perfil de disolución a pH 1.2 presentaron el segundo pico indicativo de una disociación de la molécula, situación que es de esperar; considerando la temperatura a la que se encontraban sometidas las muestras, el disolutor debe simular las condiciones humanas. Por lo tanto, se encuentra a 37.0 ± 0.5° C; la temperatura a la cual se preparó la validación fue de 20.0 °C, y al ser la temperatura un factor que permite acelerar la descomposición de los compuestos[118], presenta influencia en la degradación de la azitromicina.

Tras la adaptación del método analítico para el perfil de disolución comparativo, se elabora el procedimiento de este en el Laboratorio Farmacéutico Nacional, para su posterior ejecución.

4.3.2 Comprobación de la metodología del perfil de disolución comparativo en el medio de disolución a pH 4.5

La cromatografía del perfil de disolución en la solución amortiguadora a pH 4.5 se comporta de manera estable (ver figura 35). Sin problemas asociados a la cuantificación del analito, el cromatograma muestra que la solución estándar corresponde al mismo tiempo de retención respecto al pico de la solución muestra.

Figura 35. Cromatograma del perfil de disolución a pH 4.5



Fuente: elaboración propia.

Los resultados indican que las tabletas recubiertas de Zithromax de 500mg se disuelven de manera rápida en este medio de disolución (ver cuadro 30), ya que su promedio a los 10 minutos corresponde a un 87% y su comparación con el resto de los tiempos de muestreo proporciona datos similares, los cuales exhibieron una leve tendencia al alza conforme estuvieron más tiempo en el disolutor. Además, los resultados promedios entre las muestras de los mismos tiempos de muestreo reflejan un porcentaje de disolución muy similar.

Cuadro 30. Primer perfil de disolución de Zithromax® tabletas recubiertas de 500mg en la solución amortiguadora a pH 4.5

Muestras		Tiempo					
Número	**Peso (g)**	**10 min (%)**	**15 min (%)**	**20 min (%)**	**30 min (%)**	**45 min (%)**	**60min (%)**
1	0.9195	90	91	92	93	93	92
2	0.9191	81	84	87	88	89	90
3	0.9161	89	91	92	91	92	93
4	0.9140	85	86	87	88	89	90
5	0.9179	88	90	91	91	92	92
6	0.9263	90	91	91	92	93	92
Promedio		87	89	90	91	91	92
Máximo		90	91	92	93	93	93
Mínimo		81	84	87	88	89	90

Fuente: elaboración propia.

Se elaboró un segundo perfil de disolución en el mismo medio, con la finalidad de que el Laboratorio Farmacéutico Nacional solo deba realizar los perfiles de disolución del medicamento que fabrican, y de esta manera puedan comparar su formulación contra el medicamento de referencia, ya que, según el MINSA[2], en su "Guía técnica para la presentación y evaluación de los estudios de perfiles de disolución comparativos", indica que se deben analizar 12 unidades de cada uno de los medicamentos.

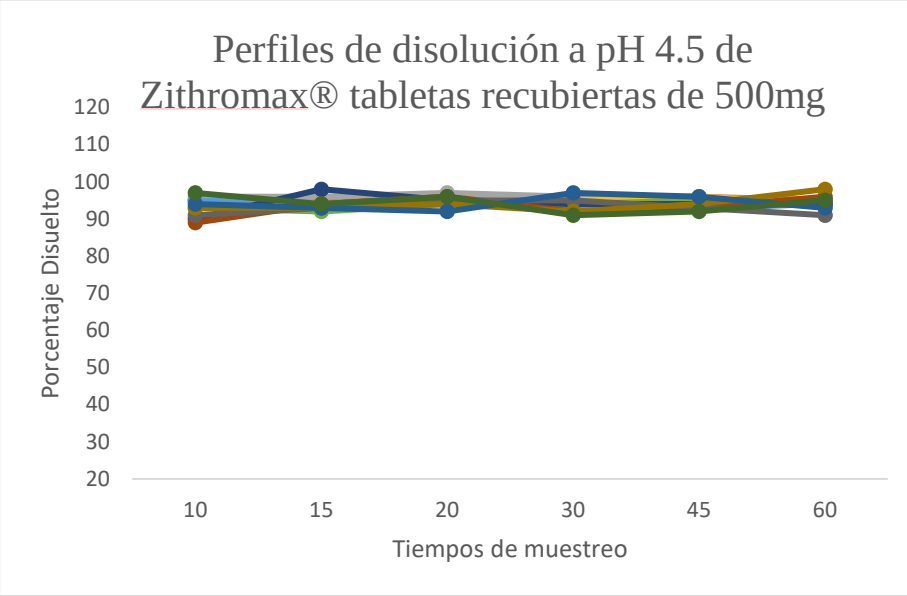
Cuadro 31. Segundo perfil de disolución de Zithromax® tabletas recubiertas de 500mg en la solución amortiguadora a pH 4.5

Muestras		Tiempo					
Número	**Peso (g)**	**10 min (%)**	**15 min (%)**	**20 min (%)**	**30 min (%)**	**45 min (%)**	**60min (%)**
1	0,9222	87	87	89	89	90	92
2	0,9229	90	90	94	93	92	94
3	0,9234	88	88	91	92	93	91
4	0,9363	86	86	91	90	89	90
5	0,9148	90	90	92	94	95	94
6	0,9470	85	85	90	92	91	92
Promedio		86	88	88	92	92	92
Máximo		90	90	90	94	95	94
Mínimo		81	85	85	89	89	90

Fuente: elaboración propia.

Con respecto al segundo perfil de disolución, el cuadro 31 muestra que se comporta de manera similar al primer perfil a pH 4.5. Todas las muestras mostraron un comportamiento similar al compararlas de manera individual con los mismos tiempos de muestreo, donde desde el minuto 10 se aprecia que las tabletas recubiertas de Zithromax® 500mg se disuelven de manera rápida. Sin embargo, el porcentaje promedio de principio activo se disuelve en su totalidad hasta los 30 minutos, con un promedio de 92%, al igual que el primer perfil de disolución a este pH. El siguiente gráfico, muestra los datos del comportamiento de las dos disoluciones.

Gráfico 1. Perfiles de disolución a pH 4.5 para Zithromax® tabletas recubiertas de 500mg

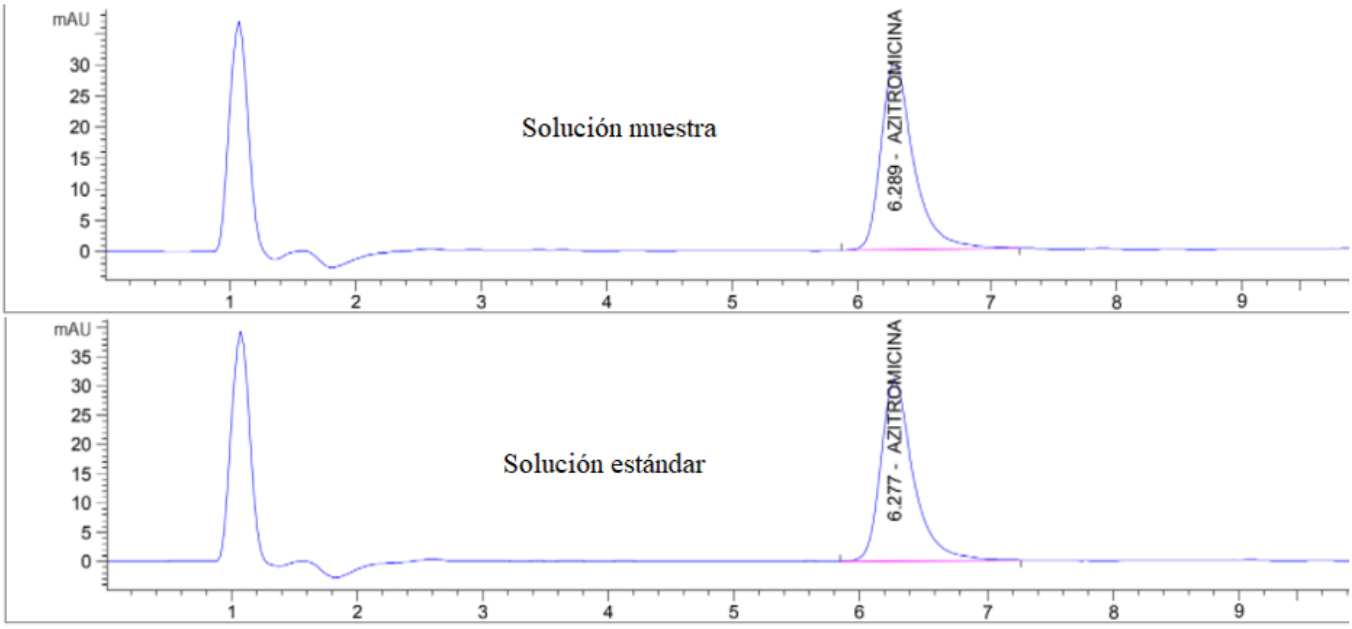


Fuente: elaboración propia.

4.3.3 Comprobación de la metodología del perfil de disolución comparativo en el medio de disolución a pH 6.8

La cromatografía del perfil de disolución a pH 6.8 exhibe un comportamiento estable y proporciona datos reproducibles (ver figura 36); de acuerdo con Fiese et al.[68], la azitromicina presenta mayor estabilidad a mayores pHs, permitiendo así una adecuada cuantificación del compuesto. Los resultados en el cuadro 32 indican que el primer perfil de disolución a pH 6.8 se disuelve de manera rápida, ya que al transcurrir 10 minutos las tabletas recubiertas de Zithromax® 500mg se disuelven en su totalidad, esto debido a que en la prueba analítica se obtuvo en dicho tiempo un promedio de 96% y, al contrastarlo con la valoración que fue en promedio un 94.9%, se determina que se disuelve la totalidad del principio activo de la forma de dosificación desde el primer tiempo de muestreo.

Figura 36. Cromatograma del perfil de disolución a pH 6.8



Fuente: elaboración propia.

Cuadro 32. Primer perfil de disolución de Zithromax® tabletas recubiertas de 500mg en la solución amortiguadora a pH 6.8

Muestras		Tiempo					
Número	**Peso (g)**	**10 min (%)**	**15 min (%)**	**20 min (%)**	**30 min (%)**	**45 min (%)**	**60 min (%)**
1	0.9199	95	94	94	95	93	94
2	0.9125	95	95	96	93	96	95
3	0.9340	96	96	97	96	96	94
4	0.9100	95	94	95	95	96	94
5	0.9313	95	94	95	94	93	95
6	0.9209	93	92	94	94	95	94

Promedio	95	94	95	95	95	94
Máximo	96	96	97	96	96	95
Mínimo	93	92	94	93	93	94

Fuente: elaboración propia.

Para el segundo perfil de disolución a pH 6.8 (ver cuadro 33), se observan resultados promedios de los tiempos de muestreo similares respecto al primer perfil. Sin embargo, en promedio se disuelve en su totalidad hasta los 60 minutos, donde la diferencia desde el minuto 10 hasta el 60 es de un 3% en promedio, lo que indicaría que la mayor cantidad de principio activo se disolvió desde los 10 minutos, con la finalidad de observar los datos obtenidos en las dos disoluciones se adjunta el gráfico 2.

