

Universidad Nacional del Nordeste
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura

**Los AINE (anti-inflamatorios no
esteroideos) frente a reactivos químicos
que posibiliten su cuantificación en
formulaciones farmacéuticas**

CELINA MARÍA MONZÓN

**Tesis para optar al grado académico de
Doctor de la Universidad Nacional del Nordeste en Química**

2013

“Para investigar la verdad es preciso dudar,
en cuanto sea posible, de todas las cosas”.

René Descartes
(1596-1650)

Reconocimiento

Debo agradecer a quienes me acompañaron en los estudios que culminan en esta tesis.

A mis directores Mario Raúl Delfino y María del Carmen Sarno, por iniciarme en la investigación, por su excelencia académica y su enorme calidez humana.

A mis compañeros de trabajo Mario Delfino (h), Cecilia Castro, Mariángeles Gangemi, y Daniel Lotero, por los pequeños y los grandes aportes a esta tesis y por un camino compartido, todos de la Universidad Nacional del Nordeste.

A Nelly Jorge por su valioso aporte en el análisis cinético.

También a los integrantes del LADAQ, de la Universidad Nacional del Litoral, en especial a Luciana Vera-Candioti, por abrirme las puertas de su grupo de trabajo.

A mis padres, María Celia y Jorge, por haberme orientado, quizás sin saberlo, hacia el camino de la ciencia, y por despertar en mí el deseo del conocimiento.

A mis hermanas: Fernanda, Nolly y María Emilia, por su presencia y apoyo constante en esta etapa tan difícil.

Y a Ramiro, Constanza y Guillermina, porque sin ellos, mi vida no tendría sentido.

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras	iv
Índice de tablas	vii
Resumen	viii
Objetivos	x
Contenidos	x

1. Introducción

1.1 Tratamiento farmacológico del dolor	1
1.1.1 Paracetamol	3
1.1.2 Diclofenac	5
1.1.3 Ibuprofeno	6
1.2 Derecho a la salud	7
1.3 Medicamentos genéricos	8
1.4 Metodologías oficiales de análisis para: paracetamol, diclofenac e ibuprofeno	10
1.5 Metodologías alternativas de análisis	12
1.6 Validación de métodos analíticos	13
1.6.1 Exactitud	13
1.6.2 Precisión	13
1.6.3 Especificidad	14
1.6.4 Límite de detección	14
1.6.5 Límite de cuantificación	14
1.6.6 Linealidad e intervalo	15
1.6.7 Robustez	15
1.6.8 Datos requeridos para la validación de un método analítico	16

2. Espectrofotometría

2.1 Introducción teórica	18
2.1.1 Fundamentos	18
2.1.2 Equipamiento	19
2.2 EXPERIMENTAL 1: Atributos analíticos de un método espectrofotométrico para cuantificación de diclofenac	21

3. Métodos cinéticos

3.1 Introducción teórica	27
3.1.1 Fundamentos	27
3.1.2 Velocidades de reacción	27
3.1.3 Métodos de determinación de $[A]_0$ y k a partir de velocidades de reacción	30
3.1.4 Efecto de la temperatura	33
3.1.5 Teoría del estado de transición	34
3.2 EXPERIMENTAL 2: La cinética química en la cuantificación de paracetamol en formulaciones farmacéuticas	36

3.3 EXPERIMENTAL 3: Método cinético espectrofotométrico para cuantificación de diclofenac	40
4. Métodos Electroquímicos	
4.1 Técnicas electroanalíticas	47
4.1.1 Fundamentos	47
4.2 Culombimetría	48
4.2.1 Fundamentos	48
4.2.2 Titulación culombimétrica	48
4.3 EXPERIMENTAL 4: Culombimetría del paracetamol a partir de comprimidos farmacéuticos	50
4.4 EXPERIMENTAL 5: Diclofenac por culombimetría amperostática	53
4.5 Conductimetría	57
4.5.1 Fundamentos	57
4.5.2 Titulación conductimétrica	58
4.6 EXPERIMENTAL 6: Cuantificación de paracetamol en comprimidos por titulación conductimétrica	61
5. Separaciones Analíticas: Métodos Cromatográficos Y Electroforesis Capilar	
5.1 Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC)	65
5.1.1 Fundamentos	65
5.1.2 Equipamiento	67
5.2 Electroforesis Capilar (CE)	74
5.2.1 Fundamentos	74
5.2.2 Equipamiento	75
5.2.3 Modos electroforéticos	77
6. Farmacocinética	
6.1 Introducción teórica	78
6.1.1 Caracterización del proceso de disolución	80
Parámetros Modelo Dependientes	80
Parámetros Modelo Independientes	84
Comparación de perfiles de disolución	85
6.1.2 Modalidades de ensayo de disolución	85
6.2 EXPERIMENTAL 7: Seguimiento del perfil de disolución de comprimidos de diclofenac por CE	88
6.3 Estabilidad de drogas	99
6.3.1 Degradación	100
6.3.2 Estudios de estabilidad	100
6.3.3 Descomposición química en estado sólido	101
6.3.4 Métodos de ensayo indicadores de estabilidad	102
6.3.5 Estudios de descomposición forzados para generar productos de degradación de la droga	102

6.4 EXPERIMENTAL 8: Estabilidad de paracetamol	103
6.5 EXPERIMENTAL 9: Disolución de comprimidos genéricos de ibuprofeno almacenados en condiciones de temperatura y humedad elevadas	108
6.6 EXPERIMENTAL 10: Fotólisis del diclofenac en presencia de excipientes	114
7. Conclusiones generales	121
8. Publicaciones generadas a partir de la presente tesis	123
9. Presentaciones en jornadas científicas	124
10. Bibliografía	126

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Introducción

Figura 1	Mecanismo de acción de bradiquinina	1
Figura 2	Sopa Inflamatoria	2
Figura 3	Estructura química del N-(4-hidroxifenil) acetamida (paracetamol)	4
Figura 4	Estructura química del (2-[2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil]acetato de sodio) (diclofenac)	5
Figura 5	Estructura química del ácido 2-(4-isobutilfenil)propiónico (ibuprofeno)	7

2. Espectrofotometría

Figura 6	Atenuación de un haz de radiación por una disolución absorbente	18
Figura 7	Espectrofotómetro de haz simple	20
Figura 8	Espectrofotómetro de doble haz	21
Figura 9	Reacción de formación de ferroína	22
Figura 10	Curva de calibración y Especificidad	24

3. Métodos cinéticos

Figura 11	Decaimiento exponencial	28
Figura 12	$[X]$ en unidades de $[X]_0$ versus tiempo	29
Figura 13	Trazado semilogarítmico de $[X]/[X]_0$ versus tiempo	29
Figura 14	Método cinético diferencial	31
Figura 15	Método de tiempo fijo	32
Figura 16	Método de tiempo variable	33
Figura 17	Gráfico de Arrhenius	34
Figura 18	Estructura química de la bencidina	37
Figura 19	Absorbancia vs. tiempo para distintos niveles de concentración de paracetamol-bencidina	38
Figura 20	Absorbancias para un tiempo fijo de reacción vs. concentración de paracetamol	39
Figura 21	Absorbancia vs. tiempo para distintos niveles de concentración de diclofenac	42
Figura 22	Curva de calibración método cinético diferencial	43
Figura 23	Gráfico de Arrhenius correspondiente a la oxidación de Diclofenac con KMnO_4 en medio fuertemente ácido	45

4. Métodos Electroquímicos

Figura 24	Equipo para titulaciones coulombimétricas	49
Figura 25	Titulación coulombimétrica de paracetamol	52
Figura 26	Método de la primera derivada	52
Figura 27	Carga consumida vs masa de paracetamol	53
Figura 28	Titulación coulombimétrica de diclofenac y placebo	55
Figura 29	Método de la primera derivada	56
Figura 30	Carga consumida vs masa de diclofenac	56
Figura 31	Curvas de titulaciones conductimétricas	60

Figura 32	Puente de Wheatstone para medición de conductancia	61
Figura 33	Titulación conductimétrica de paracetamol con NaOH y en presencia de amoníaco	63

5. Separaciones Analíticas: Métodos Cromatográficos Y Electroforesis Capilar

Figura 34	Tipos de cromatografía	66
Figura 35	Esquema de un equipo de HPLC	67
Figura 36	Bomba recíproca de HPLC	68
Figura 37	Sistema de inyección por bucles	69
Figura 38	Columna de HPLC	69
Figura 39	Detector UV	72
Figura 40	Detector de doble haz	73
Figura 41	Detector de arreglo de diodos	74
Figura 42	Principio separativo de Electroforesis Capilar	75
Figura 43	Equipamiento de Electroforesis Capilar	76

6. Farmacocinética

Figura 44	Procesos LADME	78
Figura 45	Modelo de la capa de difusión	81
Figura 46	Disolutor Vankel 7000	87
Figura 47	Paleta del disolutor	87
Figura 48	Electroferograma de diclofenac principio activo	91
Figura 49	Curva de calibración (relación de áreas diclofenac/paracetamol) vs Concentración de diclofenac	92
Figura 50	Electroferograma de placebo	93
Figura 51	Perfil de Disolución de Diclofenac	95
Figura 52	Métodos Modelo Dependientes. Orden cero	97
Figura 53	Métodos Modelo Dependientes. Primer orden	97
Figura 54	Métodos Modelo Dependientes. Raíz cúbica o modelo de Hixson Crowell	98
Figura 55	Métodos Modelo Dependientes. Raíz cuadrada o modelo de Higuchi	98
Figura 56	Métodos Modelo Dependientes. Función de Weibull	99
Figura 57	Perfil de disolución del paracetamol luego de 15 días de almacenamiento	104
Figura 58	Perfil de disolución del paracetamol luego de 90 días de almacenamiento	105
Figura 59	Perfil de disolución del paracetamol luego de 180 días de almacenamiento	105
Figura 60	Luego de 180 días de almacenamiento, modelo cinético de primer orden	107
Figura 61	Luego de 180 días de almacenamiento, modelo cinético de raíz cúbica	107
Figura 62	Perfil de disolución del ibuprofeno luego de 15 días de almacenamiento	110
Figura 63	Perfil de disolución del ibuprofeno luego de 90 días de almacenamiento	110
Figura 64	Perfil de disolución del ibuprofeno luego de 180 días de almacenamiento	111

Figura 65	Comparación de perfiles de disolución de comprimidos de ibuprofeno de diferente origen	111
Figura 66	Luego de 180 días de almacenamiento, modelo cinético de Weibull	113
Figura 67	Luego de 180 días de almacenamiento, modelo cinético de primer orden	113
Figura 68	Cámara de irradiación	115
Figura 69	Espectro de absorción de diclofenac tratado y sin tratar	116
Figura 70	Selección del pH	117
Figura 71	Absorbancia vs. tiempo para distintos niveles de concentración de diclofenac principio activo	118
Figura 72	Absorbancia vs. tiempo para distintos niveles de concentración de diclofenac comprimidos	118
Figura 73	Curva de calibración método cinético diferencial	119
Figura 74	Efecto protector del precompactado verde	120

ÍNDICE DE TABLAS

1. Introducción

Tabla 1	Propiedades físico químicas del paracetamol	4
Tabla 2	Propiedades físico químicas del diclofenac	5
Tabla 3	Propiedades físico químicas del ibuprofeno	7
Tabla 4	Datos requeridos para la validación de un método analítico	17

2. Espectrofotometría

Tabla 5	Precisión (Repetibilidad)	25
Tabla 6	Precisión Intermedia	25
Tabla 7	Exactitud (Recuperación)	26

3. Métodos cinéticos

Tabla 8	Exactitud (Recuperación)	43
Tabla 9	Precisión (Repetibilidad)	44
Tabla 10	Comparación estadística entre el método cinético espectrofotométrico y el método de referencia (HPLC)	45

4. Métodos Electroquímicos

Tabla 11	Conductancias Iónicas Equivalentes a Dilución Infinita y 25°C	62
----------	---	----

5. Separaciones Analíticas: Métodos Cromatográficos Y Electroforesis Capilar

Tabla 12	Fases estacionarias de uso frecuente en HPLC	70
Tabla 13	Comparación de detectores usados en HPLC	72

6. Farmacocinética

Tabla 14	Sistema de clasificación biofarmacéutica	79
Tabla 15	Expresiones de las variables regresionales para cada modelo cinético	84
Tabla 16	Precisión (Repetibilidad)	93
Tabla 17	Exactitud (porcentajes de recuperación de analito en sobreagregados de placebo)	94
Tabla 18	Comparación estadística del método electroforético con el método de referencia	94
Tabla 19	Comparación de valores de r^2 y AIC de los modelos cinéticos estudiados	96
Tabla 20	Condiciones para un estudio de estabilidad (ICH)	101
Tabla 21	Modelos cinéticos estudiados en el perfil de disolución de paracetamol en distintas condiciones de almacenamiento	106
Tabla 22	Modelos cinéticos estudiados en el perfil de disolución de ibuprofeno en distintas condiciones de almacenamiento	112

RESUMEN

La política de los genéricos a nivel nacional ha conducido al desarrollo de metodologías analíticas para el control de calidad de las especialidades farmacéuticas en cada región del país. Esta tesis responde eficazmente a resolver parte del control analítico de drogas de producción pública que son distribuidas en forma gratuita en centros de salud, dirigiéndose en particular a los medicamentos utilizados en el tratamiento del dolor.

Los AINE (Anti-Inflamatorios No Esteroideos) constituyen uno de los grupos de medicamentos más prescritos en la práctica médica, dado que ejercen tres acciones clínicas fundamentales: analgésica, antiinflamatoria y antipirética.

Las farmacopeas británica, estadounidense, europea así como la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) promueven la incorporación de otras metodologías innovadoras en sus monografías, referentes a los ensayos de cuantificación, uniformidad en comprimidos, estabilidad y disolución *in vitro*.

En concordancia con ello, este estudio, se orientó al desarrollo de métodos analíticos espectroscópicos y electroquímicos, metodológicamente más simples, para el control de calidad de comprimidos de AINE. Se consideraron relevantes los parámetros analíticos de exactitud, precisión, reproducibilidad y robustez, los que se ajustan a los criterios de aceptabilidad establecidos para los métodos de referencia y completan la validación de los métodos propuestos.

Las experiencias fueron realizadas sobre lotes de los comprimidos de: paracetamol de 500 mg, diclofenac de 50 mg e ibuprofeno de 400 mg, producidos por la Planta de Medicamentos de Corrientes (PLAMECOR).

Atendiendo a la estructura química de estos compuestos y en consecuencia a su reactividad, se ensayaron diversos procedimientos de análisis tanto sobre los principios activos, como los comprimidos y el placebo formulado con los excipientes presentes en el preparado farmacéutico. Fruto de este exhaustivo estudio surgieron los métodos de análisis que se resumen a continuación, algunos de los cuales ya han sido publicados en revistas científicas.

Se desarrolló y validó un método espectrofotométrico basado en la reacción redox que ocurre entre el diclofenac y el hierro, en presencia de o- fenantrolina, que resultó útil para el control de calidad de comprimidos (Publicado en *Latin American Journal of Pharmacy*).

El método cinético de tiempo fijo por diazotación con bencidina, como reactivo azoico, es aplicable a la cuantificación de paracetamol en comprimidos. La aplicación de una técnica cinética espectrofotométrica en el visible, utilizando KMnO_4 en medio ácido posibilitó el control de calidad de los comprimidos de diclofenac de 50 mg, sin interferencias de los excipientes (Publicado en *IOSR Journal of Pharmacy*).

Se logró la valoración coulombimétrica con bromo de los comprimidos de 500 mg de paracetamol con precisión aceptable en un tiempo breve de análisis sin interferencias por parte de los excipientes y con instrumental de bajo costo. El mismo método electroquímico, utilizando cloro generado *in situ* fue implementado para comprimidos de diclofenac. El tratamiento previo de la muestra se redujo simplemente a la disolución acuosa del comprimido, El bajo costo inicial y de mantenimiento del instrumento, completan el cuadro que lo hacen aplicable como alternativa para el control de calidad del diclofenac

presente en mono fármacos. El método de titulación conductimétrica con NaOH, en presencia de NH_3 resultó útil para el control de calidad de comprimidos de paracetamol.

Los métodos expuestos son simples, rápidos, específicos, lineales en el rango estudiado, y permiten la cuantificación de estos AINE sin procesos extractivos preliminares. Los de naturaleza electroquímica, adicionan a estas características, ser de fácil automatización.

Estas cualidades los hacen competitivos con el método de referencia, HPLC-UV establecido por el ANMAT en su farmacopea y por la farmacopea de los Estados Unidos (USP). Esta comparación efectuada con bases estadísticas mediante el test F y el test t de Student, avalan la aplicabilidad de los procedimientos alternativos propuestos para el control de calidad de los AINE: paracetamol, diclofenac e ibuprofeno en comprimidos genéricos que los contengan como monodroga.

Completan esta tesis, estudios farmacocinéticos de las drogas mencionadas. Se confirmó la utilidad de la Electroforesis Capilar en el control de calidad y su simplicidad para el monitoreo de la disolución de comprimidos de diclofenac en tiempos cortos de análisis. Adicionalmente el perfil de disolución ajustó al modelo de raíz cúbica, alcanzándose la disolución de la droga en 20 minutos (Publicado en Current Pharmaceutical Analysis). Por otra parte, se estudió la estabilidad de paracetamol e ibuprofeno, durante un período de 6 meses, considerando condiciones extremas de almacenamiento. Y finalmente, se estudió el proceso de degradación fotolítica de comprimidos de diclofenac sódico, que al ser irradiados por luz UV de 254 nm, siguen una cinética de pseudo orden cero, dependiendo la velocidad de reacción de la concentración inicial del ingrediente activo.

OBJETIVOS

Objetivos Generales

- Proponer métodos analíticos alternativos a los establecidos en las farmacopeas internacionales, que permitan la cuantificación de AINE y presenten ventajas principalmente en cuanto a costos, sencillez, tiempo de análisis y factibilidad de automatización.
- Partir de las estructuras moleculares de dichas drogas para diseñar procedimientos analíticos que respondan sensiblemente a sus propiedades fisicoquímicas.
- Desarrollar las fases analíticas conducentes a la validación de los métodos propuestos ante el ANMAT.

Objetivos Particulares

1. Optimizar las condiciones experimentales que permitan la aplicación de nuevos métodos analíticos a comprimidos de AINE producidos por PLAMECOR.
2. Evaluar en los métodos que se propongan los parámetros analíticos de calidad: a) linealidad b) precisión (repetibilidad, reproducibilidad y robustez) c) exactitud d) selectividad (especificidad), que permitan asegurar confiabilidad de su aplicación.
3. Aportar con el desarrollo de trabajos de investigación al plan “Red de Laboratorios Estatales de Medicamentos y su Articulación con el Sector Científico- Tecnológico” impulsado por la SECYT.

CONTENIDOS

Los AINE (anti-inflamatorios no esteroideos) conforman un grupo farmacológico variado desde el punto de vista químico, que tiene la capacidad de inhibir a la enzima ciclooxigenasa. Al neutralizar la acción de ésta con el consecuente bloqueo de la síntesis de prostaglandinas, ejercen tres acciones clínicas fundamentales: analgésica, antiinflamatoria y antipirética. Entre ellos se sitúan: diclofenac, paracetamol e ibuprofeno. La selección del tema propuesto viene como corolario de la política de especialidades farmacéuticas genéricas a nivel nacional, que promueve no solamente la mejora en su producción, sino el desarrollo de metodologías analíticas que aseguren su calidad en cada región del país, por lo que este trabajo responde eficazmente a resolver parte del control analítico de drogas de ventana terapéutica estrecha.

En el **Capítulo 1** se describe la acción farmacológica de los AINE, sus propiedades físico-químicas; la legislación vigente para especialidades farmacéuticas; las metodologías oficiales de análisis y la necesidad de incorporar metodologías alternativas.

En el **Capítulo 2** se describen los Métodos Espectrofotométricos y el desarrollo de un método para cuantificación de diclofenac.

En el **Capítulo 3** se explican los Métodos Cinéticos y se exponen dos metodologías desarrolladas para la determinación de paracetamol y diclofenac, respectivamente.

En el **Capítulo 4** se abordan los Métodos Electroquímicos, con especial énfasis en las titulaciones coulombimétricas y conductimétricas. Se presentan los métodos desarrollados para cuantificación de paracetamol y diclofenac.

El **Capítulo 5** comprende los Métodos Separativos, se exponen HPLC y Electroforesis Capilar.

En el **Capítulo 6** se describen los principios de la Farmacocinética, se presentan el seguimiento de la disolución de diclofenac por electroforesis capilar; los estudios de estabilidad de paracetamol e ibuprofeno; y finalmente, la degradación fotolítica de diclofenac.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DEL DOLOR

El dolor es una manifestación normal de la vida cotidiana y presenta una función defensiva vital. Sin embargo, el dolor incontrolado puede disminuir dramáticamente la calidad de vida. Se asocia a menudo a un abanico de otros trastornos centrales, psicológicos y cambios profundos en la función autónoma.