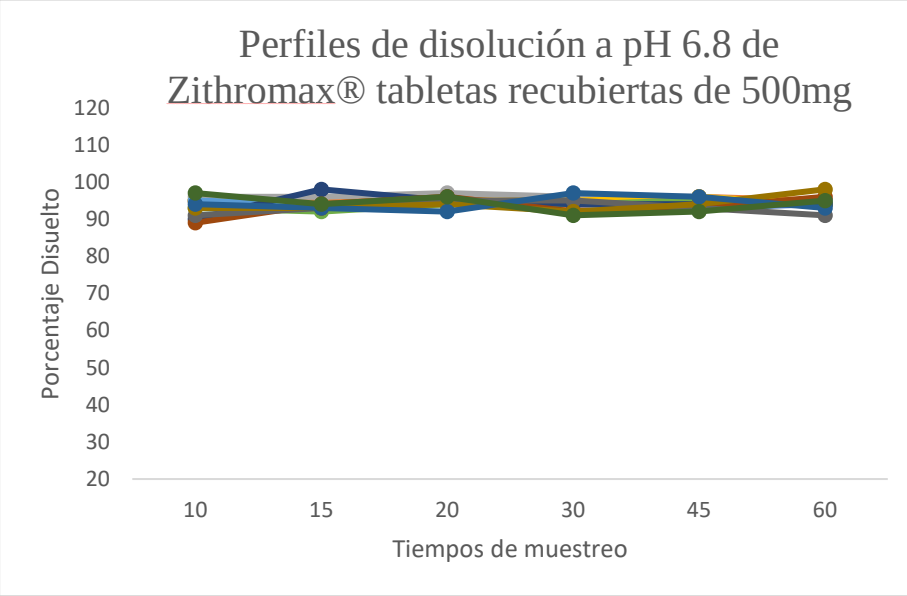
Cuadro 33. Segundo perfil de disolución de Zithromax® tabletas recubiertas de 500mg en la solución amortiguadora a pH 6.8

Muestras		**Tiempo**					
Número	**Peso (g)**	**10 min (%)**	**15 min (%)**	**20 min (%)**	**30 min (%)**	**45 min (%)**	**60min (%)**
1	0.9112	90	98	95	94	94	94
2	0.9230	89	94	96	92	93	96
3	0.9132	91	93	95	95	93	91
4	0.9124	93	93	94	92	94	98
5	0.9174	94	93	92	97	96	93
6	0.9140	97	94	96	91	92	95
Promedio		92	94	94	94	94	95

Máximo	97	98	96	97	96	98
Mínimo	89	93	92	91	92	91

Fuente: elaboración propia.

Gráfico 2. Perfiles de disolución a pH 6.8 para Zithromax® tabletas recubiertas de 500mg



Fuente: elaboración propia.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

La adaptación del método analítico interno, empleado en el Laboratorio Farmacéutico Nacional para la prueba de disolución, permitió el desarrollo de una metodología para un perfil de disolución comparativo de azitromicina tabletas recubiertas de 500mg en los medios de disolución a pH 4.5 y 6.8, lo que permitirá la evaluación de la formulación del medicamento genérico contra el medicamento de referencia en el país.

Las pruebas preliminares permitieron determinar la degradación del principio activo en el medio de disolución a pH 1.2 a una temperatura de 37.0° C, lo que no permitió el desarrollo de una metodología analítica para el desarrollo de un perfil de disolución comparativo.

La validación del método analítico, para el desarrollo del perfil de disolución de azitromicina tabletas recubiertas de 500mg, demostró de manera documental el cumplimiento de las características de desempeño estipuladas por parte del MINSA en el medio de disolución a pH 4.5 y 6.8, no así para el pH 1.2, al no proporcionar resultados confiables para el propósito de la prueba analítica.

Se comprobó el uso de la metodología analítica validada para el perfil de disolución con el medicamento de referencia en el país para los medios de disolución a pH 4.5 y 6.8; al exhibir un adecuado porcentaje de principio activo disuelto y al no presentar la disociación del compuesto de interés, este corroboró que el método perfil de disolución a pH 1.2 no mostraba datos válidos.

La prueba del perfil de disolución de las tabletas recubiertas de Zithromax de 500mg permitió demostrar que ellas se disuelven de manera rápida en el medio de disolución a pH 4.5 y

6.8, a pesar se clasificarse en la clase II del SCB. Además, la prueba de solubilidad a la materia prima permitió demostrar que esta es libremente soluble en los tres medios de disolución.

El desarrollo y la validación del método analítico para el perfil de disolución comparativo corresponden a documentación esencial para la renovación del registro sanitario del medicamento, al ser pruebas a solicitar por parte del MINSA.

Recomendaciones

Al Laboratorio Farmacéutico Nacional

Al departamento de control de calidad, para llevar a cabo la evaluación de su formulación, realizar la prueba de valoración de un lote de muestras de retención de tabletas recubiertas de azitromicina de 500mg que fabrican, con la finalidad de tomar un lote que no vaya a diferir en más de un 5% respecto a la valoración realizada de Zithromax® tabletas recubiertas de 500mg, ya que, de acuerdo con el instructivo para presentar el dossier de bioequivalencia, la potencia no debe diferir en más o menos de 5% con respecto al medicamento de referencia, esto con la finalidad de utilizar los análisis del perfiles de disolución a pH 4.5 y 6.8 desarrollados para la comprobación de la validación.

Al departamento de control de calidad, demostrar documentalmente ante el MINSA la inestabilidad del principio activo en el medio de disolución a pH 1.2, por medio de las pruebas analíticas realizadas y referencias bibliográficas que justifiquen la no presentación de la validación y del perfil de disolución comparativo, o en caso necesario, la utilización de la justificación bibliográfica planteada en la presente tesis.

A la dirección técnica, promover la realización de perfiles de disolución comparativos, con la finalidad de evaluar su formulación, y/o en caso necesario, según su margen terapéutico, estudios

in vivo para demostrar su uso alternativo con respecto al medicamento de referencia, o de ser necesario llevar a cabo procesos de reformulación.

A la Universidad Internacional de las Américas

Implementar validaciones y pruebas de perfiles de disolución comparativos en los laboratorios de la universidad, para familiarizar a los estudiantes con su desarrollo, las cuales permitirán promover el conocimiento respecto a las guías de validación y de los perfiles de disolución comparativos, tanto del MINSA como de la regulación internacional, ya que es un ámbito en el que un profesional en Farmacia podría desempeñarse.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ministerio de Salud de Costa Rica. [Internet]. San José: El Ministerio; 2021 [consultado el 21 de setiembre del 2021]. Guía de Validación de Métodos Analíticos; 1-18. Disponible en: https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/biblioteca-de-archivos/tramites/registro-de-productos-de-interes-sanitario/medicamentos-1/documentos-de-interes-3/guias-de-registro-medicamentos/2472-guia-de-validacion-de-metodos-analiticos/file

2. Ministerio de Salud de Costa Rica. [Internet]. San José: El Ministerio; 2009 [consultado el 22 de setiembre del 2021]. Guía técnica para la presentación y evaluación de los estudios de perfiles de disolución comparativos; 1-6. Disponible en: https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/biblioteca-de-archivos/regulacion-de-la-salud/bioequivalencia/guias-oficiales/2173-guia-tecnica-para-la-presentacion-y-evaluacion-de-los-estudios-de-perfiles-de-disolucion-comparativos/file

3. Ministerio de Salud de Costa Rica. [Internet]. San José: El Ministerio; 2021 [consultado el 19 de setiembre del 2021]. Equivalencia terapéutica; 1-31. Disponible en: https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/biblioteca-de-archivos/regulacion-de-la-salud/bioequivalencia/listados-oficiales/5260-listado-de-productos-de-referencia-ministerio-de-salud-julio-2021/file.

4. Arora S, Sharma P, Irchhaiya R, Khatkar A, Singh N, Gagoria J. Development, characterization and solubility study of solid dispersions of azithromycin dihydrate by solvent evaporation method. J. Adv. Pharm. Tech. Res. [Internet]. 2010 [citado el 19 de setiembre del 2021]; 1(2):221-228. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3255436/.

5. Superintendencia de Industria y Comercio del Gobierno de Colombia. [Internet]. Colombia: La superintendencia. 2020 [consultado el 21 de setiembre del 2021]. Reporte Tecnológico COVID-19 Medicamentos-Azitromicina. 1-10. Disponible en:

https://www.sic.gov.co/sites/default/files/files/2020/Pagina%20PI/RT%204%20Medicamentos%20-%20Azitromicina.pdf

6. Jung H, Anda G, Rubio K, Mayet L. Comparación de perfiles de disolución. Impacto de los criterios de diferentes agencias regulatorias en el cálculo de f 2. Rev Mex Cienc Farm. [Internet]. 2012 [citado el 25 de setiembre del 2021]; 43(3):67-71. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v43n3/v43n3a7.pdf

7. Zavaleta A, Salaz C. Bioequivalencia de medicamentos in vivo e in vitro (bioexención). Rev. Diagnóstico. [Internet]. 2016 [citado el 19 de setiembre del 2021]; 55(1):17-27. Disponible en: http://repebis.upch.edu.pe/articulos/diag/v55n1/a4.pdf.

8. Segura Campos L. Medicamentos genéricos: su importancia económica en los sistemas públicos de salud y la necesidad de estudios in vitro para establecer su bioequivalencia. Revista Pensamiento Actual. [Internet]. 2017 [citado el 25 de setiembre del 2021]; 17(28):108-120. Disponible en: https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/pensamiento-actual/article/view/29549/29649.

9. Pereira Vega Z. Oferta y demanda de estudios de equivalencia terapéutica (in vitro e in vivo) de medicamentos en Costa Rica. Tecnol. Marcha. [Internet]. 2015 [citado el 23 de setiembre del 2021]; 20(1):18-27. Disponible en: https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/2535/2324.

10. Fraile Acevedo D. Modelo para análisis y valoración financiera, de compra de farmacias en el sector farmacéutico costarricense para una cadena retail. [Tesis de maestría en Administración y dirección de empresas]. San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica; 2016.

11. Poder Ejecutivo. Procuraduría General de la República. [Internet]. San José, Costa Rica: Poder Ejecutivo; 2011 [consultado el 19 de setiembre del 2021]. Reglamento para el Registro sanitario de medicamentos que requieren demostrar la equivalencia terapéutica.

Solicitud; [16 pantallas aprox]. Disponible en: https://www.imprentanacional.go.cr/pub/2021/09/30/COMP_30_ 09_2021.pdf.

12. Poder Ejecutivo. Procuraduría General de la República. [Internet]. San José, Costa Rica: Poder Ejecutivo; 2016 [consultado el 19 de setiembre del 2021]. Reglamento para el Registro sanitario de los medicamentos que requieren demostrar equivalencia terapéutica; [26 pantallas aprox]. Disponible en: http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?nValor1=1&nValor2=55246

13. Rojas Aránguiz M. Validación de método analítico para test de disolución con objetivo de realizar estudio de bioexención de levofloxacino comprimidos recubiertos de 500 y 750mg. [Tesis de pregrado en Química Farmacéutica]. Santiago, Chile: Universidad de Chile; 2015.

14. Duque Duque A. Validación de una metodología analítica y estudio de cinética liberación-disolución de quetiapina como análisis preliminar para optar a estudio de bioexención. [Tesis de pregrado en Química Farmacéutica]. Santiago, Chile: Universidad de Chile; 2016.

15. Quesada Vargas M. Influencia de los solventes en el desarrollo del método espectrofotométrico para la cuantificación de azitromicina en comprimidos. [Tesis de pregrado en Química Farmacéutica]. Quito, Ecuador: Universidad Central del Ecuador; 2013.

16. Mora P, Tello E, Martínez F. Validación de una metodología analítica para la cuantificación de naproxeno en estudios de reparto líquido/líquido mediante espectrofotometría ultravioleta. Rev. Col. Cienc. Quím. Farm. [Internet]. 2006 [citado el 29 de setiembre del 2021]; 35(1):81-105. Disponible en: http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v35n1/v35n1a05.pdf

17. Castiglioni Barrantes E. Evaluación del impacto de resultados S2 en las pruebas de disolución farmacopeica de fármacos multiorigen presentes en la lista de medicamentos

priorizados y que deben demostrar equivalencia terapéutica in vitro. [Tesis de maestría académica en Análisis y Control de Calidad de Medicamentos]. San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica; 2019.

18. Consejo Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH). [Internet]. Suiza: Consejo Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos de Uso Humano [consultado el 16 de octubre del 2021]. Disponible en: https://www.ich.org/.

19. Consejo Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH). [Internet]. Suiza: Consejo Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos de Uso Humano [consultado el 16 de octubre del 2021]. Disponible en: https://www.ich.org/page/history.

20. Consejo Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH). [Internet]. Suiza: Consejo Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos de Uso Humano [consultado el 16 de octubre del 2021]. Disponible en: https://www.ich.org/page/mission

21. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. [Internet]. Suiza: ICH; 2005 [consultado el 16 de octubre del 2021]. Validation of analytical procedures: text and methodology q2 (R1); 1-17. Disponible en: https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf

22. Poder Ejecutivo. Procuraduría General de la República. [Internet]. San José, Costa Rica: Poder Ejecutivo; 2001 [consultado el 16 de octubre del 2021]. Reglamento de validación de métodos analíticos requeridos para el registro sanitario de medicamentos ante el Ministerio de Salud; [11 pantallas aprox]. Disponible en: http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=47566&nValor3=50471&strTipM=TC.

23. Poder Ejecutivo. Procuraduría General de la República. [Internet]. San José, Costa Rica: Poder Ejecutivo; 2009 [consultado el 16 de octubre de 2021]. Guía técnica para la presentación y evaluación de los estudios de perfiles de disolución comparativo; [22 pantallas aprox]. Disponible en: http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=65483&nValor3=76522&strTipM=TC.

24. Poder Ejecutivo. Procuraduría General de la República. [Internet]. San José, Costa Rica: Poder Ejecutivo; 2009 [consultado el 16 de octubre del 2021]. Productos farmacéuticos. Reglamento de validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos; [12 pantallas aprox]. Disponible en: http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=59896&nValor3=75461&strTipM=TC.

25. USP. [Internet]. Rockville, Estados Unidos: USP; 2021 [consultado el 16 de octubre del 2021]. About USP; [6 pantallas aprox]. Disponible en: https://www.usp.org/about.

26. Gómez V, Carreño P, Escobar M, Irarrazabal A, Rubio C, Weinstein C. History, present and projections of the Pharmacopoeia. An Real Acad Farm. [Internet]. 2016 [citado el 16 de octubre del 2021]; 83(3):283-296. Disponible en: https://analesranf.com/wp-content/uploads/2016/82_03/8203_05.pdf.

27. USP. [Internet]. Rockville, Estados Unidos: USP; 2021 [consultado el 16 de octubre del 2021]. Validation of compendial procedures; [6 pantallas aprox]. Disponible en: https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-E2C6F9E8-EA71-4B72-A7BA-76ABD5E729 64_4_en-US?source=Search%20Results&highlight=1225.

28. Organización Mundial de la Salud. [Internet]. Ginebra, Suiza: OMS [consultado el 28 de diciembre del 2021]. Historia de la OMS; [2 pantallas aprox]. Disponible en: https://www.who.int/es/about/who-we-are/history.

29. Organización Mundial de la Salud. Office of the Secretary General's envoy on youth [Internet]. Ginebra: OMS [consultado el 28 de diciembre del 2021]. OMS: Organización Mundial de la Salud; [5 pantallas aprox]. Disponible en: https://www.un.org/youthenvoy/es/2013/09/oms-organizacion-mundial-de-la-salud/.

30. Comité de Expertos de la OMS en especificaciones para las preparaciones farmacéuticas. [Internet]. Ginebra, Suiza: OMS; 1992 [citado el 28 de diciembre del 2021]. OMS, Serie de Informes Técnicos. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/41379/WHO_TRS_823_spa.pdf?sequence=1.

31. FDA. [Internet]. Estados Unidos: FDA; 2018 [citado el 17 de marzo del 2022]. ¿Cuándo y por qué se creó la FDA?; [2 pantallas aprox.]. Disponible en: https://www.fda.gov/about-fda/respuestas-preguntas-frecuentes-sobre-la-fda/cuando-y-por-que-se-creo-la-fda#:~:text=Aunque%20los%20or%C3%ADgenes%20de%20la,de%20los%20Alimentos%20y%20Medicamentos).

32. FDA. [Internet]. Estados Unidos: FDA; 2020 [citado el 17 de marzo del 2022]. FDA Organization; [2 pantallas aprox.]. Disponible en: https://www.fda.gov/about-fda/fda-organization.

33. FDA. [Internet]. Estados Unidos: FDA; 2018 [citado el 17 de marzo del 2022]. Guía para la industria: pruebas de disolución de formas de dosificación oral sólidas de liberación inmediata. FDA; [28 pantallas aprox.]. Disponible en: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guia-para-la-industria-pruebas-de-disolucion-de-formas-de-dosificacion-oral-solidas-de-liberacion

34. Hernández R, Fernández C, Baptista M. Metodología de la investigación. 6a ed. México: McGraw-Hill; 2014.

35. Red de Cámaras Alemanas. [Internet]. Alemania: La red; 2012 [consultado el 09 de febrero del 2022]. Industria farmacéutica: vitamina para la economía mundial; 1-48. Disponible en: http://www.camara-alemana.org.pe/publicaciones/migediciones/2012mig-marzo-mayo.pdf.

36. Marveya Márquez M. Configuración económica de la industria farmacéutica. Actualidad Contable Faces. [Internet]. 2019 [consultado el 09 de febrero del 2022]; 22(38):61-100. Disponible en: https://www.redalyc.org/journal/257/25757716005/html/.

37. Hidalgo L, Palacios F, Navarrete M. Diseño de una máquina encapsuladora automática de comprimidos de gelatina dura de 500 miligramos. Dom. Cien [Internet]. 2017 [consultado el 09 de febrero del 2022]. 3(4):13-31. Disponible en: http://dx.doi.org/10.23857/dc.v3i4.

38. Rodríguez Nozal R. Desarrollo histórico de la industria farmacéutica en España con anterioridad a la Transición. ANALES RANF. [Internet]. 2021 [consultado el 09 de febrero del 2022]; 87(3):323-330. Disponible en: 10.53519/analesranf.2021.87.03.07.

39. OMS. [Internet]. Estados Unidos: OMS; 2014 [citado el 17 de marzo del 2022]. Annex 2 WHO good manufacturing practices for pharmaceutical products: main principles; 77-135. Disponible en: https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/TRS986annex2.pdf.

40. Poder Ejecutivo. Procuraduría General de la República. [Internet]. San José, Costa Rica: Poder Ejecutivo; 2010 [consultado el 09 de febrero del 2022]. Reglamento técnico sobre buenas prácticas de manufactura para la industria farmacéutica, Productos farmacéuticos y medicamentos de uso humano. [2 pantallas aprox.]. Disponible en: http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?nValor1=1&nValor2=67935.

41. Organización Mundial de la Salud. Handbook: Good Laboratory Practice (GLP): quality practices for regulated non-clinical research and development. [Internet]. 2a ed. Suiza:

OMS; 2009 [consultado el 12 de enero del 2022]. Disponible en: https://www.who.int/tdr/publications/documents/glp-handbook.pdf.

42. Agencia de Promoción del Comercio Exterior de Costa Rica. [Internet]. San José, Costa Rica: PROCOMER. 2021 [consultado el 09 de febrero del 2022 Exportaciones de bienes de Costa Rica crecen 26% al primer semestre del 2021. [6 pantallas aprox.]. Disponible en: https://www.procomer.com/noticia/comprador-internacional-noticia/exportaciones-de-bienes-de-costa-rica-crecen-26-al-primer-semestre-del-2021/.

43. Agencia de Promoción del Comercio Exterior de Costa Rica (PROCOMER). [Internet]. San José, Costa Rica: PROCOMER. 2021 [consultado el 09 de febrero del 2022]. Costa Rica exports totaled more than $12 billion as of October of this year. [2 pantallas aprox.]. Disponible en: https://www.procomer.com/news/exporter-new/exportaciones-de-costa-rica-sumaron-mas-de-12-mil-millones-a-octubre-de-este-ano/?lang=en.

44. Jiménez Herrera L. El acceso a medicamentos en Latinoamérica, una mirada al caso de Costa Rica. Revista Cubana de Salud Pública. [Internet]. 2019 [consultado el 09 de febrero del 2022]; 45(4):357-364. Disponible en: http://www.revsaludpublica.sld.cu/index.php/spu/rt/printerFriendly/1635/1326.

45. Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL). [Internet]. Santiago, Chile: CEPAL. 2021[consultado el 09 de febrero del 2022]. Lineamientos y propuestas para un plan de autosuficiencia sanitaria para América Latina y el Caribe. 1-103. Disponible en: https://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/47252/1/S2100557_es.pdf.

46. Claramunt R, Cabildo M, Escolástico C, Jiménez J, Gutiérrez D. Fármacos y medicamentos [Internet]. Madrid, España: Universidad Nacional de Educación a Distancia, 2015 [consultado 11 feb 2022]. Disponible en: https://elibro.net/es/ereader/bibliouia/48822?page=12.

47. Villafuerte Robles L. Los excipientes y su funcionalidad en productos farmacéuticos sólidos. [Internet]. 2011 [citado el 17 de enero del 2022]; 41(1):18-36. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v42n1/v42n1a3.pdf

48. Organización Mundial de la Salud. [Internet]. Ginebra, Suiza: OMS [consultado el 09 de febrero del 2022]. Annex 8 Guidance on the selection of comparator pharmaceutical products for equivalence assessment of interchangeable multisource (generic) products. 185-189. Disponible en: https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/Annex8-TRS992.pdf

49. Laosa O, Guerra P, López J, Mosquera B, Frías J. Estudios de bioequivalencia: la necesidad de establecer la fiabilidad de los medicamentos genéricos. Rev. perú. med. exp. salud pública [Internet]. 2009 [citado el 31 de octubre del 2021]; 26(4):553-562. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342009000400019&lng=es.

50. Poder Ejecutivo. Procuraduría General de la República. [Internet]. San José, Costa Rica: Poder Ejecutivo; 2014 [consultado el 21 de setiembre del 2021]. Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.03.59:11 Productos farmacéuticos, medicamentos para uso humano. Requisitos de registro sanitario. Disponible en: http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_articulo.aspx?param1=NRA&nValor1=1&nValor2=77461&nValor3=97091&nValor5=2

51. Poder Ejecutivo. Procuraduría General de la República. [Internet]. San José, Costa Rica: Poder Ejecutivo; 2015 [consultado el 31 de octubre del 2021]. Reglamento de inscripción, control, importación y publicidad de medicamentos. [2 pantallas aprox]. Disponible en: http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?nValor1=1&nValor2=43444

52. Álvarez Heredia F. Calidad y auditoría en Salud. [Internet]. 3a ed. Colombia: ECOE; 2015 [citado el 31 de octubre del 2021]. Disponible en: https://books.google.co.cr/books?id=saMwDgAAQBAJ&pg=PT411&dq=medicamento+ +equivalente+terapeutico&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjTif6UnfbzAhUhSzABHSxKBD4Q6AF6BAgGEAI#v=onepage&q=medicamento%20%20equivalente%20terapeutico&f=false.