El dolor puede subdividirse en una forma aguda y una forma crónica:

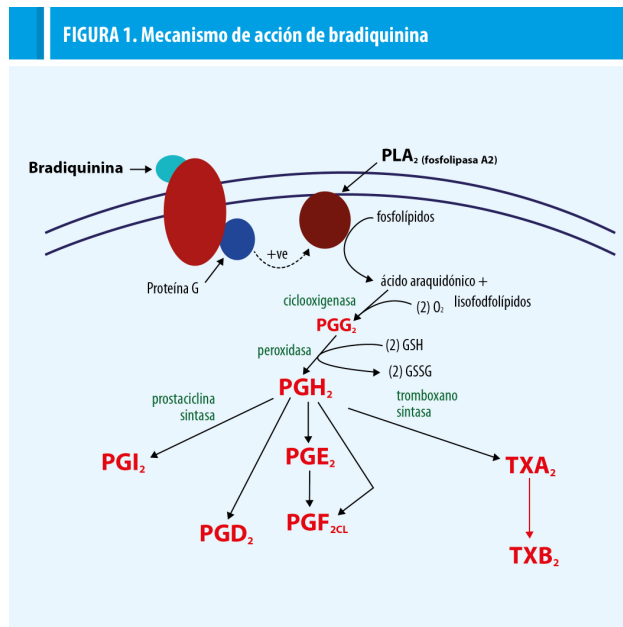
- el dolor agudo es de corta duración, generalmente persiste sólo durante la duración de la lesión tisular y representa una reacción de defensa del organismo natural y fisiológica.
- el dolor crónico se hace evidente cuando los mecanismos normales de curación han finalizado (en enfermedades como la artritis reumatoide puede persistir durante semanas, meses o incluso años).

El dolor es un componente importante de la respuesta al trauma (accidentes, quemaduras), a la cirugía (dolor post-operatorio) y a la enfermedad (artritis, cáncer, dolor cardíaco, crisis de talasemia, dolor miofacial).

La percepción del dolor se controla por una variedad de hormonas en lugares periféricos y neurotransmisores en lugares centrales. (Page y colaboradores, 2008)

Entre estos mediadores inflamatorios en tejidos periféricos se encuentran la bradiquinina y la histamina (Figura 1).

FIGURA 1. Mecanismo de acción de bradiquinina



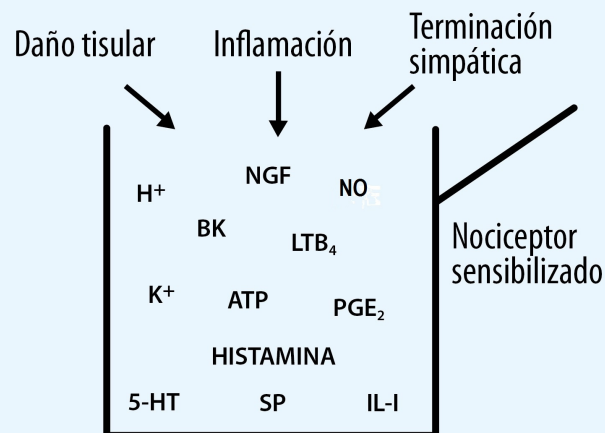
La bradiquinina actúa a través de receptores ligados a la Proteína G para producir una variedad de efectos proinflamatorios que incluyen la vasodilatación y el edema. La estimulación del receptor de la bradiquinina también desencadena la actividad enzimática de la fosfolipasa A₂ (FLA₂), unida a la membrana celular, lo cual produce la liberación de ácido araquidónico con la subsiguiente biosíntesis de prostaglandinas por acción de la ciclooxigenasa (COX).

La 5-hidroxitriptamina (5-HT) es otra hormona local que desencadena respuestas dolorosas. Se libera al degranularse los mastocitos en el lugar de la lesión tisular y desencadena una respuesta dolorosa muy intensa. También inducen actividad algésica una variedad de sustancias metabólicas liberadas de las células dañadas (Figura 2), como ser ATP, ácido láctico, K⁺, entre otros. La conjunción de todos éstos mediadores químicos, metabolitos y hormonas, se denomina “sopa inflamatoria o sensibilizante”. (Flores, 1997)

FIGURA 2. Sopa Inflamatoria

NGF: factor de crecimiento nervioso
NO: óxido nítrico
BK: bradiquinina
LTB₄: leucotrieno B₄

PGE₂: prostaglandina E₂
5-HT: 5 - hidroxitriptamina
SP: sustancia P
IL-1: interleuquina 1



Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) inhiben la enzima COX, y con ello la biosíntesis de prostaglandinas hiperalgésicas y proinflamatorias. Desde el punto de vista químico, forman un grupo de fármacos heterogéneo. Desde el

punto de vista farmacológico, los AINE tienen actividad antiinflamatoria, antipirética y analgésica. (Taylor y Reide, 1997)

Los AINE no alteran el umbral del dolor ni modifican los niveles de prostaglandinas cerebrales, por lo cual se considera que sus efectos son periféricos. La antipiresis es consecuencia de la vasodilatación periférica debido a una acción central sobre el centro regulador de la temperatura del hipotálamo.

Los efectos adversos de los AINE incluyen:

- hemorragias digestivas y úlceras. Esto se debe a la inhibición, a nivel gástrico de la formación de PGE_2 y PGI_2 (prostaglandina y prostaciclina), que son vasodilatadoras y citoprotectoras.
- inhibición de la agregación plaquetaria y aceleramiento del tiempo de coagulación como resultado de la inhibición de la formación plaquetaria de tromboxano A_2 , que es vasoconstrictor y proagregatorio.
- Otros efectos adversos incluyen: vértigos, cefalea, retención de agua y sales, trastornos auditivos y visuales, cambios en el pH sanguíneo, entre otros. (Page y colaboradores, 2008)

Estos medicamentos son de venta libre, lo cual hace que tengan una amplia difusión en el mercado.

La Planta de Medicamentos de Corrientes (PLAMECOR) produce solo 3 AINE: paracetamol, diclofenac e ibuprofeno, por lo cual el desarrollo de esta tesis se centra en estas 3 drogas.

1.1.1 PARACETAMOL

1.1.1.1 Generalidades

También conocido como acetaminofeno. Es un analgésico antipirético derivado de la acetanilida (Figura 3). Tiene acción antiinflamatoria leve. (Taylor y Reide, 1997)

1.1.1.2 Usos

El paracetamol se usa para aliviar dolores leves a moderados, como por ejemplo: cefaleas; estados gripales; dolores: musculares, menstruales, de garganta, dentales; reacciones a vacunas; y principalmente es usado como antipirético. El paracetamol alivia síntomas, pero no trata la causa de los mismos ni acelera la recuperación.

Se presenta en forma de comprimidos, cápsulas, gotas de administración oral y supositorios. PLAMECOR produce comprimidos de paracetamol 500 mg.

FIGURA 3. Estructura química del N-(4-hidroxifenil) acetamida (paracetamol)

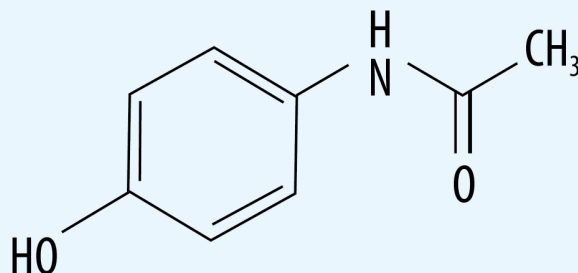


Tabla 1: Propiedades físico químicas del paracetamol

Propiedad química	
Fórmula molecular	$C_8H_9NO_2$
Peso molecular	151,16 g/mol
Densidad	1,293 g/cm ³
Punto de fusión	169°C
Solubilidad en agua	14,96 g/L (25°C)
pKa	9,5

(Extraído del Handbook of Chemistry and Physics, 2005)

1.1.1.3 Farmacocinética

El paracetamol se absorbe rápida y completamente por vía oral, lo mismo que por vía rectal. Las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan en función de la forma farmacéutica, en un tiempo de entre 0,5 a 2 horas. El paracetamol se distribuye rápidamente por todos los tejidos. Las concentraciones son similares en la sangre, la saliva y el plasma. La tasa de unión a las proteínas plasmáticas es baja, alrededor de un 25%. La biodisponibilidad es elevada, cercana al 100%. El paracetamol se metaboliza principalmente a nivel hepático. Las dos rutas metabólicas más importantes son la glucuronación y sulfuroconjugación. La eliminación es principalmente urinaria. El 90% de la dosis ingerida es eliminada por vía renal en 24 horas, en mayor medida como glucurónidos (60 a 80%) y como sulfoconjugados de forma minoritaria (20 a 30%). Menos del 5% se elimina sin modificar. La vida media del paracetamol es de 2-4 horas en los pacientes con la función hepática normal, siendo prácticamente indetectable en el plasma 8 horas después de su

administración. (American Society of Health System Pharmacist, National Library of Medicine, 2008)

1.1.2 DICLOFENAC

1.1.2.1 Generalidades

Es antiinflamatorio, analgésico y antipirético (Taylor y Reide, 1997), derivado del ácido fenilacético (Figura 4).

Está disponible en comprimidos de liberación rápida, comprimidos de liberación prolongada, supositorios, fórmulas inyectables, geles para aplicación local y también colirios. PLAMECOR produce comprimidos de diclofenac de 50 mg.

FIGURA 4. Estructura química del (2-[2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil] acetato de sodio) (diclofenac)

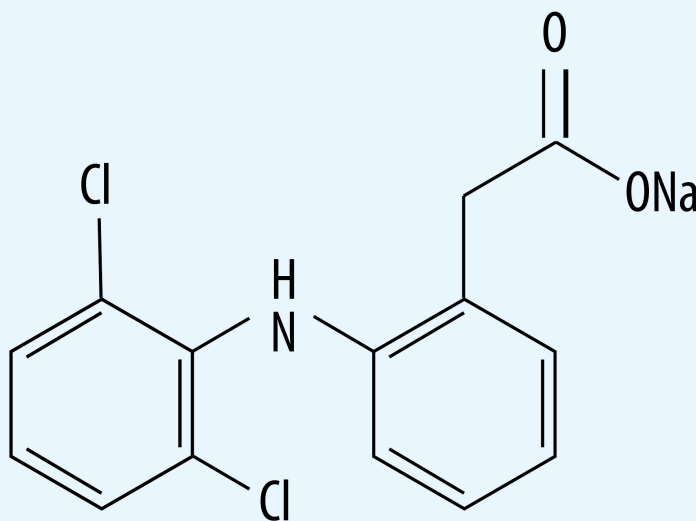


Tabla 2: Propiedades físico químicas del diclofenac

Propiedad química	
Fórmula molecular	$C_{14}H_{11}Cl_2NNaO_2$
Peso molecular	318,13 g/mol
Densidad	1,432 g/cm ³
Punto de fusión	287°C
Solubilidad en agua	0,031 g/L
pKa	4,15

(Extraído del Handbook of Chemistry and Physics, 2005)

1.1.2.2 Usos

El diclofenac es usado para tratar dolores crónicos de enfermedades músculo esqueléticas, como ser: osteoartritis (artritis debida al desgaste del revestimiento de las articulaciones); espondilitis anquilosante (artritis que afecta principalmente a la columna vertebral); artritis reumatoide (artritis debida a la inflamación del revestimiento articular). Es frecuentemente indicado para el tratamiento de las migrañas agudas. Se usa regularmente para tratar el dolor leve a moderado post-quirúrgico o tras un proceso traumático (quemaduras), particularmente cuando hay inflamación presente. Es el primer paso terapéutico establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el tratamiento del dolor asociado a procesos cancerígenos acompañados por inflamación.

1.1.2.3 Farmacocinética

Después de ser ingerido, el diclofenac se absorbe en forma rápida y completa por el tracto gastrointestinal. Su concentración plasmática máxima se obtiene de 2 a 3 horas luego de la administración. Se liga ampliamente a proteínas plasmáticas en un 99%. Se metaboliza en el hígado, luego de la glucoronidación y sulfonación, los metabolitos se excretan en orina, 65% y por bilis, 35%. Su vida media es de aproximadamente 2 horas. (American Society of Health System Pharmacist, National Library of Medicine, 2008)

1.1.3 IBUPROFENO

1.1.3.1 Generalidades

Es antiinflamatorio, analgésico y antipirético (Taylor y Reide, 1997), y deriva del ácido propiónico. (Figura 5).

Está disponible en comprimidos de liberación rápida, comprimidos de liberación prolongada, tabletas masticables, gotas, fórmulas inyectables y supositorios. PLAMECOR produce comprimidos de ibuprofeno de 400 mg.

1.1.3.2 Usos

Se lo usa en el tratamiento de procesos dolorosos de intensidad leve y moderada como el dolor dental, el dolor postoperatorio y el tratamiento sintomático de la cefalea; en el tratamiento de lesiones de tejidos blandos como torceduras o esguinces; para el alivio de sintomatología en dismenorrea primaria; y para el tratamiento sintomático de la fiebre. También se usa en el tratamiento de procesos reumáticos agudos o crónicos, como ser artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artrosis y otros. Es de acción más rápida que el diclofenac.

1.1.3.3 Farmacocinética

El ibuprofeno se absorbe en el tracto gastrointestinal, presentándose picos de concentraciones plasmáticas 15-30 minutos después de la administración. Al igual que el diclofenac, el ibuprofeno se une fuertemente a las proteínas plasmáticas. Se metaboliza en el hígado, dando lugar a 2 metabolitos inactivos que, se excretan por vía renal. Su vida media de eliminación es de unas 2 horas aproximadamente. (American Society of Health System Pharmacist, National Library of Medicine, 2008)

FIGURA 5. Estructura química del ácido 2-(4-isobutilfenil)propiónico (ibuprofeno)

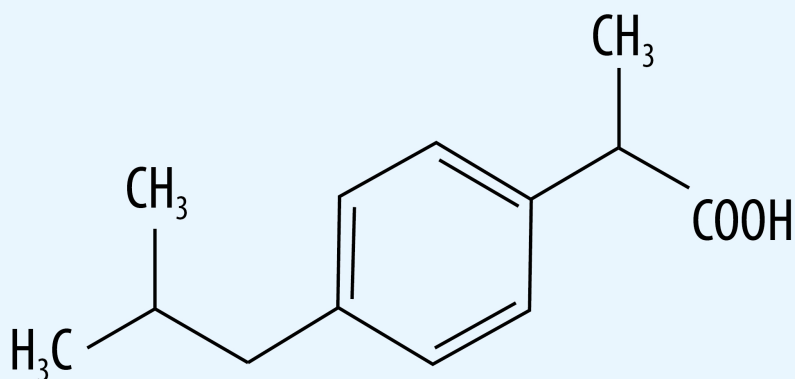


Tabla 3: Propiedades físico químicas del ibuprofeno

Propiedad química	
Fórmula molecular	$C_{13}H_{18}O_2$
Peso molecular	206,29 g/mol
Densidad	1,03 g/cm ³
Punto de fusión	76 °C
Solubilidad en agua	0,041 g/L
pKa	4,91

(Extraído del Handbook of Chemistry and Physics, 2005)

1.2 DERECHO A LA SALUD

El derecho a la salud es parte fundamental de los derechos humanos y de lo que se entiende por una vida digna. Se proclamó por primera vez en la Constitución de la OMS, de 1946, en cuyo preámbulo se define la salud como "un estado de completo bienestar físico, mental y social, y no solamente ausencia de afecciones y enfermedades". También se afirma que "el goce del grado máximo de salud que se pueda lograr es uno de los derechos

fundamentales de todo ser humano, sin distinción de raza, religión, ideología política, condición económica o social".

El derecho a la salud comprende algunos derechos como ser:

- El derecho a un sistema de protección de la salud que brinde a todos iguales oportunidades para disfrutar del más alto nivel posible de salud;
- El derecho a la prevención y el tratamiento de las enfermedades, y la lucha contra ellas;
- El acceso a medicamentos esenciales;
- La salud materna, infantil y reproductiva;
- El acceso igual y oportuno a los servicios de salud básicos;
- El acceso a la educación y la información sobre cuestiones relacionadas con la salud;
- La participación de la población en el proceso de adopción de decisiones en cuestiones relacionadas con la salud a nivel comunitario y nacional.

Deben facilitarse servicios, bienes e instalaciones de salud a todos sin discriminación. Éstos deben estar disponibles y ser accesibles, aceptables y de buena calidad. Por último, deben ser apropiados desde el punto de vista científico y médico. Ello requiere, entre otras cosas, personal médico capacitado, medicamentos y equipo hospitalario científicamente aprobados y en buen estado, agua potable y condiciones sanitarias adecuadas. (Extraído de Folleto informativo N°31 "El derecho a la salud". OACDH-OMS, 2008)

1.3 MEDICAMENTOS GENÉRICOS

La OMS, en Nairobi en 1985, afirmó que: "El uso racional de medicamentos requiere que el paciente reciba la medicación apropiada a su necesidad clínica, en las dosis correspondientes con sus requerimientos individuales, por un período adecuado de tiempo, y al menor costo para él y su comunidad."

"En la actualidad, el acceso de la población a los medicamentos esenciales para el cuidado de su salud constituye uno de los desafíos sociales más importantes para los Estados. Entendido en términos estrictos, el hecho de garantizar el acceso involucra no solo lograr la disponibilidad del medicamento cada vez que un ciudadano lo necesite, sino también garantizar un uso racional del mismo a un costo asequible. El acceso a los medicamentos constituye un elemento importante en la realización del derecho a la salud para todos y está reconocido entre los indicadores de las metas para el cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo del Milenio (ODM), entendido en el contexto del acceso a los servicios de salud, en especial en los sistemas de protección social." (Extraído de la guía para la implementación de estrategias de medicamentos genéricos en los países de América Latina y el Caribe como mecanismo para mejorar el acceso a medicamentos, elaborada por la Organización Panamericana de la Salud OPS/OMS, en junio de 2011).

La Ley N° 25649, de Especialidades Medicinales fue sancionada en 2002 por el Senado y la Cámara de Diputados de la Nación Argentina. En su artículo 4º, dicha ley define:

a) Medicamento: es toda preparación o producto farmacéutico empleado para la prevención, diagnóstico o tratamiento de una enfermedad o estado patológico, o para modificar sistemas fisiológicos en beneficio de la persona a quien se le administra.

b) Principio activo o monodroga: es toda sustancia química o mezcla de sustancias relacionadas, de origen natural, biogénico, sintético o semisintético que, poseyendo un efecto farmacológico específico, se emplea en medicina humana.

c) Nombre genérico: es la denominación de un principio activo, monodroga, o de una asociación de principios activos a dosis fijas, adoptada por la autoridad sanitaria, o en su defecto la denominación común internacional (DCI) de un principio activo o combinación de los mismos recomendada por la OMS.

d) Especialidad medicinal: es todo medicamento de composición cualitativa y cuantitativamente definida, declarada y verificable, de forma farmacéutica estable y de acción terapéutica comprobable debidamente autorizada por la autoridad sanitaria.

e) Especialidad medicinal genérica: es la especialidad medicinal identificada por el nombre genérico que corresponda a su composición.

f) Especialidad medicinal de referencia: es aquel medicamento debidamente habilitado como tal por la autoridad sanitaria nacional, cuya eficacia y seguridad terapéutica han sido científicamente comprobadas por su uso clínico y comercializado en el país por un laboratorio innovador. Cuando un producto que reúna estas características no se comercialice en el país, podrá utilizarse como especialidad medicinal de referencia a fin de comparar la especialidad medicinal genérica, aquella avalada por la OMS por haberse comprobado su acción terapéutica mediante su liderazgo en el mercado farmacéutico internacional.

En abril de 2002 inicia su producción la Planta de Medicamentos Genéricos de Corrientes (PLAMECOR) dependiente de Ministerio de Salud de dicha provincia. Al día de hoy, instalada en el predio del Hospital Pediátrico Juan Pablo II, produce 29 especialidades farmacéuticas: ácido fólico; albendazol; amlodipina; amoxicilina; atenolol; bromhexina; carbamacepina; cefalexina; ciprofloxacina; clonazepam; diazepam; diclofenac sódico; enalapril maleato; fenobarbital; furosemida; glibenclamida; haloperidol; hidroclorotiazida; ibuprofeno; mebendazol; metronidazol; metformina; metoclopramida; paracetamol; permetrina; permetrina + benzoato de bencilo; sulfato ferroso + ácido fólico; sulfato ferroso; sulfametoxazol + trimetoprima. Los destinatarios de esta producción son personas de escasos recursos, estos medicamentos genéricos son distribuidos de manera gratuita en toda la red de hospitales y centros de atención primaria de la salud a lo largo de la Provincia de Corrientes.

En el año 2007 se crea en Argentina la Red Nacional de Laboratorios Públicos Productores de Medicamentos. Esta red reúne laboratorios estatales (entre los que se encuentra PLAMECOR), dependientes de la administración nacional, de provincias, municipios, universidades, y organismos descentralizados; con el objetivo de promover la investigación y la producción de medicamentos a menor costo de los que se elaboran en laboratorios privados.

En Julio de 2011 se sanciona la Ley N° 26688, de Producción Pública de Medicamentos y Vacunas (PPMV). Dicha ley establece en su artículo 1º: "Declarar de interés nacional la investigación y producción pública de medicamentos, materias primas para la producción de medicamentos, vacunas y productos médicos entendiendo a los mismos como bienes sociales". En su artículo 2º declara: "es objeto de la presente ley promover la accesibilidad de

Medicamentos, vacunas y productos médicos y propiciar el desarrollo científico y tecnológico a través de laboratorios de producción pública”.

En el artículo 6º, esta ley establece entre sus objetivos: “f) Promover la articulación con instituciones académicas y científicas, y organizaciones de trabajadores y usuarios [...] i) Promover la investigación y docencia, así como la formación y capacitación de recursos humanos”.

En el artículo 8º: “Los laboratorios de producción pública pueden celebrar convenios con universidades u otras entidades estatales pertinentes para realizar el control de calidad de los medicamentos, vacunas y productos médicos”.

Es dentro de este marco, que se consolida un convenio entre PLAMECOR y el Laboratorio de Química Analítica Instrumental de FACENA-UNNE, en el año 2003.

1.4 METODOLOGÍAS OFICIALES DE ANÁLISIS PARA PARACETAMOL, IBUPROFENO, Y DICLOFENAC

La Farmacopea Argentina (FA) y la Farmacopea de los Estados Unidos (USP, del inglés *United States Pharmacopeia*) establecen en sus monografías, las metodologías oficiales de análisis para estas drogas.

1.4.1 Paracetamol comprimidos: Valoración

Sistema cromatográfico: Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector UV ajustado a 243 nm y una columna de 30 cm x 3,9 mm con una fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser de aproximadamente 1,5 mL/min.

Fase móvil: agua y metanol (3:1). Filtrar y desgasificar.

Preparación estándar: disolver una cantidad exactamente pesada de paracetamol sustancia de referencia, en la fase móvil, para obtener una solución de aproximadamente 0,01 mg/mL.

Preparación de la muestra: pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 comprimidos de paracetamol. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 100 mg de paracetamol, transferir a un matraz aforado de 200 mL, agregar 100 mL de la fase móvil y disolver mediante ondas de ultrasonido durante 10 min. Completar a volumen con la fase móvil y mezclar. Transferir 5 mL de esta solución a un matraz aforado de 250 mL, completar a volumen con la fase móvil, mezclar y filtrar.

Inyectar en el cromatógrafo la preparación estándar y registrar las respuestas de los picos. La eficiencia de la columna no debe ser menor de 1000 platos teóricos; el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0%.

Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (10 µL) de preparación estándar y de la muestra; registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de paracetamol en los comprimidos en base a la cantidad declarada.

1.4.2 Ibuprofeno Comprimidos: Valoración

Sistema cromatográfico: Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector UV ajustado a 254 nm y una columna de 25 cm x 4,6 mm con una fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser de aproximadamente 2 mL/min.

Fase móvil: disolver 4 g de ácido cloroacético en 400 mL de agua, ajustar a pH 3 con hidróxido de amonio y agregar 600 mL de acetonitrilo. Filtrar y desgasificar.

Solución del estándar interno: preparar una solución de valerofenona en la fase móvil de aproximadamente 0,35 mg/mL.

Solución estándar de 4-isobutilacetofenona: disolver una cantidad exactamente pesada de 4-isobutilacetofenona en acetonitrilo para obtener una solución de aproximadamente 0,6 mg/mL. Agregar 2 mL de esta solución madre a 100 mL de solución estándar interno y mezclar para obtener una solución 12 µg/mL de 4-isobutilacetofenona.

Preparación de la muestra: pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 comprimidos de ibuprofeno. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 1,2 g de ibuprofeno, transferir a un recipiente apropiado, agregar 100 mL de solución estándar interno y agitar durante 10 min. Centrifugar una porción de la suspensión obtenida y emplear la solución sobrenadante transparente.

Inyectar en el cromatógrafo la preparación estándar y registrar las respuestas de los picos: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,75 para ibuprofeno y 1,0 para valerofenona. La resolución entre los picos de ibuprofeno y valerofenona no debe ser menor a 2,5; los factores de asimetría para los picos individuales no deben ser mayores de 2,5; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2%.

Inyectar en el cromatógrafo la solución estándar de 4-isobutilacetofenona y registrar las respuestas de los picos: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 1,0 para valerofenona y 1,2 para 4-isobutilacetofenona. La resolución entre los picos de valerofenona y 4-isobutilacetofenona no debe ser menor a 2,5; los factores de asimetría para los picos individuales no deben ser mayores de 2,5; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2%.

Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales de preparación estándar, preparación de la muestra y solución estándar de 4-isobutilacetofenona, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de ibuprofeno en los comprimidos en base a la cantidad declarada. (Extraído de la Farmacopea Argentina, 8va edición, 2011)

1.4.3 Diclofenac comprimidos: Valoración

La FA aún no ha incluido a los comprimidos de diclofenac en sus monografías, lo que sigue a continuación es extraído de la USP.

Sistema cromatográfico: Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector UV ajustado a 254 nm y una columna de 25 cm x 4,6 mm con una fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 5 µm de diámetro. El caudal debe ser de aproximadamente 1,0 mL/min.

Fase móvil: metanol y buffer fosfato pH 2,5 (70:30). Filtrada y desgasificada.

Diluyente: metanol y agua (70:30)

Preparación estándar: disolver una cantidad exactamente pesada de diclofenac sustancia de referencia, en el diluyente, para obtener una solución de aproximadamente 50 µg/mL.

Preparación de la muestra: pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 comprimidos de diclofenac. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 50 mg de diclofenac, transferir a un matraz aforado de 100 mL. Agregar 70 mL de diluyente, agitar durante 60 min, llevar a volumen con el diluyente, centrifugar.

Solución de resolución: preparar una solución que contenga 40 µg/mL de ftalato de dietilo; 0,5 mg/mL de diclofenac sustancia de referencia; 37,5 µg/mL de diclofenac compuestos relacionados.

Inyectar en el cromatógrafo la solución de resolución y registrar las respuestas de los picos. La resolución entre los picos de ftalato de dietilo y diclofenac compuestos relacionados no debe ser menor a 2,5; la resolución entre los picos de diclofenac compuestos relacionados y diclofenac no debe ser menor a 3,5.

Inyectar en el cromatógrafo la solución estándar y registrar las respuestas de los picos; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0%.

Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (10 µL) de preparación estándar y de la muestra; registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de diclofenac en los comprimidos en base a la cantidad declarada. (Extraído de United States Pharmacopoeia, 2013)

1.5 METODOLOGÍAS ALTERNATIVAS DE ANÁLISIS

Los equipos de HPLC son equipos de alto costo, de funcionamiento complejo, y que necesitan de técnicos entrenados para operar. Además, involucran el uso de solventes orgánicos, poco amigables con el medio ambiente, que generan grandes volúmenes de desechos contaminantes.

Las farmacopeas británica, estadounidense, europea así como la Argentina promueven la incorporación de otras metodologías innovadoras en sus monografías, dado que son varias las presentaciones farmacéuticas que aún no están incorporadas en ellas.

Estas metodologías deben presentar ventajas en cuanto a costo, sencillez, y tiempo de análisis; además de ser estadísticamente comparables a los métodos de referencia en cuanto a parámetros analíticos de exactitud, precisión, sensibilidad y robustez.

Las técnicas analíticas alternativas desarrolladas en la presente tesis abarcan no solamente la valoración del principio activo en las presentaciones farmacéuticas, sino que también son susceptibles a ser aplicadas a las etapas de uniformidad en contenido y en los ensayos de disolución y estabilidad. Dichas metodologías suman nuevas aplicaciones de la Química Analítica en el campo de la farmacología, basadas en técnicas de menor costo operativo. Esto implica un beneficio tanto económico como en el terreno del conocimiento científico.

Éstas metodologías han sido evaluadas en cuanto a sus parámetros de desempeño analítico: exactitud, precisión, linealidad, selectividad, intervalo de linealidad y robustez, a fin de ser sometidas al proceso de Validación de Métodos de Análisis de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT).

1.6 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, por medio de estudios de laboratorio, que un método es apropiado para el uso propuesto. A continuación se definen los atributos analíticos necesarios para validar un método: exactitud; precisión; especificidad; límite de detección; límite de cuantificación; linealidad e intervalo, y finalmente: robustez.

1.6.1 Exactitud

La exactitud de un método analítico es la proximidad entre el resultado obtenido y el valor real. La exactitud debe establecerse en todo el intervalo especificado para el método analítico.

En el caso de la valoración de una sustancia en un producto farmacéutico, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del método analítico a mezclas preparadas con todos los componentes del producto a las cuales se les ha agregado cantidades conocidas del analito dentro del intervalo del método. Si no es posible obtener muestras de todos los componentes del producto, puede ser aceptable agregar cantidades conocidas del analito al producto o comparar los resultados obtenidos con un segundo método cuya exactitud haya sido establecida.

La exactitud debe evaluarse empleando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración que cubran el intervalo especificado. La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación obtenido a partir de la valoración de una cantidad agregada conocida de analito en la muestra, o como la diferencia entre la media y el valor aceptado como verdadero junto con los intervalos de confianza.

1.6.2 Precisión

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados del ensayo individual cuando el método se aplica repetidamente a varias alícuotas de una muestra homogénea. La precisión de un método analítico, generalmente se expresa como la desviación estándar o desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones.

La precisión puede ser considerada en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

- a) La repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones operativas en un intervalo de tiempo corto.
- b) La precisión intermedia expresa las variaciones intralaboratorio: en diferentes días, por diferentes analistas, utilizando diferentes equipos, etc.
- c) La reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios (mediante estudios colaborativos).

En este contexto, las valoraciones son análisis independientes que se llevan a cabo siguiendo el procedimiento analítico completo desde la preparación de la muestra hasta el resultado final del ensayo.

La repetibilidad puede evaluarse empleando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el método (como por ejemplo: tres concentraciones con tres repeticiones de cada una) o un mínimo de seis determinaciones al 100 % del valor declarado.

1.6.3 Especificidad

La especificidad es la capacidad de un método para evaluar inequívocamente al analito en presencia de los componentes que pueden estar presentes, tales como impurezas, productos de degradación, componentes de la matriz, etc. La falta de especificidad de un método analítico puede ser compensada por otros procedimientos analíticos.

En la práctica, esto puede realizarse agregando, a la sustancia o al producto farmacéutico, cantidades apropiadas de impurezas o excipientes y demostrando que el resultado de la valoración no se ve afectado por la presencia de estos materiales extraños.

1.6.4 Límite de detección

El límite de detección es la concentración más baja de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, en una muestra bajo las condiciones experimentales establecidas.

Existen diversas maneras para determinar el límite de detección, dependiendo de que se trate de un método no instrumental o instrumental.

a) Para métodos no instrumentales, el límite de detección es determinado por el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito y estableciendo el mínimo nivel al cual el analito puede ser detectado en forma confiable.

b) En el caso de métodos instrumentales que exhiben ruido de fondo, puede emplearse una aproximación basada en la comparación de las señales medidas con muestras que contienen pequeñas cantidades conocidas de analito con muestras blanco y determinando la relación señal/ruido. Una relación señal ruido de 3:1 ó 2:1 se considera generalmente aceptable para estimar el límite de detección. Otras aproximaciones se basan en la determinación de la pendiente de la recta de calibración y la desviación estándar de la respuesta.

Cualquiera sea el método empleado, el límite de detección debería ser luego confirmado por medio del análisis de un número apropiado de muestras con concentraciones cercanas o en el límite de detección propuesto.

1.6.5 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud en una muestra, bajo las condiciones experimentales establecidas. El límite de cuantificación se expresa en las mismas unidades de concentración empleadas para el analito de la muestra.

Existen diversas maneras para determinar el límite de cuantificación, dependiendo de que se trate de un método no instrumental o instrumental:

a) Para métodos no instrumentales, el límite de cuantificación es generalmente determinado por el análisis de muestras con concentraciones

conocidas de analito y estableciendo el mínimo nivel al cual el analito puede ser cuantificado con precisión y exactitud. Este procedimiento puede emplearse también para métodos instrumentales.

b) En el caso de métodos instrumentales que exhiben ruido de fondo, puede emplearse una aproximación basada en la comparación de las señales medidas con muestras que contienen pequeñas cantidades conocidas de analito con muestras blanco y determinando la relación señal/ruido. Una relación señal ruido de 10:1 se considera generalmente aceptable para estimar el límite de cuantificación. Otras aproximaciones se basan en la determinación de la pendiente de la recta de calibración y la desviación estándar de la respuesta.

Cualquiera sea el método empleado, el límite de cuantificación debe ser confirmado por medio del análisis de un número apropiado de muestras con concentraciones cercanas o en el límite de cuantificación propuesto.

1.6.6 Linealidad e intervalo

La linealidad de un método analítico es su capacidad de producir resultados directamente proporcionales a la concentración de analito dentro de un intervalo dado. En algunos casos puede ser necesaria la aplicación de transformaciones matemáticas para obtener una recta.

El intervalo corresponde al rango de concentraciones de analito que pueden ser determinadas con precisión, exactitud y linealidad. Normalmente, el intervalo se expresa con las mismas unidades que los resultados del ensayo.

La linealidad debe establecerse a lo largo del intervalo del método analítico. Se debe establecer por medio de un método estadístico apropiado (como por ejemplo: cálculo de regresión por cuadrados mínimos). En algunos casos, para obtener la proporcionalidad entre los resultados y las concentraciones, los datos deben ser sometidos a una transformación matemática antes del análisis de regresión. Los datos obtenidos a partir de la mejor recta pueden ser útiles para estimar matemáticamente el grado de linealidad. Deben informarse el coeficiente de correlación, la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión. El intervalo del método es validado al comprobar que el método analítico es preciso, exacto y lineal, cuando es aplicado a muestras que contienen el analito en los extremos del intervalo así como dentro del mismo. Para establecer la linealidad se deben investigar un mínimo de cinco concentraciones. También se recomienda considerar los siguientes intervalos:

a) Para la valoración de una sustancia (o un producto farmacéutico): de 80 a 120 % de la concentración de ensayo.

b) Para ensayos de disolución: $\pm 20\%$ del intervalo especificado.

1.6.7 Robustez

La robustez de un método analítico es una medida de su capacidad de no verse afectado por variaciones pequeñas, pero deliberadas, en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad.

Ejemplos de variaciones que deben estudiarse durante la evaluación de la robustez de un método son: diferentes instrumentos, diferentes lotes de reactivos, diferentes tiempos de valoración, diferentes temperaturas de valoración, diferentes columnas cromatográficas (distintos lotes o proveedores), etc. La robustez se expresa normalmente como la falta de influencia de las variables operativas y del entorno sobre los resultados del ensayo.

La robustez de un método analítico se determina mediante el análisis de alícuotas a partir de lotes homogéneos empleando condiciones operativas y ambientales diferentes pero que están dentro de los parámetros especificados en la valoración. El grado de reproducibilidad de los resultados del ensayo es luego determinado como una función de las variables de la valoración. Esta reproducibilidad puede compararse con la precisión de la valoración bajo condiciones normales para obtener una medida de la robustez del método analítico.

1.6.8 Datos requeridos para la validación de un método analítico

Las categorías de métodos analíticos más comunes son las siguientes:

CATEGORÍA I - Incluye los métodos analíticos para la cuantificación de los componentes mayoritarios de las materias primas o de los principios activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos.

CATEGORÍA II - Incluye los métodos analíticos empleados para la determinación de impurezas en las materias primas o productos de degradación en los productos farmacéuticos. Estos métodos incluyen valoraciones cuantitativas y ensayos límites.

CATEGORÍA III - Incluye métodos analíticos para la determinación de las características de desempeño (como por ejemplo: disolución, liberación de principios activos).

CATEGORÍA IV - Incluye ensayos de identificación.

Para cada categoría de análisis, se necesita diferente información analítica. En la Tabla 4 se indican los elementos que se requieren para cada una de estas categorías. La validez de un método analítico puede comprobarse sólo mediante estudios de laboratorio. En consecuencia, la documentación que avale tales estudios es un requisito básico para determinar si un método es apropiado para una aplicación determinada.

Tabla 4: Datos requeridos para la validación de un método analítico

Característica	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Cuantitativo	Ensayo Límite		
Exactitud	+	+	*	*	-
Precisión					
a) Repetibilidad	+	+	-	+	-
b) Precisión intermedia	+	+	-	+	-
Especificidad	+	+	+	*	+
Límite de detección	-	-	+	*	-
Límite de cuantificación	-	+	-	*	-
Linealidad	+	+	-	*	-
Intervalo	+	+	*	*	-

* Puede requerirse según la naturaleza del ensayo

(Extraído de la Farmacopea Argentina, 8va edición. Capítulo 1130).

2. ESPECTROFOTOMETRÍA

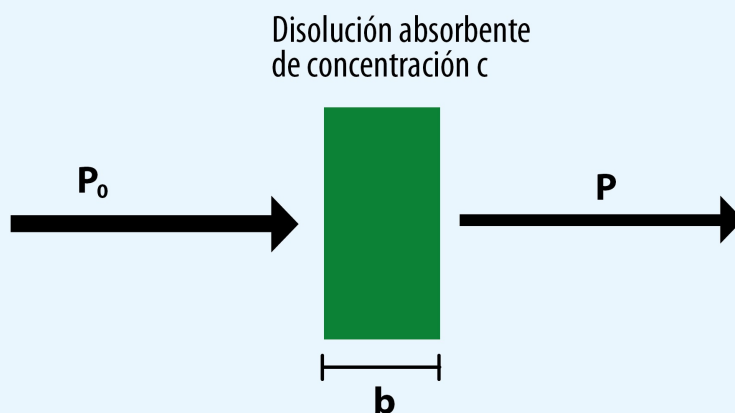
2.1 INTRODUCCIÓN TEÓRICA

2.1.1 Fundamentos

Los métodos espectrométricos son un amplio grupo de métodos analíticos que se basan en las espectroscopías atómica y molecular. La espectroscopía describe la interacción entre la radiación, principalmente la electromagnética, y la materia. La espectrofotometría hace referencia a la medida de la intensidad de la radiación mediante un detector fotoeléctrico u otro tipo de dispositivo electrónico. (Rubinson y Rubinson, 2001)

Los métodos cuantitativos basados en la absorción requieren dos medidas de potencia: la primera antes de que el haz haya pasado a través del medio que contiene al analito (P_0); y la segunda, después (P).

FIGURA 6. Atenuación de un haz de radiación por una disolución absorbente



P_0 : haz de radiación incidente

P : haz luego de haber atravesado el analito

b : espesor

Cuando un haz de radiación (P_0) atraviesa un medio que tiene un espesor b y una concentración C de una especie absorbente, la potencia del haz incidente disminuye de P_0 a P como consecuencia de las interacciones entre los fotones y los átomos o moléculas absorbentes (Figura 6).