53. López Guzmán J. Medicamentos genéricos: una aproximación interdisciplinar [Internet]. Pamplona: EUNSA, 2008 [citado el 13 de enero del 2022]. Disponible en: https://elibro.net/es/ereader/bibliouia/47413?page=32

54. Rimjhim A, Kamal R, Meenakshi B. An overview on tablet coating. Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development. [Internet]. 2019 [citado el 16 de enero del 2022]; 7(4): -89-92. Disponible en: DOI http://dx.doi.org/10.22270/ajprd.v7i4.547

55. Shaikh R, O'Brien D, Croker D, Walker G. The development of a pharmaceutical oral solid dosage forms. En: Singh R, Yuan Z. Process Systems Engineering for Pharmaceutical Manufacturing. [Internet]. Amsterdam: Elsevier; 2018 [citado el 16 de enero del 2022]. Disponible en: DOI https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63963-9.00002-6

56. Paredes F, Roca J. Acción de los antibióticos. Offarm. [Internet]. 2004 [citado el 29 de octubre del 2021]; 23(3):116-124. Disponible en: https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-accion-antibioticos-perspectiva-medicacion-antimicrobiana-13059414.

57. Alvo A, Téllez V, Sedano C, Fica A. Conceptos básicos para el uso racional de antibióticos en otorrinolaringología. Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello. [Internet]. 2016 [citado el 29 de octubre del 2021]; 76:136-147. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/pdf/orl/v76n1/art19.pdf

58. Seija V, Vignoli R. Principales grupos de antibióticos. Temas de bacteriología y virología médica. 2006; 36 (1):665-668.

59. Lucas M, Mestorino N, Errecalde J. Macrólidos: novedades de un clásico grupo de antimicrobianos. Analecta vet. [Internet]. 2007 [citado el 15 de noviembre del 2021]; 27 (1): 36-45. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/237228183_MACROLIDOS_NOVEDADES_DE_UN_CLASICO_GRUPO_DE_ANTIMICROBIANOS.

60. Gómez R, Madrid G. La aminación reductiva sobre eritromicina como ruta alternativa para la obtención de eritromicilamina, intermediario en la síntesis de diritromicina. Rev. del Centro de Inv. [Internet]. 2007 [citado el 24 de octubre del 2021]; 7(28):41-48. Disponible en: https://www.redalyc.org/pdf/342/34202803.pdf.

61. Álvarez M, García J. Eritromicina. Descubrimiento, características y aplicaciones. Offarm. [Internet]. 2002 [citado el 24 de octubre del 2021]; 21(2):78-83. Disponible en: https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-eritromicina-descubrimiento-caracteristicas-aplicaciones-13026500.

62. Godínez R, Aceves P, Corona J, Cárdenas N. Introducción de los antibióticos en México: investigación científica y producción industrial (1944-1955). Llull. [Internet]. 2016 [citado el 15 de noviembre del 2021]; 39(83):103-133. Disponible en: https://recyt.fecyt.es/index.php/LLUL/article/view/54161.

63. Gomes C, Martínez S, Palma N, Horna G, Ruiz L, Pons M et al. Macrolide resistance mechanisms in Enterobacteriaceae: focus on azithromycin. Crit. Rev. Microbiol. [Internet]. 2017 [citado el 15 de noviembre del 2021]; 43(1):1-30. Disponible en: DOI: 10.3109/1040841X.2015.1136261

64. Ania J, Pérez J, Piña D, Silva L, Castilla M, Muñoz D et al. Test de autoevaluación. [Internet]. España: Editorial MAD, SL; 2005 [citado el 24 de octubre del 2021]. Disponible en: https://books.google.co.cr/books?id=scUDLIQxH_UC&pg=PA228&dq=Los+macr%C3%B3lidos+estructura+qu%C3%ADmica&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwj044Xt-

uPzAhXCQjABHQ-_A4wQ6AF6BAgEEAI#v=onepage&q=Los%20macr%C3%B3lidos%20estructura%20qu%C3%ADmica&f=false

65. Cobos N, Ateka O, Pitart C, Vila J. Macrólidos y cetólidos. Enferm Infecc Microbiol Clin. [Internet]. 2009 [citado el 15 de noviembre del 2021]; 27(7):412-418. Disponible en: DOI: 10.1016/j.eimc.2009.06.002

66. Bambeke F, Tulkens P. Macrolides: pharmacokinetics and pharmacodynamics. Int. J. Antimicrob. Agents. [Internet]. 2001 [citado el 25 de octubre del 2021]; 18(1):17-23. Disponible en: https://www.facm.ucl.ac.be/Full-texts-FACM/Vanbambeke-2001-4.pdf

67. Paciel D, Savio E. Antibioticoterapia - macrólidos y claritromicina. Tendencias en Medicina [Internet]. 2010 [citado el 15 de setiembre del 2010]; 55(1):4-7. Disponible en: http://www.infectologia.edu.uy/images/stories/pdf/publicaciones/biomedicas/tendencias/macrolidos.pdf

68. Fiese E, Steffen S. Comparison of the acid stability of azithromycin and erythromycin A. J. Antimicrob. Chemother. [Internet]. 1990 [citado el 25 de enero del 2022]; 25(1):39-47. DOI: 10.1093/jac/25.suppl_a.39.

69. Gomes C, Martínez S, Palma N, Horna G, Ruiz L, Pons M et al. Critical reviews in microbiology macrolide resistance mechanisms in Enterobacteriaceae: focus on Azithromycin. Crit Rev Microbiol [Internet]. 2016 [citado el 17 de marzo del 2022]; 0(0):000. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2015.1136261

70. Organización Mundial de la Propiedad Intelectual. (OMPI) [Internet]. Ginebra, Suiza: OMPI; 2016 [consultado el 25 de octubre del 2021]. Disponible en: https://www.wipo.int/ipadvantage/es/articles/article_0013.html

71. Baniæ Tomišiæ Z. Prièa o azitromicinu. Kem. Ind. 2011; 60 (12) 603-617.

72. Bakheit A, Al-Hadiya B, Abd-Elgalil, A. Azithromycin. Profiles of drug substances, excipients, and related methodology. [Internet]. 2004 [citado el 24 de diciembre del 2021]; 39:1-40. Disponible en: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800173-8.00001-5.

73. USP. [Internet]. Rockville, Estados Unidos: USP; 2018 [citado el 17 de marzo del 2022]. Certificate AZITHROMYCIN; 1-3. Disponible en: https://static.usp.org/pdf/EN/referenceStandards/certificates/1046056-R103C0.pdf.

74. USP. [Internet]. Rockville, Estados Unidos: USP; 2022 [citado el 17 de marzo del 2022]. Azithromycin; [3 pantallas aprox.]. Disponible en: https://online.uspnf.com/uspnf/search?facets=%5B%5B%22document-status_s%22%2C%5B%22Official%22%2C%22To%20Be%20Official%22%5D%5D%5D&query=azithromycin

75. Saravia M, Losno R, Valderrama M, Muñoz A, Bendezú M, García J et al. Interacciones farmacocinéticas de la azitromicina e implicación clínica. Rev. cuba. med. mil. [Internet]. 2021 [citado el 24 de diciembre del 2021]; 50(3). Disponible en: http://www.revmedmilitar.sld.cu/index.php/mil/article/view/1284.

76. Beauduy C, Winston L. Tetraciclinas, macrólidos, clindamicina, cloranfenicol, estreptograminas, oxazolidinonas y pleuromutilinas. En: Katzung B. Vanderah T. Farmacología básica y clínica, 15a ed. McGraw-Hill; 2021 [citado el 25 de octubre del 2021]. Disponible en: https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?sectionid=256841643&bookid=3038&Resultclick=2#1181913398.

77. Ramos J. Infectología clínica. [Internet]. México: Editorial Manual Moderno; 2012 [citado el 24 de octubre del 2021]. Disponible en: https://books.google.co.cr/books?id=jqXKCQAAQBAJ&pg=PA450&dq=estabilidad+de+azitromicina+en+pH+%C3%A1cido&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwip77WmlOTzAhVf

QzABHTFsDqEQ6AF6BAgGEAI#v=onepage&q=estabilidad%20de%20azitromicina%20en%20pH%20%C3%A1cido&f=false.

78. USP. [Internet]. Rockville, Estados Unidos: USP; 2021 [citado el 25 de octubre del 2021]. Azithromycin [4 pantallas aprox.]. Disponible en: https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-34C99575-55AF-407A-8C43-79D17394E453_5_en-US?source=Search%20Results&highlight=azithromycin

79. USP. [Internet]. Rockville, Estados Unidos: USP; 2021 [citado el 25 de octubre del 2021]. Erythromycin [5 pantallas aprox.]. Disponible en: https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-43470CC7-E626-448A-AE64-1B46E925E501_4_en-US?source=Search%20Results&highlight=erythromycin.

80. Fisterra. [Internet]. España. ELSEVIER. [2020; consultado el 25 de diciembre del 2021]. Información sobre coronavirus 2019. [5 pantallas aprox]. Disponible en: https://www.fisterra.com/covid-19/ficha.asp?idficha=802&version=0

81. Vidt D, Bakst A, Goldman M, Longworth D. The role of azithromycin and clarithromycin in clinical practice. Cleveland Clinic Journal of Medicine [Internet]. 1993 [citado el 15 de enero del 2022]; 1; 60 (5):359–64. Disponible en: https://www.ccjm.org/content/ccjom/60/5/359.full.pdf

82. Casey W. Inmunología de Janeway. [Internet]. Ciudad de México: Editorial Manual Moderno; 2019 [citado el 24 de octubre del 2021]. Disponible en: https://books.google.co.cr/books?id=yYeWDwAAQBAJ&pg=PT1066&dq=que+es+un+macrolido&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjzrN2vePzAhVETTABHV9aAdoQ6AF6BAgJEAI#v=onepage&q=que%20es%20un%20macrol ido&f=false.

83. Rodríguez Carranza R. Vademécum académico de medicamentos. 6a ed. McGraw-Hill; 2021 [citado el 25 de octubre del 2021]. Disponible en: https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1552&sectionid=90367524#1113052271

84. Sandman Z, Iqbal O. Azitromicina. [Internet]. [Actualizado el 1 de mayo de 2021]. Estados Unidos: StatPearls; 2021 [consultado el 19 de setiembre del 2021]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557766/.

85. Anton F, Praveen P. Azitromicina: el primer fármaco terapéutico de amplio espectro. Revista Europea de Química Medicinal. [Internet]. 2020 [consultado el 09 de febrero del 2022]; 207:1-9. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112739

86. Lawrence S, Raw A, Yu L. Dissolution testing. En: Krishna R, Yu L. Biopharmaceutics applications in drug development. [Internet]. Boston: Springer Science; 2008 [citado el 17 de noviembre del 2021]. Disponible en: DOI https://doi.org/10.1007/978-0-387-

87. Volonté M. Quiroga P. Análisis farmacéutico. La Plata: Editorial de la Universidad de La Plata; 2013.

88. USP. [Internet]. Rockville, Estados Unidos: USP; 2021 [citado el 25 de octubre del 2021]. Erythromycin; [6 pantallas aprox.]. Disponible en: https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-B21E4B4E-B5EF-4EA6-879E-2D03A2476ABB_3_en-US?source=Search%20Results&highlight=solubility

89. González A, Cabrera P, Bermejo S. Sección Generalidades: Fundamentos científicos del BCS y de la bioequivalencia in vitro: ejemplos de clasificación según el SCB. En: Granero E. Metodologías biofarmacéuticas en el desarrollo de medicamentos: Universidad Miguel Hernández de Elche; 2015; 1-551.

90. Baena Y, León P. Importancia y fundamentación del sistema de clasificación biofarmacéutico, como base de la exención de estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia in vivo. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. [Internet]. 2008 [citado el 30 de diciembre del 2021]; 37(1):18-32. Disponible en: http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v37n1/v37n1a02.pdf.

91. Pérez L. Prueba de disolución “in vitro” de tabletas de acetaminofén, cuantificando en HPLC con detector electroquímico. InterSedes. [Internet]. 2015 [citado el 26 de octubre del 2021]; 16(33):27-37. Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/pdf/is/v16n33/a02v16n33.pdf

92. Chow C, Rebelo C, Lee Y. Dissolution method validation. En: Chow C, Lam H, Lee Y, Ming Zh. Analytical method validation and instrument performance verification. New Jersey: John Wiley & Sons; 2004; 51-66.

93. Tong C, Souza S, Parker J, Mirza T. Commentary on AAPS workshop dissolution testing for the twenty-first century: linking critical quality attributes and critical process Parameters to clinically relevant dissolution. Pharm. Res. [Internet]. 2007 [citado el 16 de noviembre del 2021]; 24(9):1603-1607. Disponible en: DOI 10.1007/s11095-007-9280-x.

94. Agencia Europea de Medicamentos. [Internet]. Londres, Inglaterra: EMA; 2010. Guideline on the investigation of bioequivalence [citado el 25 de octubre del 2021]. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-bioequivalence-rev1_en.pdf

95. USP. [Internet]. Rockville, Estados Unidos: USP; 2021 [citado el 25 de octubre del 2021]. ⟨711⟩ DISSOLUTION; [5 pantallas aprox.]. Disponible en: https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-AC788D41-90A2-4F36-A6E7-769954A9ED09_1_en-US?source=Search%20Results&highlight=dissolution

96. Baraza S, Castejón V, Guardino S. Higiene industrial. [Internet]. Barcelona: Oberta UOC Publishing SL; 2015 [citado el 22 de octubre del 2021]. Disponible en: https://books.google.co.cr/books?id=XliiDAAAQBAJ&pg=PT155&dq=Procedimiento+analitico+es&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjOxvbVkN_zAhXlTTABHerIBLQQ6AF6BAgJEAI#v=onepage&q=Procedimiento%20analitico%20es&f=false

97. Eurolab España. [Internet]. España: Eurachem; 2016 [consultado el 23 de diciembre del 2021]. Guía Eurachem: la adecuación al uso de los métodos analíticos – Una guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados; 1-66. Disponible en: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf.

98. Fernández E, Mazziotta C. Gestión de la calidad en el laboratorio clínico. [Internet]. España: Editorial Médica Panamericana; 2005 [citado el 22 de octubre del 2021]. Disponible en: https://books.google.co.cr/books?id=kiwij4rDvp4C&pg=PA463&dq=Procedimiento+analitico&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwiR79yxkN_zAhUxRjABHR1RDFcQ6AF6BAgGEAI#v=onepage&q=Procedimiento%20analitico&f=false

99. Soledad Rodríguez B. La validación en la industria. [Internet]. España: Soledad; 2009 [citado el 18 de octubre del 2021]. Disponible en: https://books.google.co.cr/books?id=AR5_AgAAQBAJ&pg=PA14&dq=validacion+linealidad+e+intervalos&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwj0ruudmtXzAhXxQjABHdHCA6UQ6AF6BAgJEAI#v=onepage&q=validacion%20linealidad%20e%20intervalos&f=false

100. Sierra A, Pérez Q, Gómez R, Morante Z. Análisis instrumental. [Internet]. España: Netbiblo; 2010 [citado el 21 de octubre del 2021]. Disponible en: https://books.google.co.cr/books?id=7kqqf47xB1cC&pg=PA3&dq=validacion+analitica&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjO5e7Ood3zAhX4QzABHdh7DBkQ6AF6BAgFEAI#v=onepage&q=validacion%20analitica&f=false.

101. USP. [Internet]. Estados Unidos; USP [citado el 25 de enero del 2021]. ⟨1225⟩ Validation of compendial procedures [10 pantallas aprox.]. Disponible en: https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-E2C6F9E8-EA71-4B72-A7BA-76ABD5E72964_4_en-US?source=Search%20Results&highlight=validation%20

102. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de métodos analíticos. [Internet]. Barcelona, España: AEFI; 2001 [consultado el 26 de diciembre del 2021].

Disponible en: https://www.academia.edu/10365264/Validacion_de_Metodos_Analiticos_Asociacion_Espanola_de_Farmaceuticos_de_la_Industria.

103. Ghulam S. Step-by-step analytical methods validation and protocol in the quality system compliance industry. J. Valid. Technol. 2004; 10 (1): 314-324.

104. World Health Organization. Medicines Quality Assurance, Technologies, Standards and Norms. [Internet]. Ginebra, Suiza: OMS; [2018, consultado el 26 de diciembre del 2021]. Guidelines on validation – appendix 4 analytical method validation; 11. Disponible en: https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/28092018Guideline_Validation_AnalyticalMethodValidation-Appendix4_QAS16-671.pdf.

105. Consejo de Ministros de Integración Económica. Sistema Costarricense de Información Jurídica. [Internet]. Costa Rica: COMIECO XL [consultado el 26 de diciembre del 2021] Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.03.39:06 Productos Farmacéuticos. Reglamento de validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos; [19 pantallas aprox]. Disponible en: http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=59896&nValor3=75461&strTipM=TC

106. Castillo B, González R. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. Rev Cubana Farm. [Internet]. 1996 [citado el 08 de marzo del 2022]; 30(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75151996000100009&lng=es.

107. Reding A, Zamora R, López J. ¿Cómo y cuándo realizar un análisis de regresión lineal simple? Aplicación e interpretación. Dermatol Rev Mex. [Internet]. 2011 [citado el 8 de marzo de 2022]; 55(6):395-402. Disponible en: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/53623853/Como_y_cuando_realizar_un_analisis_de_regresion_lineal_simple-with-cover-page-

v2.pdf?Expires=1646716318&Signature=S6urOY1-mnVicApbQymqr-bwp69dCt3cx2oVm~qh55EZOT4R2jj91bAFeEKZpXkauLsxkcdska0vL1h~JS3DcdA-B26BED9AVHdx6QpD~TpD1JGGtGD1ws-YF7JUliJ-XBeF9xq4h7~sFlOzli-VSATATVQQ0Ak8EQOO~XOjvTSStmWZ0Kbd64iR64ZYydjZt1QoZSy3rGVH2oI7lubB06Z08gWLhSbe3p9nILfaS1RidaEU7I8gaqXWGSRCmV6kTMK4UwnUviwrDve-Uml4TBpKw1snSOu366tUlMuICT9Vk0CM4i-GEcn~dGLlBDQ0qmSFyMSEa5nysEDr9pomcQ__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA

108. Cardona D, González J, Rivera M, Cárdenas E. Universidad del Rosario. [Internet]. Bogotá, Colombia: Editorial Universidad del Rosario; 2013 [citado el 9 de marzo de 2022]. Inferencia estadística módulo de regresión lineal simple; 1-60. Disponible en: https://repository.urosario.edu.co/bitstream/handle/10336/10454/BI%20147%20admon%20Web.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

109. Gutiérrez J. La variación y su significado. Rev. U. EAFIT [Internet]. 2012 [citado el 8 de marzo de 2022]; 32(101):87-96. Disponible en: https://publicaciones.eafit.edu.co/index.php/revista-universidad-eafit/article/view/1216

110. Berrío M, Trujillo M, Vallejo B, Barbosa H. Desarrollo y validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de warfarina sódica en una preparación extemporánea. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. [Internet]. 2013 [consultado el 12 de marzo del 2022]; 42(1),122-133. Disponible en: http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v42n1/v42n1a08.pdf

111. Suarez O, Morales H. Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. Revista Semilleros. [Internet]. 2018 [citado el 13 de octubre del 2021]; 4(1):8-14. Disponible en: https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7731/1/6131978-2018-1-IQ.pdf.

112. USP. [Internet]. Estados Unidos; USP [citado el 25 de enero del 2021]. 〈 621 〉 Cromatografía [10 pantallas aprox.]. Disponible en: https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-6C3DF8B8-D12E-4253-A0E7-6855670CDB7B_1_en-US?source=Search%20Results&highlight=chromatography

113. Zumbado Fernández H. Análisis instrumental de los alimentos [Internet]. La Habana, Cuba: Editorial Universitaria, 2021 [consultado el 14 de enero del 2022]. Disponible en: https://elibro.net/es/ereader/bibliouia/172377?page=74

114. Masana Isidre M. Agilent Technologies. [Internet]. Estados Unidos: Agilent [consultado el 02 de marzo del 2022]. Posibilidades y optimización condiciones de los detectores "Diode Array" 1-56. Disponible en: https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/public/Optimizacion_DAD.pdf

115. García G, Quintana M. Introducción a la cromatografía líquida de alta resolución [Internet]. Madrid: Editorial Universidad Autónoma de Madrid, 2014 [consultado 14 de enero del 2022]. Disponible en: https://elibro.net/es/lc/bibliouia/titulos/53955

116. USP. [Internet] Estados Unidos; USP [citado el 25 de octubre del 2021]. Description and relative solubility. [2 pantallas aprox.]. Disponible en: https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-E124FC65-4846-4731-BB90-913D6A16ED31_16_en-US?source=Search%20Results&highlight=solubility

117.Hurtado J, Santamaría J. Nanoazitromicina preparada por el método solvente/ antisolvente: efecto sobre la disolución. Rev Química Central [Internet]. 2018 [citado el 27 de febrero del 2022]; 6(1), 21-26. DOI: https://doi.org/10.29166/quimica.v6i1.1412

118. Keith A, Loftin, D, Adams M, Meyer R. Effects of ionic strength, temperature, and pH on degradation of selected antibiotics. Journal of Environmental Quality [Internet]. 2008 [citado el 03 de marzo del 2021]; 29(3):378-386. DOI: https://doi.org/10.2134/jeq2007.0230

ANEXOS

Anexo 1. Resultados de la valoración de tabletas recubiertas de Zithromax® de 500mg

Cuadro 34. Resultados del estándar para el cálculo de la valoración

Estándar 1			Estándar 2		
Medición	**Peso (g)**	**Concentración (g/mL)**	**Medición**	**Peso (g)**	**Concentración (g/mL)**
36171,0	0,0266	1,0067	35755,60	0,0267	1,0105
35987,5			35682,30		
35910,0			35607,40		
35741,8			35763,60		
35769,1			35651,20		

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 35. Datos para el cálculo de la valoración de tabletas recubiertas de Zithromax® de 500mg

Factor de dilución del estándar	Factor de dilución de la muestra	Peso promedio	Etiquetado	Factor gravimétrico
25	100	0,9256	500	0,9541

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 36. Resultados de la valoración de tabletas recubiertas de Zithromax® de 500mg

Muestras	Peso muestra (g)	Medición	%
1	0.1841	35061.2	94.3
2	0.1861	35326.4	94.0
3	0.1871	36432.1	96.4

Fuente: elaboración propia.

Anexo 2. Descripción de la preparación de muestras y estándares para la validación del perfil de disolución pH 1.2

Reactivos

- Solución de HCl pH 1.2: disolver 38.02g de cloruro de potasio y 35mL de ácido clorhídrico en 5600mL de agua. Ajustar a un pH de 1.2 con cloruro de potasio o ácido clorhídrico y llevar a un volumen de 6 litros.
- Solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio: disolver 4.6g de fosfato monobásico de potasio en un recipiente de capacidad adecuada, agregar 900ml de agua, agitar con pastilla magnética hasta disolver completamente, ajustar a pH 7.5 con hidróxido de sodio 1N y diluir con agua hasta un volumen de 1000ml.
- Fase móvil: mezcla isocrática de acetonitrilo: solución amortiguadora (65:35).