La transmitancia (T) es la fracción entre la radiación transmitida por el medio y la radiación incidente:

$$T = \frac{P}{P_0} \quad \text{Ecuación 1}$$

La absorbancia (A) de un medio se define como:

$$A = -\log T = -\log \frac{P_0}{P} \quad \text{Ecuación 2}$$

Para una radiación monocromática, la absorbancia es directamente proporcional al camino óptico b a través del medio y la concentración C de la especie absorbente. La ley de Beer sirve como base para el análisis cuantitativo mediante medidas de absorción atómica y molecular, su expresión es la siguiente:

$$A = \epsilon b C \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde ϵ : coeficiente de absortividad molar [$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
 b : longitud de paso óptico [cm]
 C : concentración de la especie absorbente [M]

La espectroscopía de absorción es una de las herramientas más útiles y más utilizadas por en el análisis cuantitativo. Las características más importantes de los métodos espectrofotométricos incluyen:

- Gran aplicabilidad, tanto para sistemas orgánicos como inorgánicos
- Sensibilidades de 10^{-4} a 10^{-7} M
- Selectividad moderada a alta
- Buena precisión
- Fácil adquisición de datos

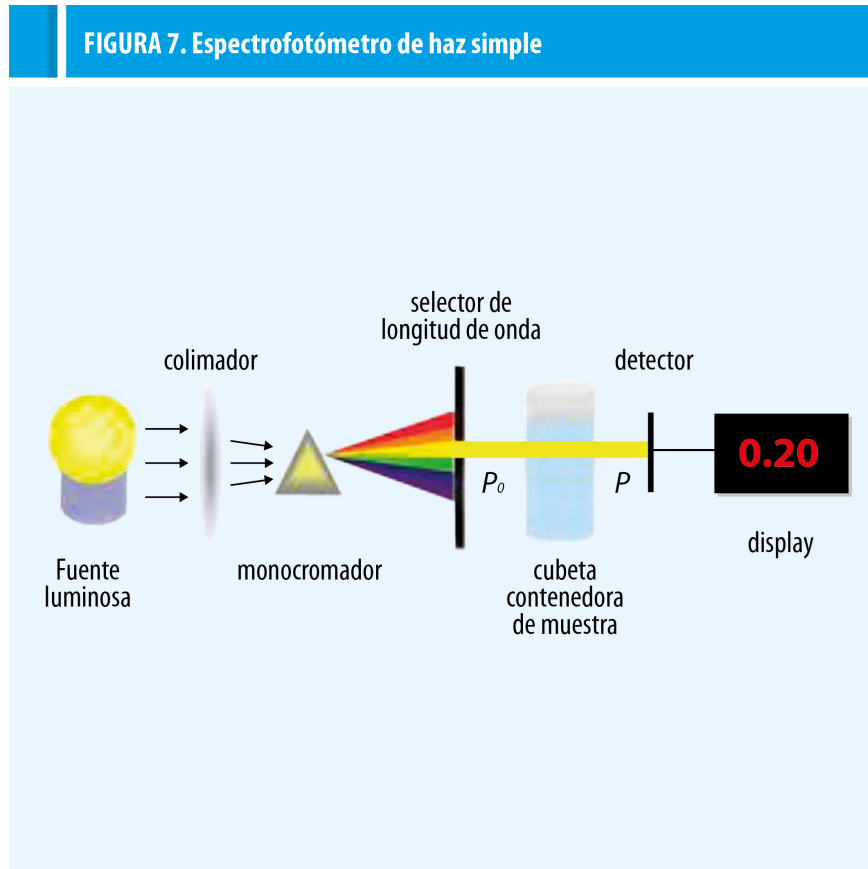
Las aplicaciones de los métodos de absorción UV/visible cuantitativas, no sólo son numerosas sino que abarcan todos los campos en los que se demanda información química cuantitativa. (Skoog y colaboradores, 2001)

2.1.2 Equipamiento

La radiación procedente de una lámpara de wolframio (Figura 7) atraviesa un monocromador, que selecciona una banda estrecha de longitudes de onda del haz incidente, posteriormente el haz pasa a través de un diafragma variable, que permite ajustar la potencia del haz que alcanza la cubeta que contiene la muestra. Se mide la potencia de la luz que emerge de la cubeta con un dispositivo fotoeléctrico que convierte la energía radiante del haz en una corriente continua que se detecta y se mide con un microamperímetro. En este caso se mide la potencia radiante de la luz que pasa a través de una cubeta de referencia que contiene el disolvente puro, y que se define P_0 . Luego se retira esta cubeta y se reemplaza por otra idéntica que contiene la muestra. La

potencia de la luz que llega al detector después de pasar la muestra es la cantidad P . (Harris, 2009)

FIGURA 7. Espectrofotómetro de haz simple

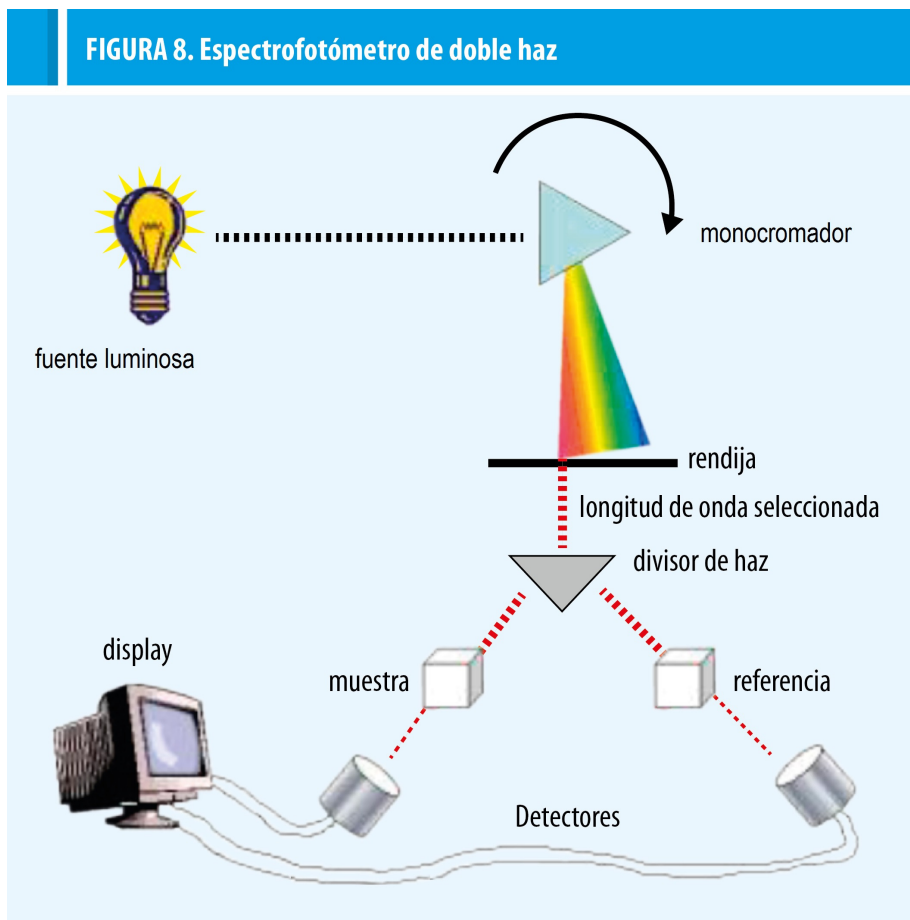


Un espectrofotómetro de doble haz divide la luz para que pase alternadamente por la cubeta de la muestra y la de la referencia mediante un espejo rotatorio (cortador de haz) que dirige el haz de luz (Figura 8).

Cuando la luz pasa a través de la muestra, el detector mide P . Cuando el cortador dirige el haz a la cubeta de referencia, el detector mide P_0 . El haz se corta varias veces por segundo, y el circuito compara automáticamente P y P_0 para obtener transmitancia y absorbancia. Este procedimiento posibilita una corrección automática de los cambios de intensidad de la fuente y de la respuesta del detector, con el tiempo y la longitud de onda, dado que la potencia que emerge de las dos muestras se compara con mucha frecuencia. Estos espectrofotómetros permiten un barrido automático de longitudes de onda y un registro continuo de absorbancias frente a longitudes de onda. (Harris, 2009)

En el análisis espectrofotométrico se escoge la longitud de onda de máxima absorción, dado que en esta región del espectro de absorción la curva es relativamente aplanada, de manera que apenas varía la absorbancia si se desajusta un poco el monocromador o si varía la anchura de banda escogida.

Además la sensibilidad de la medición es máxima para una concentración dada de analito. (Skoog y colaboradores, 2001)



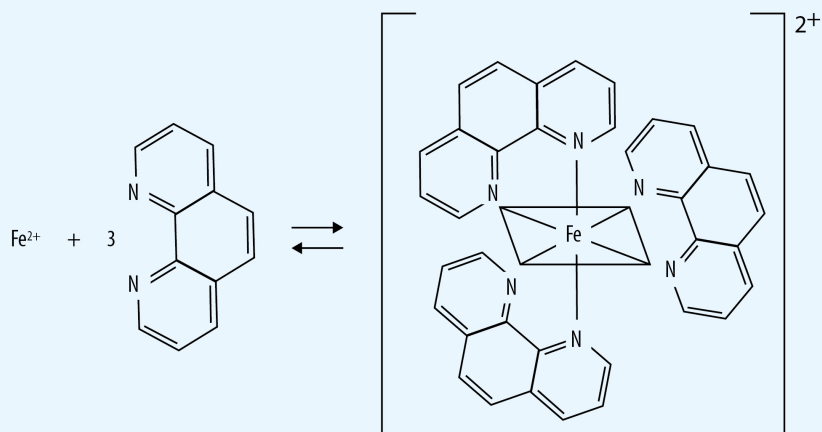
2.2 EXPERIMENTAL 1

ATRIBUTOS ANALÍTICOS DE UN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA CUANTIFICACIÓN DE DICLOFENAC

Publicado en Latin American Journal of Pharmacy
Lat. Am. J. Pharm. 30 (5): 1001-4 (2011)

Se desarrolló una técnica espectrofotométrica para la determinación cuantitativa de diclofenac en comprimidos, basada en la oxidación del diclofenac con Fe(III) en presencia de 1,10-fenantrolina monohidrato. Al oxidarse el diclofenac, el Fe(III) se reduce a Fe(II) el cual reacciona con 1,10-fenantrolina monohidrato, formando el complejo ferroína (Figura 9).

FIGURA 9. Reacción de formación de ferroína



El complejo diclofenac-ferroína es de color rojo-anaranjado, absorbe fuertemente en el visible, lo cual permite la lectura de su absorbancia a 506 nm. Se ensayó la aplicación de este método a comprimidos de 50 mg.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras y reactivos

Se utilizó diclofenac principio activo lote 080301-5, origen China (99,99% de pureza, determinada por HPLC) y diclofenac 50 mg comprimidos lote N° 095/11, provisto por PLAMECOR.

El placebo utilizado en las determinaciones de especificidad y exactitud, también fue provisto por PLAMECOR, siendo su composición la misma presente en los comprimidos de diclofenac: estearato de magnesio 1%; talco 2%; almidón glicolato de sodio 3,5%; polivinilpirrolidona (PVP) 1,2% y 73,2% polvo de precompactación verde.

1,10 – fenantrolina, grado analítico, Cicarelli (Argentina)

Sulfato amónico férrico, grado analítico, Timper (Argentina)

Ácido acético glacial, grado analítico, Cicarelli (Argentina)

Acetato de sodio anhydro, grado analítico, Biopack (Argentina)

Ácido clorhídrico concentrado, grado analítico, Cicarelli (Argentina)

Equipamiento

Espectrofotómetro Boeco S-26 UV-visible

Baño termostático Dalvo BMK 2

Experimental

Solución de Diclofenac principio activo 0,1 mg/mL: se pesaron las cantidades correspondientes de diclofenac principio activo y se llevaron a volumen con agua destilada.

Solución de Diclofenac comprimidos 0,1 mg/mL: 10 comprimidos fueron pesados y se calculó el peso promedio de comprimido. Luego se pulverizaron y redujeron a polvo fino, obteniéndose una mezcla homogénea. Se pesó la masa correspondiente de dicha mezcla homogénea de comprimidos para obtener una solución 0,1 mg/mL, y se procedió de igual manera que para principio activo.

Solución Fe(III)-fenantrolina: Solución A: Se pesaron 0,99 g de 1,10-fenantrolina y fueron disueltos en 5 mL de etanol y llevados a volumen en un matraz de 50 mL con agua destilada. Solución B: 0,80 g de sulfato férrico amónico fueron pesados y disueltos en 10 mL de HCl 0,1M, y luego llevados a 50 mL con agua destilada en un matraz aforado. Finalmente se adicionaron 25 mL de Solución A y 25 mL de Solución B y fueron llevadas a 250 mL con agua destilada. Se obtuvo una solución de color amarillo, fotolábil, por lo cual debió ser conservada en frasco color caramelo.

Buffer acetato pH 4,5.

Procedimiento

Análisis de principio activo

En matraces de 25 mL se agregaron: alícuotas de la solución de diclofenac principio activo 0,1 mg/mL en el rango de 0 a 0,015 mg/mL; 2,5 mL de solución de Fe (III)-fenantrolina; 10 mL de buffer acetato; y se llevó a volumen con agua destilada. Los matraces fueron llevados a baño termostático a 60°C durante 40 min para favorecer el desarrollo de color. Luego se efectuaron lecturas espectrofotométricas a 506 nm contra blanco de reactivos.

Análisis de comprimidos

Se tomaron 2,5 mL de la solución de comprimidos de diclofenac 0,1 mg/mL y se transfirieron a un matraz de 25 mL. Se siguió el mismo procedimiento descrito para principio activo. Estas soluciones se utilizaron en las determinaciones de repetibilidad y precisión intermedia.

Validación

Para el estudio de linealidad se construyó una curva de calibración con diclofenac principio activo en 5 niveles de concentración: 5 a 15 mg/L.

La especificidad fue estudiada mediante lecturas espectrofotométricas de placebo preparado en igual proporción que el presente en los comprimidos de diclofenac 50 mg, en el rango de concentraciones estudiado.

Se analizó precisión como repetibilidad y precisión intermedia:

- a) Repetibilidad: 10 alícuotas de muestras homogéneas equivalentes al contenido de diclofenac de un comprimido fueron analizadas el mismo día, por el mismo operador y utilizando el mismo equipamiento.

- b) Precisión intermedia: se estudiaron 3 niveles de concentración (25, 50 y 75 mg de diclofenac), por triplicado, dos días diferentes, analizado por dos analistas.

La determinación de exactitud se basó en el porcentaje de recuperación de analito en sobreagregados de principio activo de diclofenac (5, 10 y 15 mg/L) a placebo. El análisis se efectuó por triplicado.

RESULTADOS

Curva de calibración: al graficar Absorbancia vs. Concentración de diclofenac, se obtuvo la ecuación de la recta mediante regresión lineal por cuadrados mínimos: $[A = 0,0294 C_{\text{diclofenac}} + 0,1326]$ con $r^2=0,9982$ con un nivel de confianza del 95% (Figura 10).

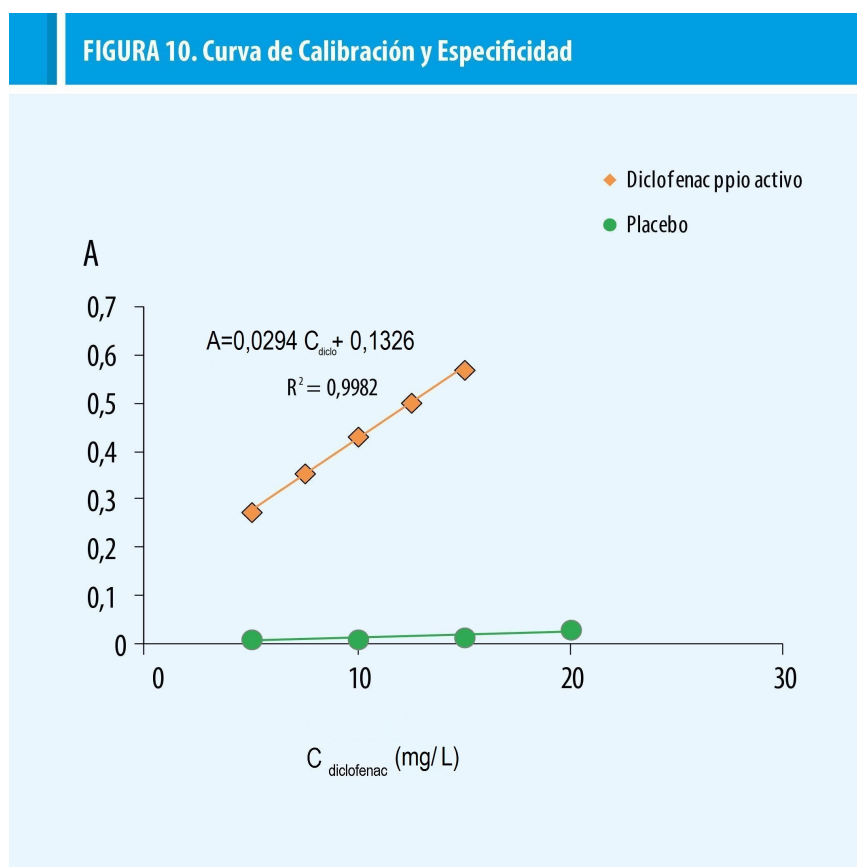


Figura 10: Absorbancia vs concentración de diclofenac

El análisis espectrofotométrico de placebo demostró que los excipientes de los comprimidos de diclofenac son químicamente inertes a la oxidación por Fe(III), probando con ello la especificidad del método desarrollado.

La precisión medida en términos de repetibilidad fue menor del 2% (Tabla 5).

Tabla 5: Precisión (Repetibilidad), se efectuó el análisis de 10 alícuotas de muestras homogéneas equivalentes al contenido de diclofenac presente en un comprimido

Muestra N°	% Masa recuperada
1	100,23
2	105,94
3	105,27
4	103,26
5	102,92
6	103,26
7	106,95
8	105,27
9	106,28
10	105,94
X_{promedio}	104,53
SD	2,06
CV%	1,97

Tabla 6: Precisión Intermedia. Se determinó el porcentaje de recuperación de distintos niveles de concentración de diclofenac, en dos días diferentes, llevado a cabo por dos analistas diferentes

	ANALISTA A		ANALISTA B		REPROD.
Diclofenac (mg)	Día 1 %Recup	Día 2 %Recup	Día 1 %Recup	Día 2 %Recup	
25	103,89	99,04	105,18	102,70	n = 12 X = 102,25 SD = 1,93 CV% = 1,89
	105,15	102,00	101,81	101,74	
	104,19	99,78	102,55	99,56	
X	104,41	100,07	103,18	101,33	
CV%	0,63	1,67	1,72	1,59	
50	104,33	105,96	104,66	103,59	n = 12 X = 104,67 SD = 1,48 CV% = 1,41
	105,44	103,96	101,98	100,78	
	106,41	108,93	105,68	104,33	
X	105,39	106,28	104,11	102,90	
CV%	0,99	2,35	1,84	1,82	
75	110,43	112,41	111,23	107,97	n = 12 X = 110,04 SD = 1,76 CV% = 1,60
	109,69	109,45	116,59	109,45	
	108,95	110,19	108,10	105,99	
X	109,69	110,68	111,97	107,80	
CV%	0,67	1,39	3,83	1,61	

El coeficiente de variación global, para los 3 niveles de concentración estudiados fue menor al doble del CV% de la repetibilidad en todos los casos (Tabla 6), lo cual indica precisión suficiente para este tipo de ensayos.

Exactitud: la recuperación de analito en sobreagregados de placebo está en el rango de 98,07 -101,97% (Tabla 7), valores que caen dentro de los límites aceptados por USP y ANMAT.

Tabla 7: Exactitud, basada en el porcentaje de recuperación de analito en sobreagregados de principio activo de diclofenac a placebo

Vol diclofenac 0,1 mg/mL agregado	Diclofenac principio activo sobreagregado (mg/L)	Diclofenac recuperado (mg/L)	% Recuperación
1,25	5	5,06	101,17
1,25	5	5,10	101,97
1,25	5	5,06	101,17
2,5	10	9,81	98,07
2,5	10	10,06	100,59
2,5	10	10,13	101,28
3,75	15	15,06	100,29
3,75	15	14,96	99,60
3,75	15	15,06	100,29

CONCLUSIONES

El método espectrofotométrico desarrollado es útil para el control de calidad de comprimidos de diclofenac. Es un método simple, rápido, específico, lineal, confiable y robusto, y permite la cuantificación sin procesos extractivos preliminares.

3. MÉTODOS CINÉTICOS

3.1 INTRODUCCIÓN TEÓRICA

3.1.1 Fundamentos

Los métodos cinéticos de análisis son aquellos en los que la concentración de analito se determina midiendo el efecto que éste tiene sobre la velocidad de la reacción química. El analito puede:

1. actuar de catalizador de la reacción (Método catalítico).
2. reaccionar con el reactivo y transformarse durante la reacción (Método directo o no catalítico).

Las medidas se efectúan en condiciones dinámicas, mientras varían las concentraciones de reactivos y productos. El parámetro analítico es la velocidad de aparición de los productos o de desaparición de los reactivos, que se determina bajo una serie de condiciones estándar y que se puedan reproducir. Luego los resultados se relacionan con la concentración inicial de la sustancia analizada. (Rubinson y Rubinson, 2001)

3.1.2 Velocidades de reacción

Muchos procesos químicos simples se pueden describir mediante la ecuación 4:

$$\frac{d[X]}{dt} = -k[X] \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde $d[X]$ es el cambio en $[X]$ que tiene lugar en el intervalo de tiempo dt , y k es una constante de proporcionalidad. El signo negativo de la ecuación indica que $[X]$ decrece con el tiempo, este comportamiento se denomina decaimiento exponencial.

El valor característico de k puede calcularse de dos maneras diferentes.

El primer procedimiento consiste en medir el cambio de $[X]$ en función del tiempo, es decir $d[X]/dt$, junto con el valor de $[X]$ en ese instante, $[X]_t$. Se obtiene:

$$\frac{d[X]/dt}{[X]} = -k \quad \text{Ecuación 5}$$

El valor de $d[X]/dt$ en la ecuación 5 es la pendiente de la tangente en el punto $[X]_t$ de la gráfica (Figura 11).

FIGURA 11. Decaimiento exponencial

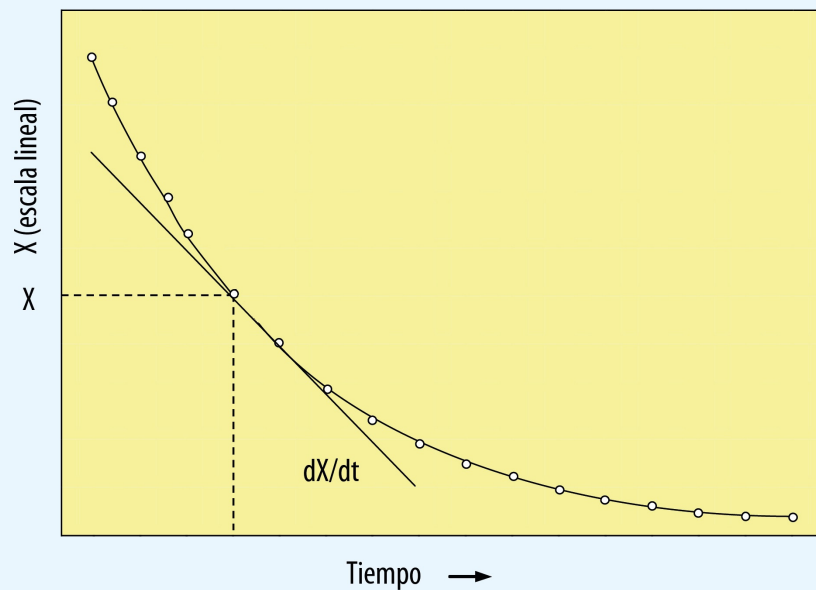


Figura 11: X es la concentración de analito vs Tiempo reacción

Un método alternativo, más preciso, es medir $[X]_t$ en una serie de tiempos, y calcular k a partir del conjunto de datos. Para hacerlo se relaciona directamente $[X]_t$ con k :

$$[X]_t = [X]_0 e^{-kt} \quad \text{Ecuación 6}$$

Esta ecuación 6 describe los resultados de una desintegración exponencial, en la que la primera medida de $[X]_t$ se efectúa en tiempo $t=0$, al valor de $[X]_t$ a $t=0$ se lo llama $[X]_0$ (Figura 12).

Para tener mayor precisión en la determinación de k se transforma la ecuación 6 y se obtiene:

$$\frac{[X]}{[X]_0} = e^{-kt} \quad \text{Ecuación 7}$$

Se aplica logaritmo a ambos lados de la ecuación:

$$\ln \frac{[X]}{[X]_0} = -kt \quad \text{Ecuación 8}$$

La ecuación 8 establece que si se representa el logaritmo natural de la relación $([X]/[X]_0)$ versus tiempo, la pendiente será $-k$ (Figura 13).

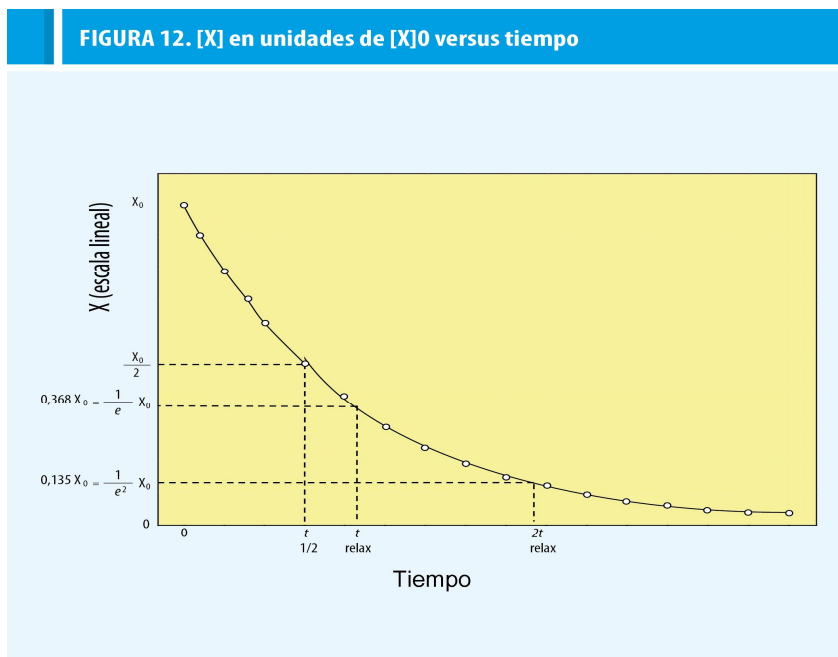


Figura 12: $[X]_0$ es el valor de $[X]$ cuando $t=0$. También se muestra el tiempo medio de reacción

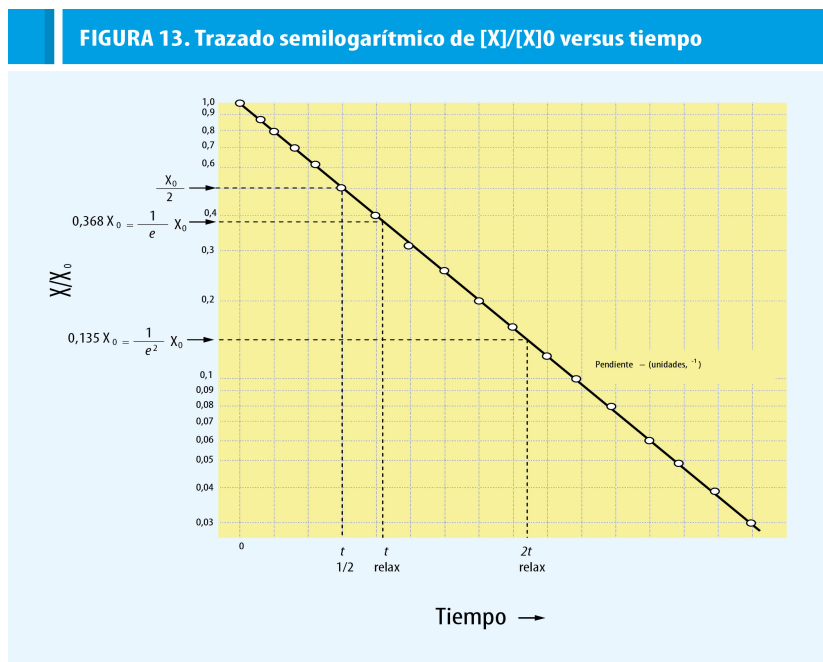


Figura 13: La pendiente de la recta es proporcional a $-k$. Se muestran tiempo medio, tiempo de relajación y el doble de tiempo de relajación.

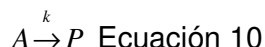
Si se considera una reacción química general:



siendo A:analito, R: reactivo y P:producto

La reacción comienza en el tiempo cero ($t=0$). $[A]_0$, $[R]_0$ y $[P]_0$ representan las concentraciones iniciales de A, R y P.

Considerando una reacción irreversible, de primer orden se tiene:



La cinética observada experimentalmente para ésta reacción se describe así:

$$velocidad = \frac{d[A]}{dt} = -k[A] \text{ Ecuación 11}$$

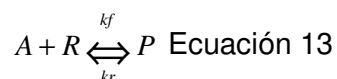
El signo negativo indica que A desaparece, la ecuación 11 también puede escribirse en función del producto de reacción:

$$velocidad = \frac{d[P]}{dt} = k[A] \text{ Ecuación 12}$$

Las ecuaciones 11 y 12 señalan que se puede medir tanto la velocidad de desaparición del reactante A como la velocidad de aparición del producto P. Experimentalmente se elige lo que resulta más fácil medir. (Avery, 2002)

3.1.3 Métodos de determinación de $[A]_0$ y k a partir de velocidades de reacción

A fin de que las reacciones del tipo:



presenten un comportamiento cinético más simple, no debe tener lugar la reacción inversa.

Si la concentración de reactivo permanece constante, lo cual se logra con una gran $[R]_0$, la reacción se comporta como si fuera de pseudo primer orden (la reacción no es de primer orden: se comporta como si lo fuera). La concentración de $[A]_0$ puede determinarse extrapolando los datos en tiempo cero en una representación semilogarítmica: $\log [A]$ o $\log [P]$ versus t .

Si se considera un período corto de tiempo, durante la primera parte de la curva, la velocidad de cambio de $[P]$ o $[R]$ es directamente proporcional a la concentración de $[A]_0$, y ésta concentración se puede determinar utilizando la tangente inicial del trazado tanto de $d[P]/dt$ como de $d[R]/dt$. Si se tiene una gran concentración de R y se consideran las mediciones durante un corto

período de tiempo, la velocidad de reacción no depende ni de $[A]$ ni de $[R]$. Estas son condiciones de pseudo orden cero.

La serie completa de los datos de un análisis puede representarse gráficamente como la respuesta del instrumento versus tiempo, y a su vez ponerse en relación con la concentración del analito de 3 formas:

1. Método cinético diferencial
2. Método de tiempo fijo
3. Método de tiempo variable.

Las condiciones experimentales, para las 3 metodologías, deben ser tales que la constante k de la velocidad sea la misma tanto para los estándares como para los analitos.

Método cinético diferencial: implica medir la concentración de analito según la pendiente de la curva de concentración versus tiempo. La tangente de la curva es proporcional al valor de $[A]_0$ (Figura 14).

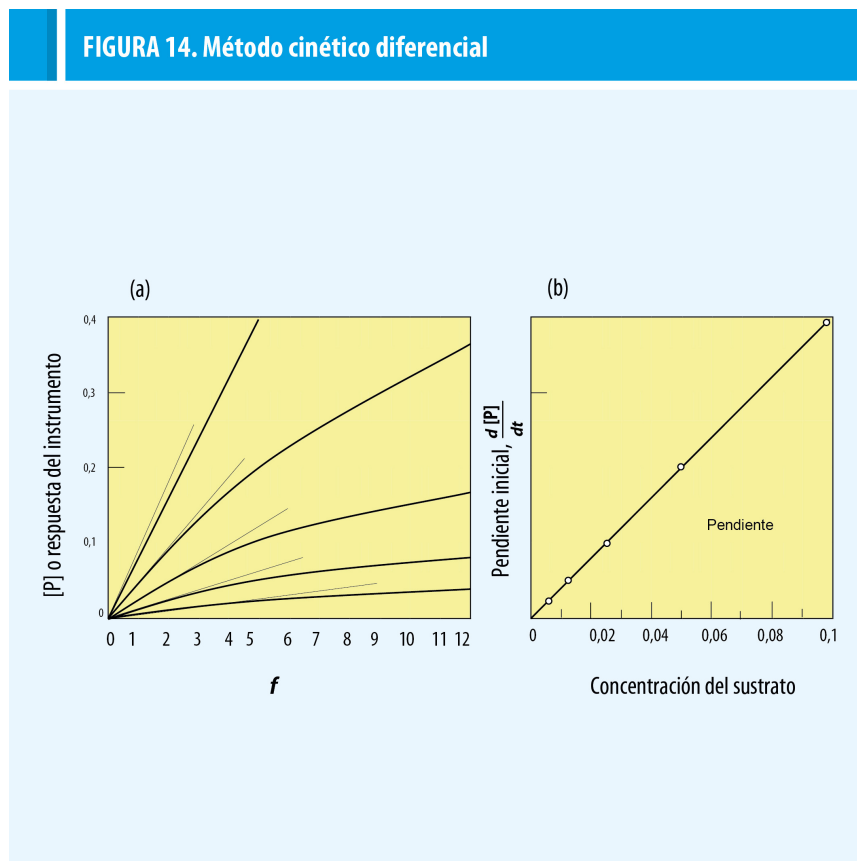


Figura 14: a) se han llevado a cabo una serie de determinaciones cinéticas con distintas concentraciones iniciales de analito. Se han trazado las tangentes a estas curvas siendo $t=0$. b) Los valores de las pendientes de las tangentes se han representado versus la concentración de sustrato.

Método de tiempo fijo: Considerando la relación entre P_t y $[A]_0$, a tiempos t_1 y t_2 se tiene:

$$\Delta P = [P]_{t_2} - [P]_{t_1} = [A]_0 (e^{-kt_1} - e^{-kt_2}) \quad \text{Ecuación 14}$$

Manteniendo fijos t_1 y t_2 durante los experimentos, $(e^{-kt_1} - e^{-kt_2})$ se mantiene constante y puede ser determinada haciendo pruebas con estándares. Al repetir la prueba con muestras en el mismo intervalo de tiempo fijo, la variación de la concentración de P a lo largo de ese intervalo de tiempo es directamente proporcional a $[A]_0$ (Figura 15).

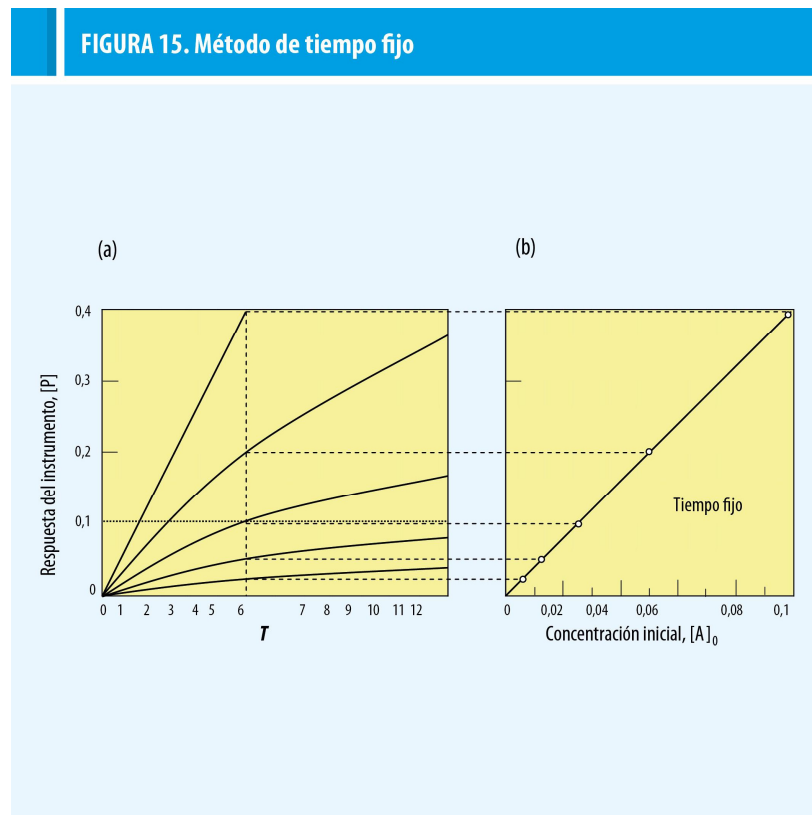


Figura 15: a) En el método de tiempo fijo las concentraciones se miden en un único tiempo. Sólo se necesita medir la concentración una vez en cada prueba.

En el caso representado, las concentraciones se miden y los puntos se proyectan en la gráfica b) donde se trazan los valores proporcionales a $[P]$ versus $[A]_0$.

Método de tiempo variable: se determina cuánto tiempo tarda la mezcla de reacción en alcanzar un nivel predeterminado de concentración fija de un reactivo o producto. La concentración inicial $[A]_0$ se relaciona inversamente con el tiempo que se necesita para lograr la concentración fija (Figura 16). (K.A. Rubinson, J.F. Rubinson, 2001)

FIGURA 16. Método de tiempo variable

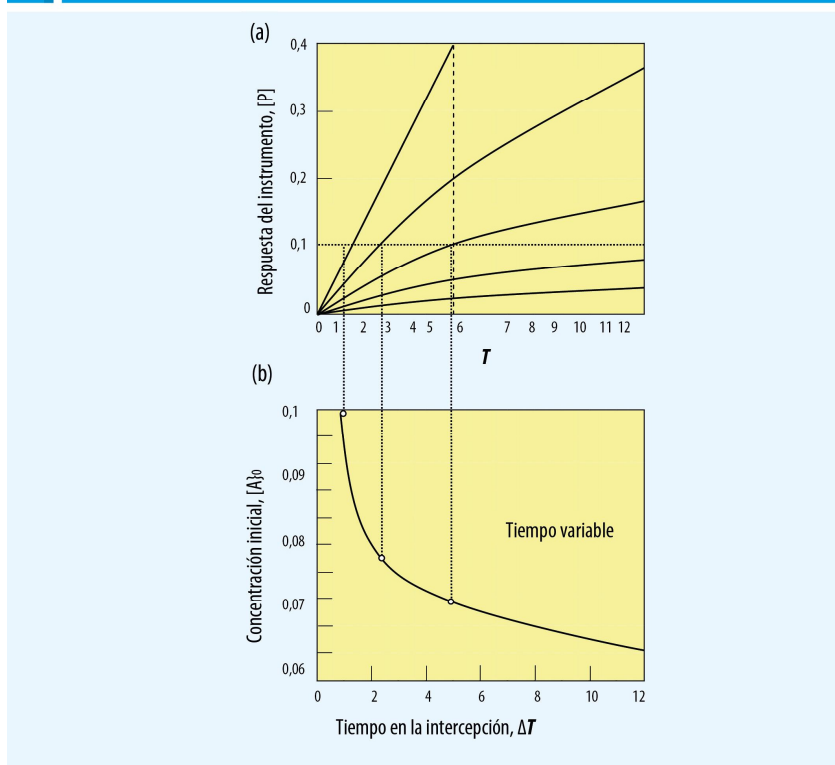


Figura 16: a) Se mide el tiempo requerido para lograr una concentración fija. Estos tiempos se proyectan sobre la gráfica b), donde se representa $[A]_0$ versus tiempos.

3.1.4 Efecto de la temperatura

La variación en la constante de velocidad de una reacción debida a la temperatura, está dada por la Ecuación de Arrhenius:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R.T} \quad \text{Ecuación 15}$$

Las constantes A y E_a se conocen como los parámetros de Arrhenius para la reacción y se determinan experimentalmente; A es el factor preexponencial y E_a es la energía de activación. Tanto A como E_a dependen de la reacción en estudio.

Un gráfico de Arrhenius (Figura 17) es un trazado en el que se representa $\ln k$ en función de $1/T$. El valor de la ordenada en el origen es $\ln A$, y la pendiente corresponde a $-E_a/R$ (P. Atkins, L. Jones, 2009).

FIGURA 17. Gráfico de Arrhenius

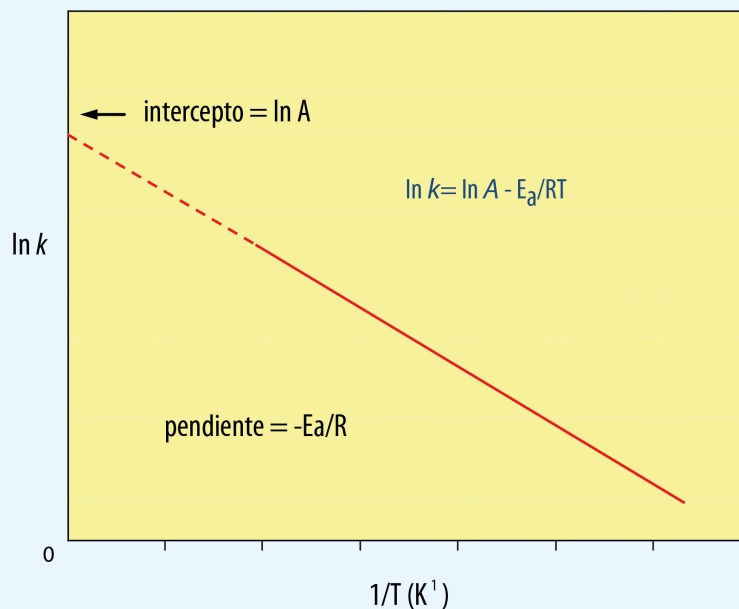
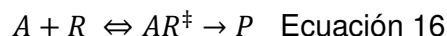


Figura 17: k corresponde a la velocidad de la reacción y $1/T$ a la inversa de la temperatura.

3.1.5 Teoría del estado de transición

La teoría del estado de transición desarrollada por Eyring en 1937, centra la atención sobre el complejo activado o estado de transición, considerándolo como una entidad termodinámica. Esta teoría proporciona un marco de trabajo con el que se pueden entender mejor las reacciones, y es muy útil tanto en fase gaseosa como en disolución. (Logan, 2000)

Si consideramos la reacción:



Donde $A+R$ representa a los reactivos, AR^{\ddagger} representa al estado de transición o complejo activado (inestable) y, finalmente P representa a los productos de la reacción.

La velocidad de reacción depende tanto de la concentración del estado de transición, como de la velocidad con que el estado de transición se rompe para formar los productos de la reacción (esta depende de la frecuencia de vibración del estado de transición, ν).

$$v \approx [AR^{\ddagger}]\nu \quad \text{Ecuación 17}$$

La constante de equilibrio se expresa de la siguiente forma:

$$K^\ddagger = \frac{[AR^\ddagger]}{[A][R]} \quad \text{Ecuación 18}$$

de donde la concentración del complejo activado será:

$$[AR^\ddagger] = K^\ddagger [A][R] \quad \text{Ecuación 19}$$

La velocidad con que se rompe el complejo activado que corresponde a una frecuencia de vibración del mismo es:

$$v = \frac{kT}{h} \quad \text{Ecuación 20}$$

donde h corresponde a la constante de Planck y k a la constante de Boltzman.