Preparación del estándar madre (9.255 mg/mL)

- Pesar 970mg de estándar de azitromicina dihidratada (equivalente a 925,5mg de azitromicina) en un balón de 100mL.
- Adicionar 50mL de acetonitrilo y centrifugar por 10 minutos.
- Llevar a volumen con acetonitrilo.

Preparación de las muestras al 33%

- Pesar 13.39mg de placebo de azitromicina tabletas de 500mg en un balón aforado de 100mL.
- Adicionar con bureta 1.0mL del estándar madre.
- Agregar 50mL de solución buffer pH 1.2 y colocar en el ultrasónico 15 minutos.

- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio, colocar 5 minutos en el baño ultrasónico.
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de las muestras al 66%

- Pesar 26.77mg de placebo de azitromicina tabletas de 500mg en un balón aforado de 100mL.
- Adicionar con bureta 2.0mL del estándar madre.
- Agregar 50mL de solución buffer pH 1.2 y colocar en el ultrasónico 15 minutos.
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio, colocar 5 minutos en el baño ultrasónico.
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de las muestras al 100%

- Pesar 40.56mg de placebo de azitromicina tabletas de 500mg en un balón aforado de 100mL.
- Adicionar con bureta 3.0mL del estándar madre.
- Agregar 50mL de solución buffer pH 1.2 y colocar en el ultrasónico 15 minutos.
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio, colocar 5 minutos en el baño ultrasónico.
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de las muestras al 133%

- Pesar 53.94mg de placebo de azitromicina tabletas de 500mg en un balón aforado de 100mL.
- Adicionar con bureta 4.0mL del estándar madre.
- Agregar 50mL de solución buffer pH 1.2 y colocar en el ultrasónico 15 minutos.
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio, colocar 5 minutos en el baño ultrasónico.
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de las muestras al 167%

- Pesar 67.61mg de placebo de azitromicina tabletas de 500mg en un balón aforado de 100mL.
- Adicionar con bureta 4.5mL del estándar madre.
- Agregar 50mL de solución buffer pH 1.2 y colocar en el ultrasónico 15 minutos.
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio, colocar 5 minutos en el baño ultrasónico.
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de soluciones estándar al 33%

- Adicionar con bureta 1.0mL del estándar madre en un balón de 100mL
- Agregar 50mL de solución buffer pH 1.2
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de soluciones estándar al 66%

- Adicionar con bureta 2.0mL del estándar madre en un balón de 100mL
- Agregar 50mL de solución buffer pH 1.2
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de soluciones estándar al 100%

- Adicionar con bureta 3.0mL del estándar madre en un balón de 100mL
- Agregar 50mL de solución buffer pH 1.2
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de soluciones estándar al 133%

- Adicionar con bureta 4.0mL del estándar madre en un balón de 100mL
- Agregar 50mL de solución buffer pH 1.2
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de soluciones estándar al 166%

- Adicionar con bureta 4.5mL del estándar madre en un balón de 100mL
- Agregar 50mL de solución buffer pH 1.2
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio
- Aforar con acetonitrilo.

Descripción de la preparación de muestras y estándares para la validación del perfil de disolución pH 4.5

Reactivos

- Solución amortiguadora de acetato pH 4.5: disolver 17.9g de acetato de sodio trihidratado y 8ml de ácido acético glacial en 5600mL de agua. Ajustar a un pH de 4.5 con ácido acético glacial y llevar a un volumen de 6 litros.
- Solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio: disolver 4.6g de fosfato monobásico de potasio en un recipiente de capacidad adecuada, agregar 900ml de agua, agitar con pastilla magnética hasta disolver completamente, ajustar a pH 7.5 con hidróxido de sodio 1N y diluir con agua hasta un volumen de 1000ml.
- Fase móvil: mezcla isocrática de acetonitrilo: solución amortiguadora (65:35).

Preparación del estándar madre (9.255mg/mL)

- Pesar 970mg de estándar de azitromicina dihidratada (equivalente a 925,5mg de azitromicina) en un balón de 100mL.
- Adicionar 50mL de acetonitrilo y centrifugar por 10 minutos.
- Llevar a volumen con acetonitrilo.

Preparación de las muestras al 33%

- Pesar 13.39mg de placebo de azitromicina tabletas de 500mg en un balón aforado de 100mL.
- Adicionar con bureta 1.0mL del estándar madre.

- Agregar 50mL de solución buffer pH 4.5 y colocar en el ultrasónico 15 minutos.
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio, colocar 5 minutos en el baño ultrasónico.
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de las muestras al 66%

- Pesar 26.77mg de placebo de azitromicina tabletas de 500mg en un balón aforado de 100mL.
- Adicionar con bureta 2.0mL del estándar madre.
- Agregar 50mL de solución buffer pH 4.5 y colocar en el ultrasónico 15 minutos.
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio, colocar 5 minutos en el baño ultrasónico.
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de las muestras al 100%

- Pesar 40.56mg de placebo de azitromicina tabletas de 500mg en un balón aforado de 100mL.
- Adicionar con bureta 3.0mL del estándar madre.
- Agregar 50mL de solución buffer pH 4.5 y colocar en el ultrasónico 15 minutos.
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio, colocar 5 minutos en el baño ultrasónico.
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de las muestras al 133%

- Pesar 53.94mg de placebo de azitromicina tabletas de 500mg en un balón aforado de 100mL.
- Adicionar con bureta 4.0mL del estándar madre.
- Agregar 50mL de solución buffer pH 4.5 y colocar en el ultrasónico 15 minutos.
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio, colocar 5 minutos en el baño ultrasónico.
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de las muestras al 167%

- Pesar 67.61mg de placebo de azitromicina tabletas de 500mg en un balón aforado de 100mL.
- Adicionar con bureta 4.5mL del estándar madre.
- Agregar 50mL de solución buffer pH 4.5 y colocar en el ultrasónico 15 minutos.
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio, colocar 5 minutos en el baño ultrasónico.
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de soluciones estándar al 33%

- Adicionar con bureta 1.0mL del estándar madre en un balón de 100mL
- Agregar 50mL de solución buffer pH 4.5
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de soluciones estándar al 66%

- Adicionar con bureta 2.0mL del estándar madre en un balón de 100mL
- Agregar 50mL de solución buffer pH 4.5
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de soluciones estándar al 100%

- Adicionar con bureta 3.0mL del estándar madre en un balón de 100mL
- Agregar 50mL de solución buffer pH 4.5
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de soluciones estándar al 133%

- Adicionar con bureta 4.0mL del estándar madre en un balón de 100mL
- Agregar 50mL de solución buffer pH 4.5
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de soluciones estándar al 166%

- Adicionar con bureta 4.5mL del estándar madre en un balón de 100mL
- Agregar 50mL de solución buffer pH 4.5
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio

- Aforar con acetonitrilo.

Descripción de la preparación de muestras y estándares para la validación del perfil de disolución pH 6.8

Reactivos

- Solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio pH 6.8: disolver 40.8g de fosfato monobásico de potasio y 5.37g de hidróxido de sodio en 5600mL de agua. Ajustar a un pH de 6.8 con hidróxido de sodio o ácido fosfórico y llevar a un volumen de 6 litros.
- Solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio: disolver 4.6g de fosfato monobásico de potasio en un recipiente de capacidad adecuada, agregar 900ml de agua, agitar con pastilla magnética hasta disolver completamente, ajustar a pH 7.5 con hidróxido de sodio 1N y diluir con agua hasta un volumen de 1000ml.
- Fase móvil: mezcla isocrática de acetonitrilo: solución amortiguadora (65:35).

Preparación del estándar madre (9.255mg/mL)

- Pesar 970mg de estándar de azitromicina dihidratada (equivalente a 925,5mg de azitromicina) en un balón de 100mL.
- Adicionar 50mL de acetonitrilo y centrifugar por 10 minutos.
- Llevar a volumen con acetonitrilo.

Preparación de las muestras al 33%

- Pesar 13.39mg de placebo de azitromicina tabletas de 500mg en un balón aforado de 100mL.

- Adicionar con bureta 1.0mL del estándar madre.
- Agregar 50mL de solución buffer pH 6.8 y colocar en el ultrasónico 15 minutos.
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio, colocar 5 minutos en el baño ultrasónico.
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de las muestras al 66%

- Pesar 26.77mg de placebo de azitromicina tabletas de 500mg en un balón aforado de 100mL.
- Adicionar con bureta 2.0mL del estándar madre.
- Agregar 50mL de solución buffer pH 6.8 y colocar en el ultrasónico 15 minutos.
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio, colocar 5 minutos en el baño ultrasónico.
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de las muestras al 100%

- Pesar 40.56mg de placebo de azitromicina tabletas de 500mg en un balón aforado de 100mL.
- Adicionar con bureta 3.0mL del estándar madre.
- Agregar 50mL de solución buffer pH 6.8 y colocar en el ultrasónico 15 minutos.
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio, colocar 5 minutos en el baño ultrasónico.
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de las muestras al 133%

- Pesar 53.94mg de placebo de azitromicina tabletas de 500mg en un balón aforado de 100mL.
- Adicionar con bureta 4.0mL del estándar madre.
- Agregar 50mL de solución buffer pH 6.8 y colocar en el ultrasónico 15 minutos.
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio, colocar 5 minutos en el baño ultrasónico.
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de las muestras al 167%

- Pesar 67.61mg de placebo de azitromicina tabletas de 500mg en un balón aforado de 100mL.
- Adicionar con bureta 4.5mL del estándar madre.
- Agregar 50mL de solución buffer pH 6.8 y colocar en el ultrasónico 15 minutos.
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio, colocar 5 minutos en el baño ultrasónico.
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de soluciones estándar al 33%

- Adicionar con bureta 1.0mL del estándar madre en un balón de 100mL
- Agregar 50mL de solución buffer pH 6.8
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio

- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de soluciones estándar al 66%

- Adicionar con bureta 2.0mL del estándar madre en un balón de 100mL
- Agregar 50mL de solución buffer pH 6.8
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de soluciones estándar al 100%

- Adicionar con bureta 3.0mL del estándar madre en un balón de 100mL
- Agregar 50mL de solución buffer pH 6.8
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de soluciones estándar al 133%

- Adicionar con bureta 4.0mL del estándar madre en un balón de 100mL
- Agregar 50mL de solución buffer pH 6.8
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio
- Aforar con acetonitrilo.

Preparación de soluciones estándar al 166%

- Adicionar con bureta 4.5mL del estándar madre en un balón de 100mL

- Agregar 50mL de solución buffer pH 4.5
- Añadir 40mL de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio
- Aforar con acetonitrilo.

Anexo 3. Resultados de la validación

Evaluación de la Especificidad

Cuadro 37. Determinación de la especificidad de la validación del perfil de disolución a pH 1.2

Muestras	Lectura del placebo	Concentración del placebo (mg/mL)	Lectura promedio del estándar	Concentración del estándar (mg/mL)	Porcentaje de placebo en la muestra (%)
1	0.0000	296.9913	491.3108	260.8813	0.0
2	0.0000	295.5496			0.0
3	0.0000	295.5496			0.0

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 38. Determinación de la especificidad de la validación del perfil de disolución a pH 4.5

Muestras	Lectura del placebo	Concentración del placebo (mg/mL)	Lectura promedio del estándar	Concentración del estándar (mg/mL)	Porcentaje de placebo en la muestra (%)
1	0.0000	281.8583	935.6966	262.7272	0.0
2	0.0000	302.9977			0.0
3	0.0000	284.6769			0.0

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 39. Determinación de la especificidad de la validación del perfil de disolución a pH 6.8

Muestras	Lectura del placebo	Concentración del placebo (mg/mL)	Lectura promedio del estándar	Concentración del estándar (mg/mL)	Porcentaje de placebo en la muestra (%)
1	0.0000	286.0862	923.3859	262.8084	0.0
2	0.0000	283.9722			0.0
3	0.0000	286.7908			0.0

Fuente: elaboración propia.