Así, la velocidad de reacción en la teoría del estado de transición es:

$$velocidad = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[R]}{dt} = K^\ddagger \frac{kT}{h} [A][R] \quad \text{Ecuación 21}$$

Al comparar la ecuación 21, con una ecuación empírica de velocidad de segundo orden ($v = k_2[A][R]$) resulta que la constante de velocidad (k_2) de la reacción viene expresada por:

$$k_2 = K^\ddagger \frac{kT}{h} \quad \text{Ecuación 22}$$

Desde el punto de vista de la termodinámica se introducen los conceptos de energía libre de activación, entropía de activación y entalpía de activación. La constante de equilibrio se relaciona con la energía libre de Gibbs de formación del complejo activado de la siguiente forma:

$$(\Delta G^\circ)^\ddagger = -RT \ln K^\ddagger \quad \text{Ecuación 23}$$

De donde

$$K^\ddagger = e^{-(\Delta G^\circ)^\ddagger/RT} \quad \text{Ecuación 24}$$

Para una reacción a una temperatura dada, la energía libre de activación puede considerarse el resultado de una contribución de entalpía y otra de entropía, de acuerdo con:

$$(\Delta G^\circ)^\ddagger = (\Delta H^\circ)^\ddagger - T(\Delta S^\circ)^\ddagger \quad \text{Ecuación 25}$$

Al sustituir la ecuación 25 en la ecuación 24 se desprende:

$$K^\ddagger = e^{-[(\Delta H^\circ)^\ddagger - T(\Delta S^\circ)^\ddagger]/RT} \quad \text{Ecuación 26}$$

Con este valor de K^\ddagger se deduce para la constante de velocidad (k_2):

$$k_2 = \frac{kT}{h} e^{(\Delta S^\ddagger)/R} e^{-(\Delta H^\ddagger)/RT} \quad \text{Ecuación 27}$$

La variación que determina la temperatura es pequeña comparada con el valor del factor exponencial, lo cual concuerda con la ecuación de Arrhenius (Barrow, 1968).

Finalmente:

$$\ln \frac{k_2}{T} = \ln \frac{k}{h} + \frac{(\Delta S^\ddagger)}{R} - \frac{(\Delta H^\ddagger)}{RT} \quad \text{Ecuación 28}$$

La entalpía de activación (ΔH^\ddagger) puede interpretarse como la barrera necesaria para que se produzca la reacción, se relaciona con la altura del estado de transición, esto es, la diferencia de entalpía entre el estado de transición y los reactivos. Es prácticamente igual a la energía de activación (energía cinética mínima que los reactivos deben tener para poder dar lugar a los productos) toda vez que RT tiene un valor pequeño.

La entropía de activación (ΔS^\ddagger) está relacionada con la naturaleza del estado de transición, por lo cual brinda información sobre éste. La entropía puede interpretarse como una medida del desorden del sistema. Una entropía de activación positiva indica que el estado activado está menos ordenado o tiene más grados de libertad que los reactivos. Por el contrario una entropía de activación negativa indica un aumento de orden o una disminución de los grados de libertad al formarse el estado activado a partir de los reactivos. Si un enlace se está rompiendo, el proceso resultará en $(\Delta S^\ddagger) > 0$, mientras que si se están formando enlaces $(\Delta S^\ddagger) < 0$, (sin tener en cuenta los efectos del disolvente).

Si se grafica la ecuación 28 pueden determinarse las magnitudes, (ΔH^\ddagger) y (ΔS^\ddagger) , representando $\ln k_2/T$ en función de $1/T$. El valor de la ordenada al origen permite determinar (ΔS^\ddagger) y el de la pendiente (ΔH^\ddagger) .

3.2 EXPERIMENTAL 2

LA CINÉTICA QUÍMICA EN LA CUANTIFICACIÓN DE PARACETAMOL EN FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

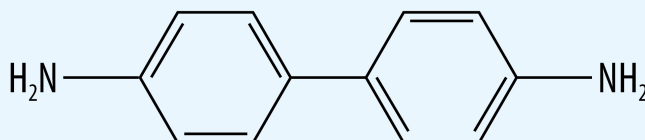
Los ensayos de este método fueron llevados a cabo por Elizabeth Popelka, en el marco de una adscripción en nuestra cátedra.

Se desarrolló un método cinético utilizando bencidina (Figura 18), como reactivo azoico, para la cuantificación de paracetamol, en comprimidos farmacéuticos.

Los colorantes azoicos facilitan el seguimiento de métodos basados en velocidades de reacción, dado que los compuestos generados presentan absorción en el visible. Se caracterizan por la presencia del grupo azo $-N=N-$ cromógeno asociado a grupos auxocromo de tipo hidroxilo.

El producto de la reacción bencidina-paracetamol, de color amarillo-naranja, presenta un máximo de absorción a 495 nm.

FIGURA 18. Estructura química de la bencidina



MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras y Reactivos

Se utilizó paracetamol principio activo lote N° 0707043, origen China, (99,99% pureza determinada por HPLC) y paracetamol 500 mg comprimidos lote N° 039/09 provistos por PLAMECOR.

El placebo utilizado en las determinaciones de especificidad y exactitud también fue provisto por PLAMECOR, y su composición es la misma presente en los comprimidos: estearato de magnesio 1%, talco 2%, almidón glicolato de sodio 4,8%, polivinilpirrolidona (PVP) 5,2%, precompactado blanco 16,6%, aerosil 1,4%.

NaNO₂, grado analítico, Cicarelli (Argentina).

HCl 37%, grado analítico, Cicarelli (Argentina).

Equipamiento

Espectrofotómetro Spectrum UV-visible 2100

Experimental

Solución de bencidina: se obtuvo por diazotación, empleando ácido nitroso, que a su vez se obtuvo por disolución de nitrito sódico en agua y posterior adición de ácido clorhídrico.

Solución de principio activo 1 mg/mL: se pesaron las cantidades de paracetamol principio activo correspondientes, y luego se llevó a volumen con agua destilada. La solución fue agitada magnéticamente por 10 min y posteriormente filtrada.

Solución de paracetamol comprimido 1 mg/mL: fue preparada a partir de una mezcla homogénea de comprimidos finamente pulverizados, siguiendo el mismo procedimiento descrito para soluciones de principio activo.

Procedimiento Espectrofotométrico

Las lecturas fueron llevadas a cabo a 495 nm y a 25°C.

Análisis de principio activo: en la cubeta espectrofotométrica se adicionaron 200 µL de reactivo y 2 mL de solución principio activo de paracetamol 1 mg/mL. A tiempo cero se llevó la lectura a cero de absorbancia y se siguió la reacción de copulación registrando el incremento de la señal en el tiempo. Se registró la absorbancia cada minuto durante un período de 20 minutos. Se repitió este procedimiento para agregados de 0,5; 1 y 1,4 mL de paracetamol principio activo. Se graficó absorbancia vs tiempo (Figura 19).

Análisis de comprimidos de paracetamol: se procedió de la misma manera que en el análisis de principio activo.

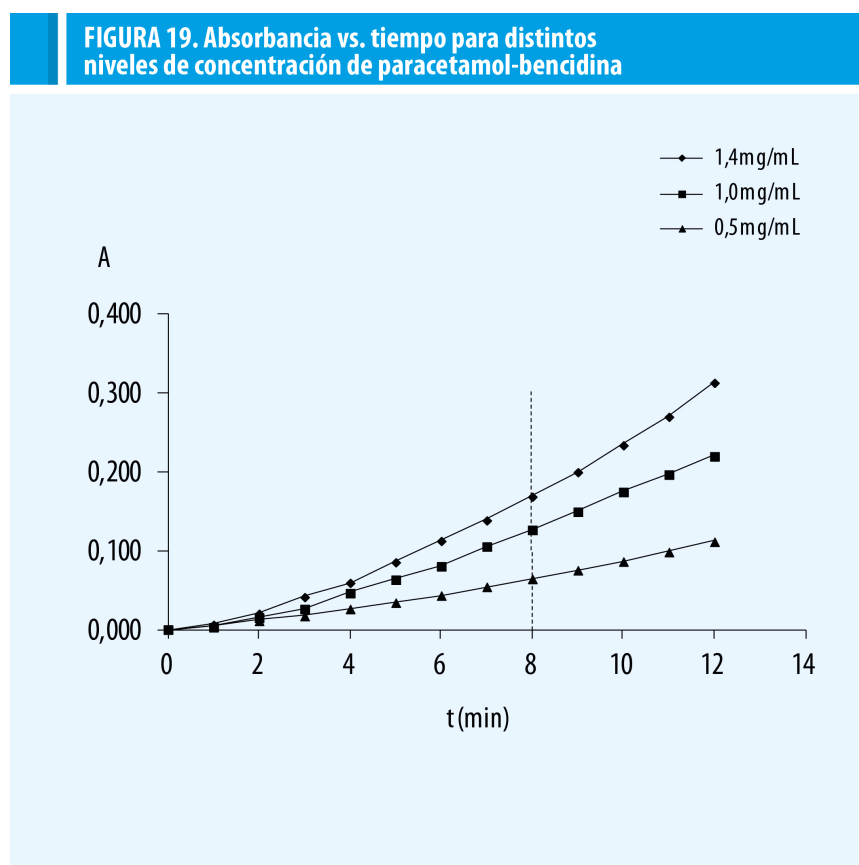


Figura 19: Absorbancia vs. tiempo de reacción para distintos niveles de concentración de paracetamol-bencidina

RESULTADOS

Las absorbancias para un tiempo fijo de reacción de ocho minutos son directamente proporcionales a la concentración de paracetamol en la muestra, siendo la ecuación de la recta: $[A = 0,1207C_{\text{paracetamol}} + 0,002]$ con $r^2=0,9984$ (Figura 20).

Con placebo no se verificó variación de la absorbancia en el tiempo.

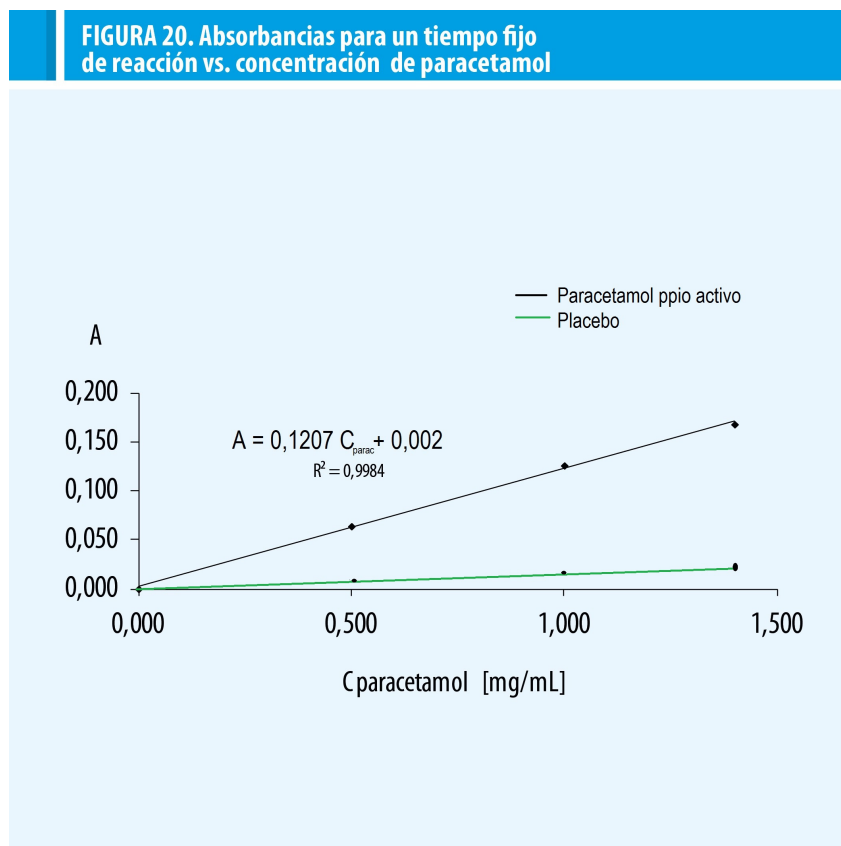


Figura 20: Absorbancias para un tiempo fijo de reacción (8 min) vs. concentración de paracetamol

CONCLUSIONES

El método cinético de tiempo fijo por diazotación con bencidina es aplicable a la cuantificación de paracetamol sin interferencia de los excipientes, sin embargo debido a que la correlación entre los resultados obtenidos para principio activo y comprimidos no era muy buena, no se prosiguió con la validación de este método.

Así mismo el trabajo se ha incluido en esta presentación para demostrar que el método, al menos en las condiciones de ensayo realizadas, no es apropiado para los fines propuestos.

3.3 EXPERIMENTAL 3

MÉTODO CINÉTICO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA CUANTIFICACIÓN DE DICLOFENAC

Publicado en IOSR Journal of Pharmacy.
2(5), 2012, 13-17.

Se desarrolló un método cinético espectrofotométrico simple, versátil, costo-eficiente, y rápido, para ser aplicado a preparaciones farmacéuticas.

Se determinó la velocidad de reacción entre diclofenac y KMnO_4 en un medio fuertemente ácido. Se verificó una reacción de pseudo orden cero con respecto a la concentración de diclofenac. También se ha estudiado el efecto de la temperatura sobre esta reacción y se determinó la Energía de activación (E_a) de la misma. Para validar este método se determinaron: precisión, exactitud, especificidad, linealidad y rango lineal. Este procedimiento fue comparado estadísticamente con HPLC y no se encontraron diferencias significativas entre ambos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras y Reactivos

Se utilizó diclofenac principio activo lote 080301-5, origen China, (99,99% pureza determinada por HPLC) y diclofenac 50 mg comprimidos lote N° 103/12 provistos por PLAMECOR.

El placebo utilizado en las determinaciones de especificidad y exactitud también fue provisto por PLAMECOR, y su composición es la misma presente en los comprimidos: estearato de magnesio 1%, talco 2%, almidón glicolato de sodio 3,5%, polivinilpirrolidona (PVP) 1,2%, precompactado verde 73,2%.

KMnO_4 , grado analítico, Cicarelli (Argentina)

H_2SO_4 98%, grado analítico, Cicarelli (Argentina)

Equipamiento

Espectrofotómetro Boeco S-26 UV-visible.

Celda termostatzada Jenway. Modelo: 633004. Rango de temperatura: ambiente +2°C a 60°C. Precisión: $\pm 0,5^\circ\text{C}$

HPLC: Agilent 1120 compact LC, con detección UV.

Experimental

H_2SO_4 6N.

KMnO_4 $7,42 \times 10^{-4}$ M en H_2SO_4 1N.

Soluciones de principio activo 600 mg/L, 716 mg/L y 160 mg/L: se pesaron las cantidades de diclofenac principio activo correspondientes, y luego se llevó a volumen con agua destilada. Cada solución fue agitada magnéticamente por 10 min y posteriormente centrifugada. Se tomó el sobrenadante.

Soluciones de diclofenac comprimido 600 mg/L y 163 mg/L: fueron preparadas a partir de una mezcla homogénea de comprimidos finamente pulverizados, siguiendo el mismo procedimiento descrito para soluciones de principio activo.

Procedimiento Espectrofotométrico

Las lecturas fueron llevadas a cabo a 524 nm y a 30°C.

Análisis de principio activo: en la cubeta espectrofotométrica se adicionaron 2 mL de KMnO_4 $7,42 \times 10^{-4}$ M y 1 mL de H_2SO_4 6N, se incubó dentro del espectrofotómetro durante 10 min. Al cabo de este tiempo se agregó una alícuota de 25 μL de diclofenac principio activo 600 mg/L y se homogeneizó con micropipeta. Al ser un proceso batch, las lecturas a tiempo cero fueron efectuadas al cerrar la compuerta del espectrofotómetro. Se registró la absorbancia cada 5 s durante un período de 30 s. Se repitió este procedimiento para agregados de 50; 75 y 100 μL de diclofenac principio activo 600 mg/L, de manera que las concentraciones de diclofenac en la celda fueron 5,95; 11,80; 17,56 y 23,22 mg/L respectivamente. Se graficó absorbancia vs tiempo y se determinó la pendiente de cada curva utilizando el método de las pendientes iniciales. A continuación se construyó una curva de calibración graficando pendiente inicial ($\Delta A/\Delta t$) vs. concentración de diclofenac.

Análisis de comprimidos de diclofenac: se procedió de la misma manera que en el análisis de principio activo. Las alícuotas de solución de diclofenac comprimidos 600 mg/L fueron de 50 μL . Se procedió de igual manera que para principio activo. La concentración de diclofenac se calculó mediante la curva de calibración construida con principio activo.

Energía de activación

Este método se ensayó a varias temperaturas (30; 45; 50 y 60°C), lo cual permitió el análisis del efecto de la temperatura sobre la velocidad de la reacción. Mediante la ecuación de Arrhenius se determinó la energía de activación (E_a) de la oxidación diclofenac con KMnO_4 en un medio fuertemente ácido.

Validación del método

Para el estudio de linealidad se construyó una curva de calibración con soluciones de diclofenac principio activo en un rango entre 5 y 23 mg/mL.

La especificidad se determinó mediante lecturas espectrofotométricas de soluciones de placebo, preparadas a partir de los excipientes en igual proporción que aquella encontrada en comprimidos de 50 mg de diclofenac de PLAMECOR.

Se analizó precisión como repetibilidad. Se procesaron 10 alícuotas de una muestra homogénea (50 μL de solución diclofenac comprimidos 600 mg/mL) el mismo día, el mismo operador y utilizando el mismo instrumental.

Se determinó la exactitud del método a partir de la recuperación de cantidades conocidas de principio activo sobreagregadas a placebo. Se trabajó con distintos niveles de concentración de diclofenac (30; 60 y 90 μL diclofenac principio activo 716 mg/L). Este análisis se efectuó por triplicado.

Determinación por HPLC-UV

Para el análisis cromatográfico de diclofenac se utilizó una fase móvil consistente en metanol y buffer fosfato pH 2,5 (70:30), filtrada y desgasificada. El diluyente consistió en una mezcla de metanol y agua (70:30). Se trabajó con una columna: RP-18C, de medidas 125x4,5 mm. El flujo se mantuvo en 1 mL/min. La longitud de onda de detección fue 276 nm. El volumen de inyección fue de 20 μL . Se trabajó con soluciones de diclofenac principio activo de 160 mg/L y diclofenac comprimidos 163 mg/L. Se confirmó la identidad de picos con

el tiempo de retención de diclofenac. Se determinaron las áreas de pico que luego fueron convertidas a concentración mediante la Ecuación 29.

$$C_{\text{muestra}} = C_{\text{diclofenac}} \cdot A_{\text{diclofenac}} / A_{\text{muestra}} \quad \text{Ecuación 29}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se graficó absorbancia vs tiempo (Figura 21) y se procesaron los datos haciendo uso del método de las pendientes iniciales. La pendiente de cada curva a tiempo cero es proporcional a la concentración inicial de diclofenac.