Evaluación de la linealidad del sistema

Cuadro 40. Determinación de la linealidad del sistema para la validación del perfil de disolución a pH 1.2

Porcentaje (%)	Concentración del estándar (mg/L)	Lectura de la curva de calibración N° 1	Lectura de la curva de calibración N° 2	Lectura de la curva de calibración N° 3
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
33	86.9604	177.9806	182.5486	176.5311
66	173.9209	347.2867	350.4769	352.4663
100	260.8813	485.0116	487.9614	500.9593
133	347.8417	684.2690	692.4748	711.2418
167	391.3220	787.1610	793.3919	795.4832

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 41. Determinación de los residuales para la linealidad del sistema en la validación del perfil de disolución a pH 1.2

Curva de calibración	Lectura	Concentración teórica	Concentración práctica	Residual
1	0	0.00	0.52	-0.52
	177.9806	86.96	90.73	-3.77
	347.28674	173.92	176.54	-2.62
	485.01163	260.88	246.34	14.54
	684.26904	347.84	347.33	0.51
	787.16101	391.32	399.48	-8.15
2	0	0.00	0.00	0.00
	182.54855	86.96	91.82	-4.86
	350.47693	173.92	176.29	-2.37
	487.9614	260.88	245.44	15.44
	692.47479	347.84	348.31	-0.47
	793.39185	391.32	399.07	-7.75
3	0	0.00	1.42	-1.42
	176.53105	86.96	88.58	-1.61
	352.46628	173.92	175.44	-1.52
	500.95926	260.88	248.75	12.13
	711.24176	347.84	352.57	-4.73
	795.4832	391.32	394.17	-2.84
Sumatoria				0.00

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 42. Determinación de la linealidad del sistema para la validación del perfil de disolución a pH 4.5

Porcentaje (%)	Concentración del estándar (mg/L)	Lectura de la curva de calibración N° 1	Lectura de la curva de calibración N° 2	Lectura de la curva de calibración N° 3
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
33	87.5757	298.1674	304.6524	290.1154
66	175.1514	592.0505	597.1356	603.1502
100	262.7272	932.8850	935.8129	938.3921
133	350.3029	1187.0042	1194.6383	1209.9202
167	394.0907	1359.9782	1365.2466	1359.8774

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 43. Determinación de los residuales para la linealidad del sistema en la validación del perfil de disolución a pH 4.5

Curva de calibración	Lectura	Concentración teórica	Concentración práctica	Residual
1	0	0.00	0.20	-0.20
	298.1674	87.58	86.76	0.82
	592.05054	175.15	172.07	3.08
	932.88495	262.73	271.02	-8.29
	1187.00415	350.30	344.79	5.51
	1359.97815	394.09	395.01	-0.92
2	0	0.00	-0.51	0.51
	304.6524	87.58	87.68	-0.10
	597.13562	175.15	172.34	2.81
	935.8129	262.73	270.37	-7.65
	1194.63831	350.30	345.29	5.01

	1365.24658	394.09	394.68	-0.59
3	0	0.00	0.79	-0.79
	290.11536	87.58	84.18	3.40
	603.15021	175.15	174.15	1.00
	938.39209	262.73	270.51	-7.78
	1209.92017	350.30	348.55	1.75
	1359.8774	394.09	391.65	2.44
Sumatoria				0.00

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 44. Determinación de la linealidad del sistema para la validación del perfil de disolución a pH 6.8

Porcentaje (%)	**Concentración del estándar (mg/L)**	**Lectura de la curva de calibración N° 1**	**Lectura de la curva de calibración N° 2**	**Lectura de la curva de calibración N° 3**
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
33	87.6028	308.7387	312.2097	310.5385
66	175.2056	614.5803	631.6429	622.3933
100	262.8084	933.2535	915.5289	921.3753
133	350.4112	1231.9657	1224.0295	1235.2892
167	394.2126	1402.4196	1374.7391	1375.2235

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 45. Determinación de los residuales para la linealidad del sistema en la validación del perfil de disolución a pH 6.8

Curva de calibración	Lectura	Concentración teórica	Concentración práctica	Residual
1	0	0.00	0.58	-0.58
	308.7387	87.60	87.67	-0.06
	614.58026	175.21	173.93	1.27
	933.25348	262.81	263.82	-1.01
	1231.9657	350.41	348.08	2.33
	1402.41956	394.21	396.16	-1.95
2	0	0.00	-2.07	2.07
	312.20972	87.60	87.76	-0.15
	631.64294	175.21	179.66	-4.46
	915.5289	262.81	261.34	1.47
	1224.02954	350.41	350.10	0.31
	1374.73914	394.21	393.46	0.75
3	0	0.00	-1.08	1.08
	310.53848	87.60	87.72	-0.12
	622.39331	175.21	176.89	-1.69
	921.37531	262.81	262.39	0.42
	1235.28918	350.41	352.15	-1.74
	1375.2235	394.21	392.17	2.04
Sumatoria				0.00

Fuente: elaboración propia.

Evaluación de la linealidad del método

Cuadro 46. Determinación de la linealidad del método para la validación del perfil de disolución a pH 1.2

Porcentaje (%)	Concentración del estándar (mg/L)	Lectura de la curva de calibración N° 1	Lectura de la curva de calibración N° 2	Lectura de la curva de calibración N° 3
0	0.000	0.000	0.0000	0.0000
33	88.928	163.816	169.4110	166.9929
66	177.857	351.572	336.7937	344.1669
100	266.785	511.176	507.4134	516.5316
133	355.714	686.935	673.1346	679.2897
167	400.178	769.701	776.8441	782.6365

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 47. Determinación de los residuales para la linealidad del método en la validación del perfil de disolución a pH 1.2

Curva de calibración	Lectura	Concentración teórica	Concentración práctica	Residual
1	0	0.00	0.52	-0.52
	163.81647	88.93	85.38	3.55
	351.57236	177.86	182.64	-4.78
	511.17575	266.79	265.32	1.47
	686.93524	355.71	356.37	-0.65
	769.70081	400.18	399.24	0.94
2	0	0.00	1.32	-1.32
	169.411	88.93	89.44	-0.52
	336.79367	177.86	176.52	1.34
	507.41339	266.79	265.27	1.51
	673.13458	355.71	351.48	4.23

	776.84406	400.18	405.43	-5.25
3	0	0.00	1.32	-1.32
	166.99286	88.93	87.28	1.65
	344.16687	177.86	178.48	-0.62
	516.53156	266.79	267.21	-0.42
	679.28973	355.71	350.99	4.73
	782.63647	400.18	404.19	-4.01
Sumatoria				0.00

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 48. Determinación de la linealidad del método para la validación del perfil de disolución a pH 4.5

Porcentaje (%)	**Concentración del estándar (mg/L)**	**Lectura de la curva de calibración N° 1**	**Lectura de la curva de calibración N° 2**	**Lectura de la curva de calibración N° 3**
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
33	87.5811	306.5575	311.9080	315.8806
66	175.1623	611.6886	618.0947	615.3435
100	262.7434	926.2642	942.1863	933.2260
133	350.3245	1236.6760	1248.9452	1233.9966
167	394.1151	1396.2693	1388.0425	1401.8287

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 49. Determinación de los residuales para la linealidad del método en la validación del perfil de disolución a pH 4.5

Curva de calibración	Lectura	Concentración teórica	Concentración práctica	Residual
1	0	0.00	0.98	-0.98
	306.55746	87.58	87.53	0.05
	611.6886	175.16	173.67	1.49
	926.26422	262.74	262.48	0.27
	1236.67603	350.32	350.11	0.22
	1396.26929	394.12	395.16	-1.05
2	0	0.00	-0.45	0.45
	311.90796	87.58	87.58	0.00
	618.09467	175.16	174.00	1.17
	942.18634	262.74	265.46	-2.72
	1248.94519	350.32	352.04	-1.71
	1388.04248	394.12	391.30	2.82
3	0	0.00	-0.24	0.24
	315.88058	87.58	89.00	-1.42
	615.34351	175.16	173.60	1.56
	933.22601	262.74	263.40	-0.66
	1233.99658	350.32	348.37	1.95
	1401.82874	394.12	395.79	-1.67
Sumatoria				0.00

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 50. Determinación de la linealidad del método para la validación del perfil de disolución a pH 6.8

Porcentaje (%)	Concentración del estándar (mg/L)	Lectura de la curva de calibración N° 1	Lectura de la curva de calibración N° 2	Lectura de la curva de calibración N° 3
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
33	87.5811	310.513	311.958	309.553
66	175.1623	614.790	612.514	609.334
100	262.7434	921.324	928.364	928.364
133	350.3245	1217.908	1217.566	1222.793
167	394.1151	1366.992	1378.237	1385.347

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 51. Determinación de los residuales para la linealidad del método en la validación del perfil de disolución a pH 6.8

Curva de calibración	Lectura	Concentración teórica	Concentración práctica	Residual
1	0	0.00	-1.39	1.39
	310.5132	87.58	88.18	-0.59
	614.79028	175.16	175.94	-0.78
	921.324	262.74	264.36	-1.62
	1217.90771	350.32	349.91	0.41
	1366.99182	394.12	392.92	1.20
2	0	0.00	-1.02	1.02
	311.9581	87.58	88.46	-0.88
	612.51373	175.16	174.67	0.49
	928.3643	262.74	265.27	-2.53
	1217.56592	350.32	348.23	2.10

	1378.2367	394.12	394.32	-0.20
3	0	0.00	-0.08	0.08
	309.55276	87.58	88.19	-0.61
	609.33417	175.16	173.67	1.50
	928.3643	262.74	264.63	-1.89
	1222.7926	350.32	348.58	1.74
	1385.347	394.12	394.93	-0.82
Sumatoria				0.00

Fuente: elaboración propia.

Evaluación de la exactitud

Determinación de la exactitud para la validación del perfil de disolución a pH 1.2

Cuadro 52. Datos de la solución estándar al 100%

Número	Concentración (mg/L)	Lectura
1	260.8813	485.0116
2		487.9614
3		500.9593
Promedio		491.3108

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 53. Datos para la exactitud de la solución muestra al 33%

Número	Concentración (mg/L)	Lectura	Porcentaje de recuperación (%)
1	88.9285	163.8165	96.4
2		169.4110	99.7
3		166.9929	98.3
Recuperación promedio			98.2
Coeficiente de variación			1.7

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 54. Datos para la exactitud de la solución muestra al 100%

Exactitud de la solución muestra al 100%			
Número	**Concentración (mg/L)**	**Lectura**	**Porcentaje de recuperación (%)**
1	266.7854	511.1758	100.3
2		507.4134	99.6
3		516.5316	101.4
Recuperación promedio			100.4
Coeficiente de variación			0.9

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 55. Datos para la exactitud de la solución muestra al 167%

Exactitud de la solución muestra al 167%			
Número	**Concentración (mg/L)**	**Lectura**	**Porcentaje de recuperación (%)**
1	400.1781	769.7008	100.7
2		776.8441	101.6

3		782.6365	102.4
Recuperación promedio			101.6
Coeficiente de variación			0.8

Fuente: elaboración propia.

Determinación de la exactitud para la validación del perfil de disolución a pH 4.5

Cuadro 56. Datos de la solución estándar al 100%

Número	Concentración (mg/L)	Lectura
1	262.7272	932.8850
2		935.8129
3		938.3921
Promedio		935.6966

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 57. Datos para la exactitud de la solución muestra al 33%

Número	Concentración (mg/L)	Lectura	Porcentaje de recuperación (%)
1	87.5811	306.5575	97.7
2		311.9080	99.4
3		315.8806	100.7
Recuperación promedio			99.3
Coeficiente de variación			1.5

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 58. Datos para la exactitud de la solución muestra al 100%

Exactitud de la solución muestra al 100%			
Número	**Concentración (mg/L)**	**Lectura**	**Porcentaje de recuperación (%)**
1	262.7434	942.1863	100.1
2		933.2260	99.1
3		926.5465	98.4
Recuperación promedio			99.2
Coeficiente de variación			0.8

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 59. Datos para la exactitud de la solución muestra al 167%

Exactitud de la solución muestra al 167%			
Número	**Concentración (mg/L)**	**Lectura**	**Porcentaje de recuperación (%)**
1	394.1151	1388.0425	98.3
2		1401.8287	99.3
3		1394.2047	98.7
Recuperación promedio			98.8
Coeficiente de variación			0.5

Fuente: elaboración propia.

Determinación de la exactitud para la validación del perfil de disolución a pH 6.8

Cuadro 60. Datos de la solución estándar al 100%

Número	Concentración (mg/L)	Lectura
1	262.8084	933.253
2		915.529
3		921.375
Promedio		923.3859

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 61. Datos para la exactitud de la solución muestra al 33%

Número	Concentración (mg/L)	Lectura	Porcentaje de recuperación (%)
1	87.5811	310.5132	100.3
2		311.9581	100.8
3		309.5528	100.0
Recuperación promedio			100.4
Coeficiente de variación			0.4

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 62. Datos para la exactitud de la solución muestra al 100%

Exactitud de la solución muestra al 100%			
Número	**Concentración (mg/L)**	**Lectura**	**Porcentaje de recuperación (%)**
1	262.7434	921.3240	99.2
2		928.3643	100.0
3		928.3643	100.0
Recuperación promedio			99.7
Coeficiente de variación			0.4

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 63. Datos para la exactitud de la solución muestra al 167%

Exactitud de la solución muestra al 167%			
Número	**Concentración (mg/L)**	**Lectura**	**Porcentaje de recuperación (%)**
1	394.1151	1366.9918	98.1
2		1378.2367	98.9
3		1385.3470	99.4
Recuperación promedio			98.8
Coeficiente de variación			0.7

Fuente: elaboración propia.

Evaluación de la precisión

Cuadro 64. Datos de la precisión para la validación del perfil de disolución a pH 1.2

PRECISIÓN AL 33%	
Muestra	**Recuperación**
1	96.4
2	99.7
3	98.3
PRECISIÓN AL 100%	
Muestra	**Recuperación**
1	100.3
2	99.6
3	101.4
PRECISIÓN AL 167%	
Muestra	**Recuperación**
1	100.7
2	101.6

3	102.4
Promedio	100.1
Coeficiente de variación	1.8

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 65. Datos de la precisión para la validación del perfil de disolución a pH 4.5

PRECISIÓN AL 33%	
Muestra	**Recuperación**
1	97.7
2	99.4
3	100.7
PRECISIÓN AL 100%	
Muestra	**Recuperación**
1	100.1
2	99.1
3	98.4
PRECISIÓN AL 167%	
Muestra	**Recuperación**
1	98.3
2	99.3
3	98.7
Promedio	99.1
Coeficiente de variación	0.9

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 66. Datos de la precisión para la validación del perfil de disolución a pH 6.8

PRECISIÓN AL 33%	
Muestra	**Recuperación**
1	100.3
2	100.8
3	100.0
PRECISIÓN AL 100%	
Muestra	**Recuperación**
1	99.2
2	100.0
3	100.0
PRECISIÓN AL 167%	
Muestra	**Recuperación**
1	98.1
2	98.9
3	99.4
Promedio	99.6
Coeficiente de variación	0.8

Fuente: elaboración propia.

Anexo 4. Análisis de datos por medio de regresión lineal

Regresión lineal para la exactitud

Figura 37. Regresión lineal para la exactitud del pH 1.2

Resumen

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,99985311
Coeficiente de determinación R^2	0,999706241
R^2 ajustado	0,999664276
Error típico	4,851561427
Observaciones	9

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	560715,773	560715,7731	23822,0814	1,26459E-13
Residuos	7	164,763538	23,53764828		
Total	8	560880,537			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*	*Inferior 95%*	*Superior 95%*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Intercepción	-8,32135527	3,58177031	-2,323252064	0,05313933	-16,79089621	0,14818567	-16,7908962	0,14818567
Variable X 1	1,957693722	0,01268396	154,3440358	1,2646E-13	1,927700921	1,98768652	1,92770092	1,98768652

Fuente: elaboración propia.

Figura 38. Regresión lineal para la exactitud del pH 4.5

Resumen

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,99991901
Coeficiente de determinación R^2	0,99983803
R^2 ajustado	0,99981489
Error típico	6,40587518
Observaciones	9

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	1773193,976	1773193,976	43211,4961	1,57383E-14
Residuos	7	287,2466575	41,03523679		
Total	8	1773481,222			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*	*Inferior 95%*	*Superior 95%*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Intercepción	2,85986748	4,729276106	0,604715693	0,56444704	-8,323093495	14,0428284	-8,3230935	14,04282845
Variable X 1	3,53493705	0,017005211	207,8737504	1,5738E-14	3,494726113	3,57514798	3,49472611	3,575147984

Fuente: elaboración propia.

Figura 39. Regresión lineal para la exactitud del pH 6.8

Resumen

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,99991823
Coeficiente de determinación R^2	0,99983648
R^2 ajustado	0,99981311
Error típico	6,33669681
Observaciones	9

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	1718578,55	1718578,55	42799,9764	1,6274E-14
Residuos	7	281,076085	40,1537265		
Total	8	1718859,62			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*	*Inferior 95%*	*Superior 95%*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Intercepción	7,61565757	4,67820368	1,62790209	0,14757035	-3,44653631	18,6778514	-3,44653631	18,6778514
Variable X 1	3,48007219	0,01682157	206,881552	1,6274E-14	3,44029551	3,51984888	3,44029551	3,51984888

Fuente: elaboración propia.

Regresión lineal para la evaluación de la linealidad del sistema

Figura 40. Regresión lineal para la linealidad del sistema a pH 1.2

Resumen

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,997573563
Coeficiente de determinación R^2	0,995153014
R^2 ajustado	0,994780169
Error típico	16,70387204
Observaciones	15

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	744724,7659	744724,7659	2669,079366	1,96E-16
Residuos	13	3627,251433	279,019341		
Total	14	748352,0173			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*	*Inferior 95%*	*Superior 95%*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Intercepción	-2,895096077	10,67659163	-0,27116295	0,79052371	-25,96046999	20,1702778	-25,96047	20,1702778
Variable X 1	2,0008229	0,038728253	51,66313353	1,96384E-16	1,917155596	2,0844902	1,9171556	2,0844902

Fuente: elaboración propia.

Figura 41. Regresión lineal para la linealidad del sistema a pH 4.5

Resumen

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,99921005
Coeficiente de determinación R^2	0,99842073
R^2 ajustado	0,99829925
Error típico	16,5862771
Observaciones	15

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	2260993,83	2260993,83	8218,67	1,34E-19
Residuos	13	3576,35965	275,104588		
Total	14	2264570,19			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*	*Inferior 95%*	*Superior 95%*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Intercepción	-1,24963815	10,6014286	-0,1178745	0,90796889	-24,1526323	21,653356	-24,1526323	21,653356
Variable X 1	3,46177167	0,03818543	90,6568806	1,3393E-19	3,37927707	3,54426627	3,37927707	3,54426627

Fuente: elaboración propia.

Figura 42. Regresión lineal para la linealidad del sistema a pH 6.8

Resumen

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,999792614
Coeficiente de determinación R^2	0,999585272
R^2 ajustado	0,999553369
Error típico	8,576461699
Observaciones	15

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	2304706,6	2304706,6	31332,8097	2,25E-23
Residuos	13	956,2240386	73,55569528		
Total	14	2305662,824			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*	*Inferior 95%*	*Superior 95%*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Intercepción	6,618981057	5,481805595	1,20744542	0,24877058	-5,223739932	18,461702	-5,22373993	18,461702
Variable X 1	3,493994932	0,019738884	177,0107615	2,2499E-23	3,451351665	3,5366382	3,45135166	3,5366382

Fuente: elaboración propia.

Regresión lineal para la evaluación de la linealidad del método

Figura 43. Regresión lineal para la linealidad del método a pH 1.2

Resumen

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,99961811
Coeficiente de determinación R^2	0,99923637
R^2 ajustado	0,99917763
Error típico	6,56029164
Observaciones	15

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	732107,075	732107,075	17010,9399	1,19E-21
Residuos	13	559,486542	43,0374263		
Total	14	732666,561			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*	*Inferior 95%*	*Superior 95%*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Intercepción	-4,52431679	4,19313286	-1,07898245	0,30020875	-13,5830296	4,53439602	-13,5830296	4,53439602
Variable X 1	1,93989835	0,01487356	130,425994	1,1899E-21	1,907765988	1,97203072	1,90776599	1,97203072

Fuente: elaboración propia.

Figura 44. Regresión lineal para la linealidad del método a pH 4.5

Resumen

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,99988637
Coeficiente de determinación R^2	0,99977275
R^2 ajustado	0,99975527
Error típico	6,43570716
Observaciones	15

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	2368836,75	2368836,752	57192,96129	4,51E-25
Residuos	13	538,438246	41,41832664		
Total	14	2369375,19			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*	*Inferior 95%*	*Superior 95%*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Intercepción	-0,7806112	4,11350237	-0,18976802	0,852421914	-9,667292785	8,10607039	-9,66729278	8,10607039
Variable X 1	3,54314917	0,01481556	239,1504992	4,50745E-25	3,511142097	3,57515625	3,5111421	3,57515625

Fuente: elaboración propia.

Figura 45. Regresión lineal para la linealidad del método a pH 6.8

Resumen

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,99990047
Coeficiente de determinación R^2	0,99980095
R^2 ajustado	0,99978564
Error típico	5,90734479
Observaciones	15

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	2278664,72	2278664,72	65297,385	1,9051E-25
Residuos	13	453,657391	34,8967224		
Total	14	2279118,38			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*	*Inferior 95%*	*Superior 95%*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Intercepción	6,42341819	3,77578969	1,70121186	0,11268331	-1,73367952	14,5805159	-1,73367952	14,5805159
Variable X 1	3,47505822	0,01359923	255,53353	1,9051E-25	3,44567888	3,50443756	3,44567888	3,50443756

Fuente: elaboración propia.

Anexo 5. Marca y pureza de los materiales utilizados

Cuadro 67. Marca y lote de las tabletas y estándar secundario utilizados

Producto	Lote
Estándar secundario de azitromicina dihidrato (trazado contra estándar USP)	ES-14
Tabletas recubiertas de Zithromax (94.9%)	DT0742

Fuente: elaboración propia.

Por confidencialidad, no se adjunta lote del medicamento genérico utilizado en las pruebas.

Cuadro 68. Marca y pureza de reactivos utilizados

Reactivo	Marca	Grado
Ácido clorhídrico	Merck	Reactivo
Fosfato monobásico de potasio	Merck	Reactivo
Hidróxido de sodio (lentejas)	Merck	Reactivo
Ácido acético glacial	Merck	Reactivo
Acetonitrilo	Merck	HPLC
Cloruro de potasio	Merck	Reactivo

Fuente: elaboración propia.