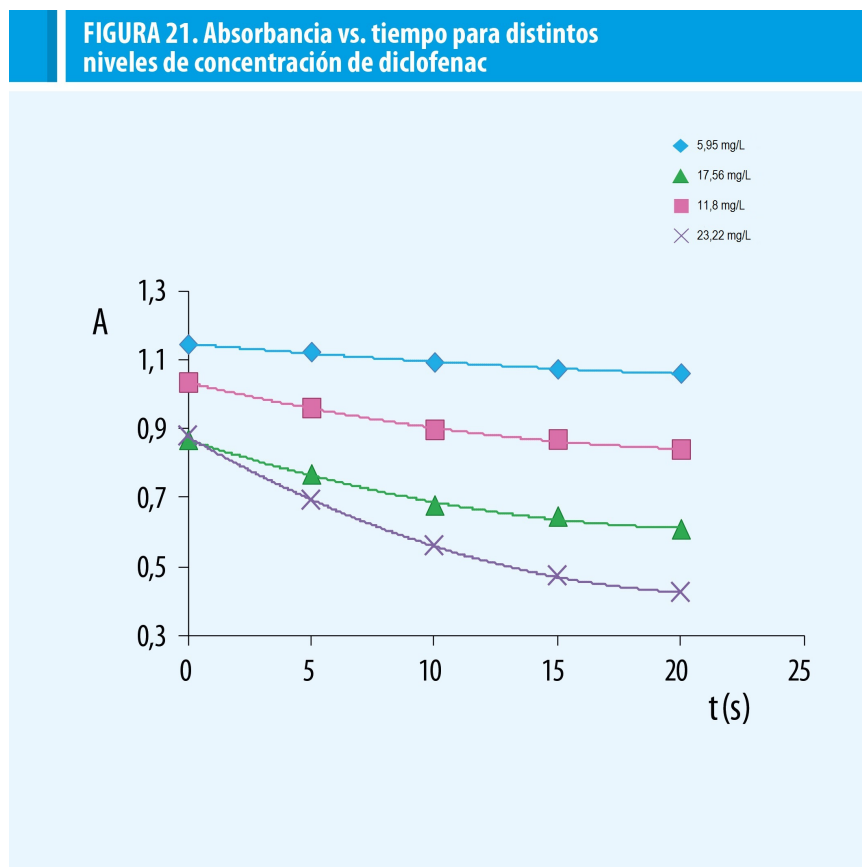
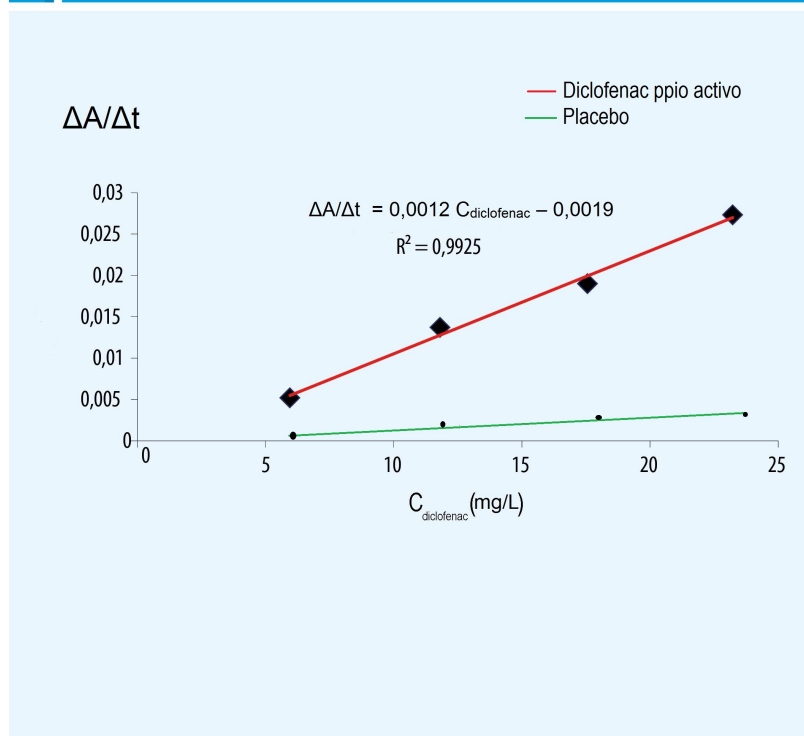


Figura 21: Absorbancia vs. tiempo de reacción para 5,96-23,22 mg/L de diclofenac

Curva de calibración: al graficar pendiente inicial ($\Delta A/\Delta t$) vs. concentración inicial de diclofenac, y efectuar un análisis de regresión lineal, se encontró una buena linealidad: [$\Delta A/\Delta t = 0,0012 C_{\text{diclofenac}} - 0,0019$] con $r^2 = 0,9925$, con un nivel de confianza del 95% (Figura 22). El rango de linealidad se verifica entre 5-23 mg/L.

FIGURA 22. Curva de calibración método cinético diferencial

Figura 22: pendiente inicial ($\Delta A/\Delta t$) vs. concentración inicial de diclofenac

El análisis espectrofotométrico de placebo demuestra que los excipientes presentes en los comprimidos de diclofenac son químicamente inertes a la oxidación con KMnO_4 , evidenciando con ello la especificidad del método.

Con respecto a exactitud, los porcentajes de recuperación de analito fueron de entre 98,7 – 108,15 %, valores que también se encuentran dentro del rango establecido por ANMAT y USP (Tabla 8).

Tabla 8: Exactitud (Recuperación). Se hicieron sobreagregados de principio activo de diclofenac a placebo en 3 intervalos de concentración, por triplicado

Vol _{diclo} 716 mg/L(mL)	C (mg/L)	Masa Recuperada (mg)	% Recuperación
30	7,67	193,58	108,15
	7,58	191,48	106,97
	7,33	185,17	103,45
60	14,92	190,19	106,25
	14,25	181,69	101,50
	14,75	188,06	105,06
90	20,67	177,39	99,10
	21,00	180,25	100,70
	20,58	176,67	98,70

En cuanto a la precisión, analizada como repetibilidad, se obtuvo un $CV\%=1,3\%$, valor que se encuentra por debajo del máximo establecido por las farmacopeas ($CV\%\leq 2\%$), estableciendo que el método es preciso (Tabla 9).

Tabla 9: Precisión (Repetibilidad), se efectuó el análisis de 10 alícuotas de muestras homogéneas equivalentes al contenido de diclofenac presente en un comprimido

Muestra N°	% Masa recuperada
1	99,38
2	101,50
3	99,16
4	102,92
5	99,52
6	102,38
7	99,94
8	100,04
9	99,68
10	99,70
X_{promedio}	100,42
SD	1,34
CV%	1,30

El efecto de la temperatura sobre la velocidad de la reacción se analizó mediante un gráfico de Arrhenius (Figura 23).

A partir de la ecuación de Arrhenius se calculó la energía de activación (E_a) para esta reacción, obteniéndose un valor de 21,48 kJ/mol. Este valor es comparable al valor reportado en la bibliografía para la mineralización de diclofenac con reactivo de Fenton (Fe^{2+} y H_2O_2) de 16,08 KJ/mol (Ravina y colaboradores, 2002).

Así mismo se calculó (a partir de la Ecuación 28) la entalpía de activación, obteniéndose un valor de $(\Delta H^0)^\ddagger = 18,87 \text{ kJ/mol}$. Es destacable la proximidad entre el valor de Energía de activación y el de la Entalpía de activación experimentales, dado que ambas corresponden a la barrera energética de esta reacción.

A partir de la misma ecuación 28 se determinó la entropía de activación $(\Delta S^0)^\ddagger = -138,91 \text{ J/molK}$. El signo negativo de la entropía de activación indica un aumento de orden o una disminución de los grados de libertad al formarse el estado activado a partir de los reactivos.

FIGURA 23. Gráfico de Arrhenius correspondiente a la oxidación de Diclofenac con KMnO₄ en medio fuertemente ácido

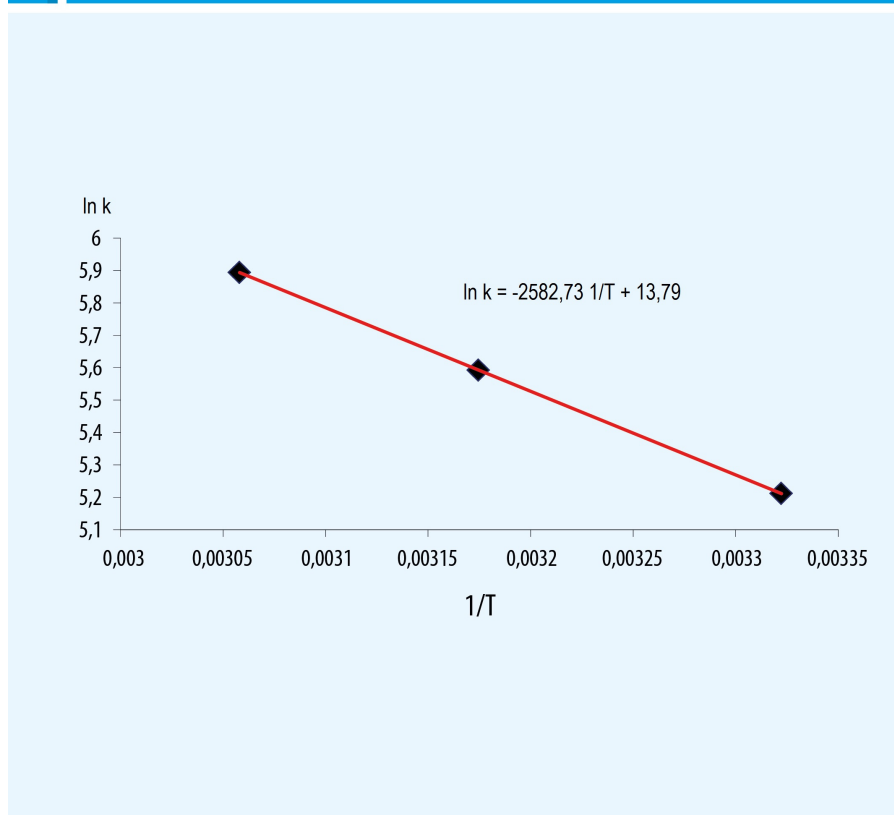


Figura 23: k corresponde a la velocidad de la reacción y $1/T$ a la inversa de la temperatura.

Este método cinético fue comparado estadísticamente con HPLC mediante el test t de Student y la prueba F (Tabla 10). El valor experimental de t resultó ser menor que el valor crítico de t de tablas, lo cual indica que la diferencia entre el método cinético y HPLC se debe a errores aleatorios. En cuanto a la prueba F , el valor experimental de F es menor que el valor tabulado, lo cual indica que ambos métodos no presentan desviaciones estándar significativamente diferentes en un nivel de confianza del 95%.

Tabla 10: Comparación estadística entre el método cinético espectrofotométrico y el método de referencia (HPLC)

Parámetro	Método Cinético Espectrofotométrico	HPLC-UV
Xm \pm SD	50,07 \pm 2,03	48,58 \pm 1,21
CV%	2,51	4,05
S²	4,12	1,48
Test F	2,77 (3,1788)	
Test t	-1,99 (2,1009)	

(Los valores entre paréntesis corresponden a los tabulados para $p=0,05$)

CONCLUSIONES

El método cinético espectrofotométrico con KMnO_4 como agente oxidante en medio fuertemente ácido es útil para el control de calidad de comprimidos de diclofenac de 50 mg, sin interferencia de excipientes. El método desarrollado es simple, rápido, de bajo costo, específico, y permite la cuantificación sin pasos previos de extracción.

4. MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS

4.1 TÉCNICAS ELECTROANALÍTICAS

4.1.1 Fundamentos

Los métodos electroquímicos son aquellos en los cuales se mide la respuesta eléctrica de un sistema químico.

El sistema experimental puede ser dividido en:

- Electrolito: sistema químico capaz de conducir la corriente
- Circuito externo o de medida: usado para aplicar o medir las señales eléctricas (corrientes, voltajes, etc.)
- Electrodo: conductores que sirven de contacto entre el sistema de medida y el electrolito.

Se denomina electrodo indicador o de trabajo aquel en que la reacción bajo estudio tiene lugar; y electrodo de referencia, a aquel que mantiene su potencial constante independientemente de los cambios producidos en la corriente.

La gran variedad de métodos analíticos posibles de implementar ha determinado que existan diferentes corrientes de opinión acerca de la clasificación y sistematización para el estudio de estos métodos. Los autores Hammerly y Marracino, clasifican estos métodos de acuerdo al fenómeno fisicoquímico en que se basan, así se tienen:

1.- Métodos basados en reacciones electroquímicas

a) A corriente nula ($i=0$)

- Potenciometría
- Titulaciones potenciométricas

b) A corriente no nula ($i \neq 0$)

- Métodos que se basan en fenómenos transitorios en el electrodo, es decir, varían con el tiempo

- Polarografía
- Amperometría
- Valoraciones amperométricas

- Métodos caracterizados por procesos de electrodo en régimen estacionario, es decir, hay difusión constante (agitación constante de la disolución)

- Voltametría
- Culombimetría
- Titulaciones culombimétricas ($i=cte$)
- Electrogravimetría
- Separaciones electrolíticas

2.- Métodos que no presentan reacción en el electrodo

- Conductimetría

- Titulaciones conductimétricas
- Electroforesis

A continuación se describirán en detalle: titulaciones coulombimétricas y titulaciones conductimétricas, dado que éstas son las únicas técnicas electroanalíticas que han sido empleadas en el desarrollo de la presente tesis. Electroforesis capilar es abordada en el Capítulo 5, junto con los métodos separativos.

4.2 CULOMBIMETRÍA

4.2.1 Fundamentos

La coulombimetría comprende los métodos electroquímicos de análisis, basados en la medición de la cantidad de electricidad necesaria para llevar a grado cuantitativo una reacción electroquímica.

Se fundamenta en la ley de Faraday, que establece que la corriente en amperios que pasa durante un tiempo determinado está relacionada con el número de moles:

$$N = \frac{i \cdot t}{96485 \cdot n} \quad \text{Ecuación 30}$$

Donde: N: número de moles
i: corriente (amperes)
t: tiempo (segundos)
96485: (culomb.mol⁻¹) constante de Faraday
n: número de electrones transferidos por mol

Al llevar a cabo un análisis coulombimétrico se determina la carga total necesaria para completar una oxidación o reducción electroquímica. Esta carga es directamente proporcional a la cantidad total de sustancias electrolizadas, siempre y cuando se lleve a cabo una única reacción electroquímica y la reacción electrónica proceda con 100% de eficiencia de corriente.

Los métodos coulombimétricos pueden ser directos o indirectos. En los directos, la reacción de interés se produce directamente sobre un electrodo apropiado. En el segundo caso se recurre a la generación en uno de los electrodos de un reactante adecuado, soluble, que reaccione cuantitativamente en solución con la sustancia analizada, éstas son las titulaciones coulombimétricas. (Harris, 2009)

4.2.2 Titulación coulombimétrica

4.2.2.1 Fundamentos

En la titulación coulombimétrica se genera electroquímicamente *in situ* el reactivo valorante, que reaccionará cuantitativamente con la sustancia a determinar mediante una reacción química adecuada (ácido-base, redox, complejación, precipitación).

La cantidad de reactivo generado es proporcional a la cantidad de corriente eléctrica, y ésta al tiempo de electrólisis. De esta manera se reemplaza la

medición de volumen de reactivo agregado hasta el punto final de la volumetría clásica, por la medida del tiempo de electrólisis de la titulación culombimétrica.

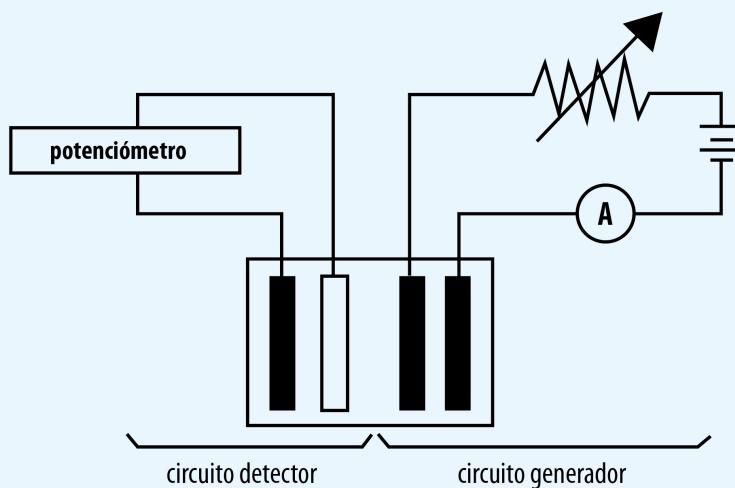
La intensidad de corriente debe mantenerse constante a lo largo de toda la operación para impedir la oxidación o reducción de especies desconocidas en el electrodo generador, ya que es inevitable la polarización por concentración antes de que la electrólisis pueda completarse.

Entre las ventajas de las titulaciones culombimétricas podemos mencionar: que no requieren calibración frente a patrones; no es necesario almacenar disoluciones de reactivos inestables, dado que estos se preparan *in situ*; se manejan menores cantidades de valorante y muestra; son fácilmente automatizables.

Es necesario algún método para determinar el punto final. Se han aplicado con éxito la observación visual de los cambios de color de indicadores, así como medidas potenciométricas, amperométricas y de conductancia. (Skoog y colaboradores, 2001)

4.2.2.2 Equipamiento

FIGURA 24. Equipo para titulaciones culombimétricas



El instrumental utilizado para las titulaciones conductimétricas (Figura 24) consta de:

- Una fuente rectificadora con entrada a 220V y salidas opcionales a 3, 6, 9V.
- Una resistencia variable de 1 kilohmio, que se regula manualmente para generar en la celda electrolítica una corriente del orden de los mA.
- Un amperímetro para efectuar el registro de la corriente circulante i .
- Un cronómetro manual para el registro del tiempo t durante el cual circula i .
- La celda electrolítica, donde se sitúan:
 - un par de electrodos conectados a la fuente (circuito generador):
 - electrodo generador de reactivo titulante
 - electrodo auxiliar
 - un par de electrodos conectados al potenciómetro (circuito detector):
 - electrodo indicador
 - electrodo de referencia de calomel saturado (ECS).

La generación anódica de agentes oxidantes se acompaña con frecuencia del desprendimiento de hidrógeno en el cátodo; por lo cual es necesario permitir el escape del gas de la disolución para prevenir su reacción con el agente oxidante. Se puede aislar al electrodo auxiliar mediante un encamisado de vidrio con un orificio superior que permita la salida del gas. Además, la celda es montada sobre un agitador magnético, lo que disminuye la polarización por concentración y hace posible la rápida eliminación del H_2 formado. (Hammerly y Marracino, 1984)

4.3 EXPERIMENTAL 4

CULOMBIMETRÍA DEL PARACETAMOL A PARTIR DE COMPRIMIDOS FARMACÉUTICOS

Los ensayos de este método fueron llevados a cabo por Elizabeth Popelka, en el marco de una adscripción en nuestra cátedra.

Se desarrolló una técnica culombimétrica a corriente constante con detección potenciométrica y bromo como titulante para la valoración de paracetamol en comprimidos de 500 mg sin cubrimiento entérico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras y Reactivos

Se utilizó paracetamol principio activo lote N° 0707043, origen China, (99,99% pureza determinada por HPLC) y paracetamol 500 mg comprimidos lote N° 039/09 provistos por PLAMECOR.

El placebo utilizado en las determinaciones de especificidad y exactitud también fue provisto por PLAMECOR, y su composición es la misma presente en los comprimidos: estearato de magnesio 1%, talco 2%, almidón glicolato de sodio 4,8%, polivinilpirrolidona (PVP) 5,2%, precompactado blanco 16,6%, aerosil 1,4%.

Ácido acético glacial, grado analítico, Cicarelli (Argentina).

Bromuro de sodio, grado analítico, Vulcano S.R.L (Perú)

Experimental

Soluciones de principio activo 1 mg/mL: se pesaron las cantidades de paracetamol principio activo correspondientes, y luego se llevó a volumen con agua destilada.

Soluciones de paracetamol comprimidos 1 mg/mL: fueron preparadas a partir de una mezcla homogénea de comprimidos finamente pulverizados, siguiendo el mismo procedimiento descrito para soluciones de principio activo.

Solución electrolítica: 25 mL de agua destilada, 10 mL NaBr 1M, 15 mL ácido acético glacial.

Titulación coulombimétrica

En una celda de 100 mL de volumen útil, termostatizada a 25°C, se introdujeron 50 mL de solución electrolítica. Se sumergieron dos electrodos de Pt, uno generador de bromo y otro auxiliar, protegido con un encamisado de vidrio, en el que se generó hidrógeno. Una fuente de 3,0V DC en serie con una resistencia variable de 1 Kilohmio a escala completa permitió mantener la corriente constante en 10 mA. Un electrodo de Pt, y uno de calomel saturado conectados a un potenciómetro fueron indicadores del punto final de la titulación. A tiempo cero se introdujeron de 1 a 10 mL de estándar de 1 mg/mL solución principio activo. Se registró el tiempo requerido para completar la titulación. Primeramente se graficó $t(\text{min})$ vs $E(\text{mV})$ (Figura 25), y a continuación se graficó la primera derivada (Figura 26), para facilitar la detección del punto final dE/dt vs $t(\text{min})$.

Se procedió de la misma manera con las soluciones de comprimido de paracetamol.

RESULTADOS

Cada titulación de paracetamol se completó en un lapso de aproximadamente 6 min por cada miligramo en las condiciones especificadas.

La respuesta es lineal en el rango de 1 a 10 mg. Masas de paracetamol superiores insumen un tiempo de análisis injustificado. El método permite la determinación secuencial de un número considerable de muestras, sin más que la adición respectiva a la celda de titulación.

Los coulombios necesarios para alcanzar el punto final conducen a una relación de seis equivalentes de Bromo por cada mol de paracetamol.

Si bien, determinada la estequiometría no es necesaria una curva de calibrado, su aplicación responde a una linealidad de 0,077 mg paracetamol/minuto ($r^2 = 0,9936$).

En la figura 27 se muestra la relación entre la carga consumida (coulombios) y la masa de paracetamol introducida en la celda de titulación, las que guardan una proporción lineal.

Repetibilidad: de la repetición de diez determinaciones a partir de la solución de comprimidos resultó un CV de 1,5% para 2 mL de solución.

Especificidad: al operar con placebos, no se manifestaron interferencias por parte de los excipientes: lactosa, almidón glicolato de sodio, polivinilpirrolidona, talco, estearato de magnesio

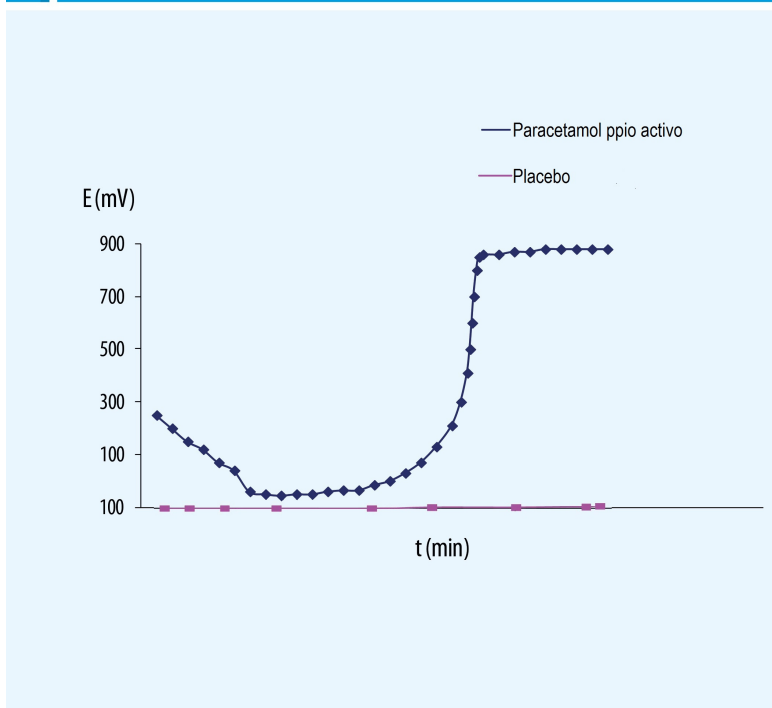
FIGURA 25. Titulación culombimétrica de paracetamol

 Figura 25: Potencial E (mV) vs tiempo de reacción

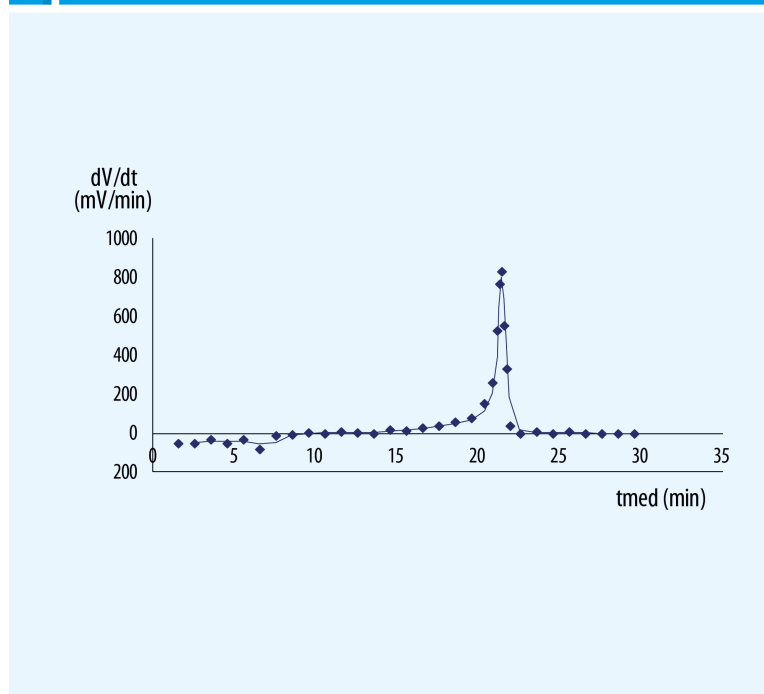
FIGURA 26. Método de la primera derivada

 Figura 26: Mejora en la detección del punto final. Primera derivada dV/dt vs t medio de reacción

FIGURA 27. Carga consumida vs masa de paracetamol

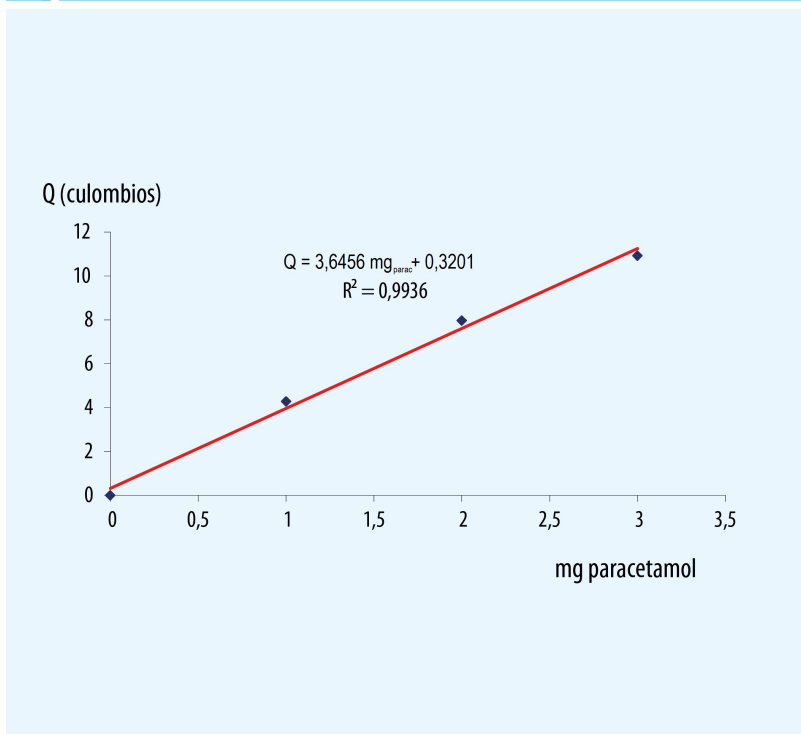


Figura 27: Carga consumida en culombios vs masa de paracetamol

CONCLUSIONES

Es posible la valoración culombimétrica con bromo de paracetamol 500 mg comprimidos farmacéuticos, con precisión aceptable en un tiempo breve de análisis sin interferencias por parte de los excipientes y con instrumental de bajo costo.

Cabe destacar que el culombímetro utilizado es de construcción artesanal, y tanto la resistencia como el cronómetro se operan manualmente, lo que conlleva a una falta de repetibilidad, dados los tiempos breves de análisis, situación que consideramos factible de corrección con un equipo automático. La robustez de ésta metodología no resultó adecuada, por lo cual no se procedió a la validación según normativa establecida por el ANMAT para su uso en controles de calidad de medicamentos.

4.4 EXPERIMENTAL 5 DICLOFENAC POR CULOMBIMETRÍA AMPEROSTÁTICA

Se desarrolló una culombimetría amperostática de diclofenac con cloro electrogenerado, con punto final potenciométrico para valorar esta droga, tanto en principio activo como en comprimidos.

La ventaja adicional sobre otras técnicas reside en la ausencia de interferencias por parte de los excipientes, de forma que la adecuación de la

muestra, al igual que para comprimidos de paracetamol, se reduce simplemente a la disolución del comprimido de diclofenac en solución acuosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras y reactivos

Material de Referencia: se utilizó diclofenac sódico lote 20010321L. Origen: China. Diclofenac comprimidos de 50 mg lote 083. Tanto principio activo, como comprimidos fueron provistos por PLAMECOR.

El placebo utilizado en las determinaciones de especificidad también fue provisto por PLAMECOR, y su composición es la misma presente en los comprimidos: estearato de magnesio 1%, talco 2%, almidón glicolato de sodio 3,5%, polivinilpirrolidona (PVP) 1,2%, precompactado verde 73,2%.

Ácido clorhídrico, 37%, grado analítico, Cicarelli (Argentina).

Equipamiento

Potenciómetro Metrohm-Herisau (Suiza)

Experimental

Soluciones de principio activo 0,05 mg/mL: se pesaron las cantidades de diclofenac principio activo correspondientes, y luego se llevó a volumen con agua destilada. Cada solución fue agitada magnéticamente por 10 min y posteriormente centrifugada. Se tomó el sobrenadante.

Soluciones de diclofenac comprimido 0,05 mg/mL: fueron preparadas a partir de una mezcla homogénea de comprimidos finamente pulverizados, siguiendo el mismo procedimiento descrito para soluciones de principio activo.

Solución electrolítica: HCl 0,06N

Titulación coulombimétrica

En una celda de 100 mL de volumen útil, termostatzada a 20°C, se introdujeron 70 mL de HCl 0,06 N como solvente electrolítico. Se sumergieron en la celda dos electrodos de Pt, en uno de ellos se produce la generación del gas cloro. El ánodo fue rodeado por un encamisado de vidrio con orificio de salida superior para minimizar la difusión del gas hidrógeno en el medio, y la consecuente producción de reacciones secundarias. La fuente de 3,0V DC en serie con una resistencia variable de 1 Kilohmio a escala completa permitió regular la corriente en 5 mA, verificada mediante un microamperímetro. Un electrodo indicador de hilo de Pt, y uno de referencia de calomel saturado conectados a un potenciómetro permitieron monitorear el progreso de la titulación. A tiempo cero se introdujeron 1 a 4 mL de estándar de 0,05 mg/mL de solución principio activo de diclofenac. Se registró el tiempo requerido para completar la titulación. Primeramente se graficó $t(\text{min})$ vs $E(\text{mV})$, y a continuación se graficó la primera derivada, para facilitar la detección del punto final dE/dt vs $t_{\text{med}}(\text{min})$.

Se procedió de la misma manera con las soluciones de comprimido de diclofenac.

RESULTADOS

Trabajando con principio activo, y mediante la primera derivada de la sigmoidea obtenida, se estableció el punto final en 600 mV.

En estas condiciones se titulan 0,15 mg de diclofenac/minuto. La respuesta es lineal en el rango de 0,05 a 0,50 mg. Cantidades mayores de diclofenac producen el enturbiamiento en la solución, debido a la solubilidad limitada del fármaco en este medio. El método permite la determinación secuencial de un número considerable de muestras, sin más que la adición respectiva a la celda de titulación.

En la figura 28 se muestra la titulación coulombimétrica de 0,25 mg de principio activo y de placebo. Dada la respuesta prácticamente nula alcanzada con el placebo se infiere la ausencia de interferencias por parte de los excipientes: precompacto verde, polivinilpirrolidona, almidón, talco y estearato de magnesio.

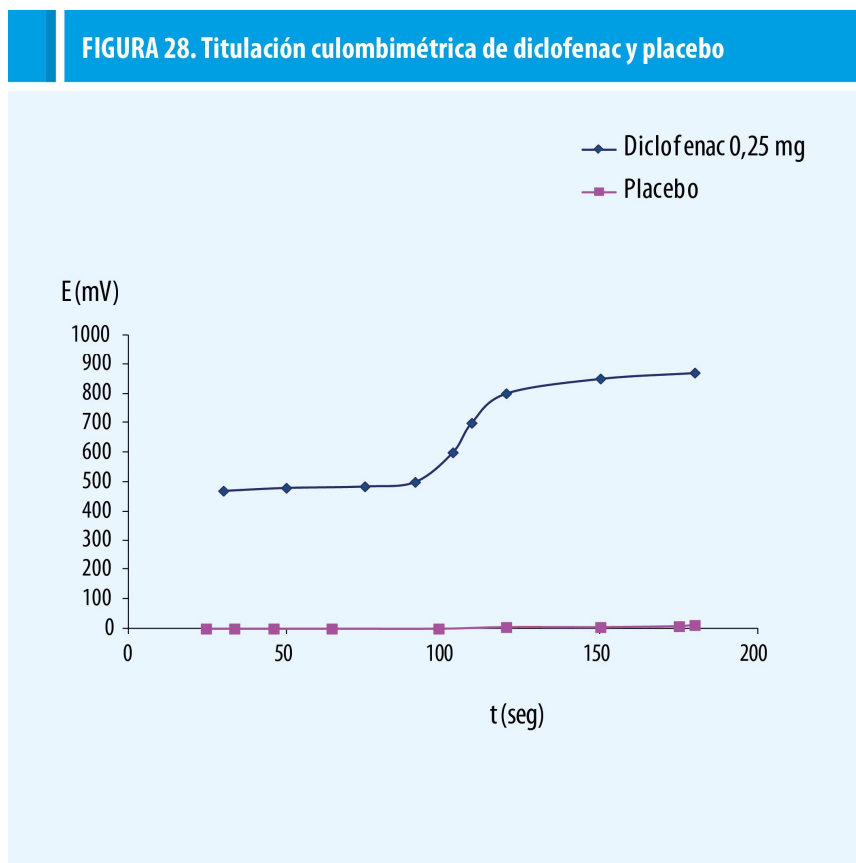


Figura 28: Potencial E (mV) en función del tiempo de reacción para diclofenac 0,25 mg y placebo

En la Figura 29 se observa la mejora en la definición del punto final a través de la primera derivada.

En la figura 30 se muestra la relación entre la carga consumida (culombios) y la masa de diclofenac introducida en la celda de titulación, las que guardan una proporción lineal.

FIGURA 29. Método de la primera derivada

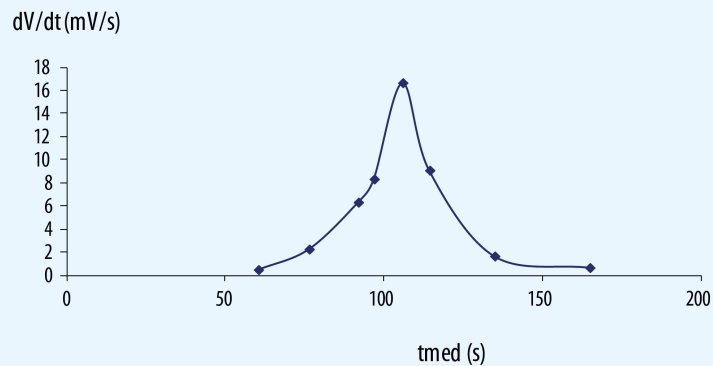


Figura 29: Mejora en la detección del punto final. Primera derivada dV/dt vs t medio de reacción

FIGURA 30. Carga consumida vs masa de diclofenac

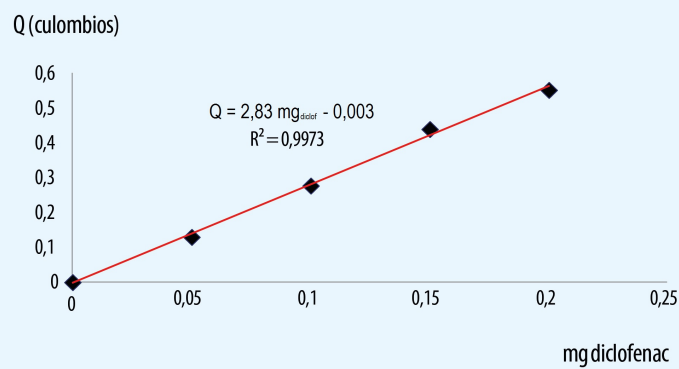


Figura 30: Carga en culombios consumida vs masa de diclofenac

CONCLUSIONES

Es posible la valoración coulombimétrica con cloro de diclofenac 50 mg comprimidos farmacéuticos con precisión aceptable en un tiempo breve de análisis sin interferencias por parte de los excipientes. El método propuesto es rápido, sencillo y de fácil automatización. El tratamiento previo de la muestra se reduce simplemente a la disolución acuosa del comprimido. El costo inicial y de mantenimiento del instrumento, inferiores que en HPLC, hacen de la técnica coulombimétrica una alternativa para el control de calidad del diclofenac presente en monofármacos.

Al igual que en la coulombimetría de paracetamol el coulombímetro utilizado es de construcción artesanal, y tanto la resistencia como el cronómetro se operan manualmente, lo que conlleva a una falta de repetibilidad, dados los tiempos breves de análisis, situación que consideramos factible de corrección con un equipo automático. La robustez de ésta metodología no resultó adecuada, por lo cual no se procedió a la validación según normativa establecida por el ANMAT para su uso en controles de calidad de medicamentos.

4.5 CONDUCTIMETRÍA

4.5.1 Fundamentos

La conductimetría comprende un grupo de métodos analíticos basados en la medida de la conductancia eléctrica de una disolución. La conductividad es una magnitud característica de los conductores de la electricidad, viene dada por la migración de los aniones y cationes en solución, hacia los electrodos respectivos. (Rubinson y Rubinson, 2007)

Se cumple la ley de Ohm:

$$V = i.R \text{ Ecuación 31}$$

donde V: es el potencial aplicado (voltios)

i: es la corriente eléctrica (amper)

R: es la resistencia (ohm)

La conductancia (L) es la recíproca de la resistencia (R) y se expresa en ohm^{-1} .

$$L = \frac{K.S}{l} \text{ Ecuación 32}$$

donde l: distancia entre electrodos

S: área de los electrodos

K: conductancia específica ($\text{ohm}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

Al valor $\frac{l}{S}$ se lo denomina constante de celda θ y se expresa en cm^{-1} . La

Ecuación 32 queda entonces:

$$L = K.\theta^{-1} \quad \text{Ecuación 33}$$

La conductancia se expresa en Siemens que se simboliza con S.

La conductividad equivalente (Λ) se define como la conductancia de una solución que contiene 1 equivalente gramo de soluto, entre dos grandes electrodos paralelos, colocados a 1 cm de distancia entre sí. Para una solución de concentración C equivalentes gramo por litro resulta:

$$\Lambda = 1000 \cdot \frac{K}{C} \quad \text{Ecuación 34}$$

Reemplazando el valor de K, se tiene:

$$\Lambda = 1000 \cdot \frac{L.l}{C.S} \quad \text{Ecuación 35}$$

$$\Lambda = 1000 \cdot \frac{L.\theta}{C} \quad \text{Ecuación 36}$$

$$L = 10^{-3} \cdot \theta^{-1} \cdot C \cdot \Lambda \quad \text{Ecuación 37}$$

A dilución infinita es válida la expresión:

$$\Lambda^{\circ} = \lambda_{+}^{\circ} + \lambda_{-}^{\circ} \quad \text{Ecuación 38}$$

para un solo electrolito, donde λ_{+}° y λ_{-}° son las conductividades iónicas equivalentes a dilución infinita para el catión y el anión respectivamente.

La ecuación 38 se puede reescribir:

$$\Lambda = \lambda_{+} + \lambda_{-} \quad \text{Ecuación 39}$$

resultando válida para expresar la conductividad equivalente y las conductividades iónicas equivalentes a dilución infinita. Reemplazando la ecuación 39 en 37 se tiene:

$$L = 10^{-3} \cdot \theta^{-1} \cdot \sum C_i \cdot \lambda_i \quad \text{Ecuación 40}$$

C_i y λ_i corresponden a la concentración y la conductividad iónica equivalente de cada especie iónica en solución (Hammerly y Marracino, 1984)

4.5.2 Titulación conductimétrica

4.5.2.1 Fundamentos

La titulación conductimétrica se basa en detectar la variación de la conductancia eléctrica de una muestra en solución durante el transcurso de una valoración, a efectos de determinar el punto de equivalencia de la misma.

El método conductimétrico es muy versátil, y puede aplicarse en muchos casos en donde no se dispone de indicadores y no pueden aplicarse los

métodos potenciométricos. Se pueden aplicar a reacciones con pequeñas constantes de equilibrio y a soluciones de muy bajas concentraciones. Además, son adaptables a las técnicas de instrumentación automática. (Rubinson y Rubinson, 2007)

La principal ventaja de las titulaciones conductimétricas es que las curvas de titulación son líneas rectas, por lo tanto se obtienen 3 o 4 puntos antes y después del punto de equilibrio de la titulación y por extrapolación se obtiene el punto final (no interesa lo que ocurre en el punto mismo de equivalencia), lo cual hace de la titulación conductimétrica, una técnica adecuada para reacciones incompletas.

Este método es aplicable en general a reacciones en que hay variación en el número total de iones en solución o donde iones de gran movilidad son sustituidos por otros de menor movilidad y viceversa. (Hammerly y Marracino, 1984)

Puede aplicarse en principio a equilibrios ácido-base, precipitación y formación de complejos principalmente. No obstante, el requisito indispensable de ausencia de electrolitos extraños al que se pretende dosar constituye una importante limitación del método.

Cuando se agrega un reactivo titulante, la conductancia disminuye hasta que se alcanza el punto final, a partir de él puede permanecer constante o aumentar frente al primer exceso de reactivo. Se obtienen curvas de titulación en forma de V (Figura 31), cuyos puntos de inflexión indican el punto final de la titulación. Es conveniente que exista una diferencia significativa de conductancia entre la solución incógnita y el reactivo o producto de la titulación. No es necesario conocer la conductancia de la solución original sino sus variaciones relativas.

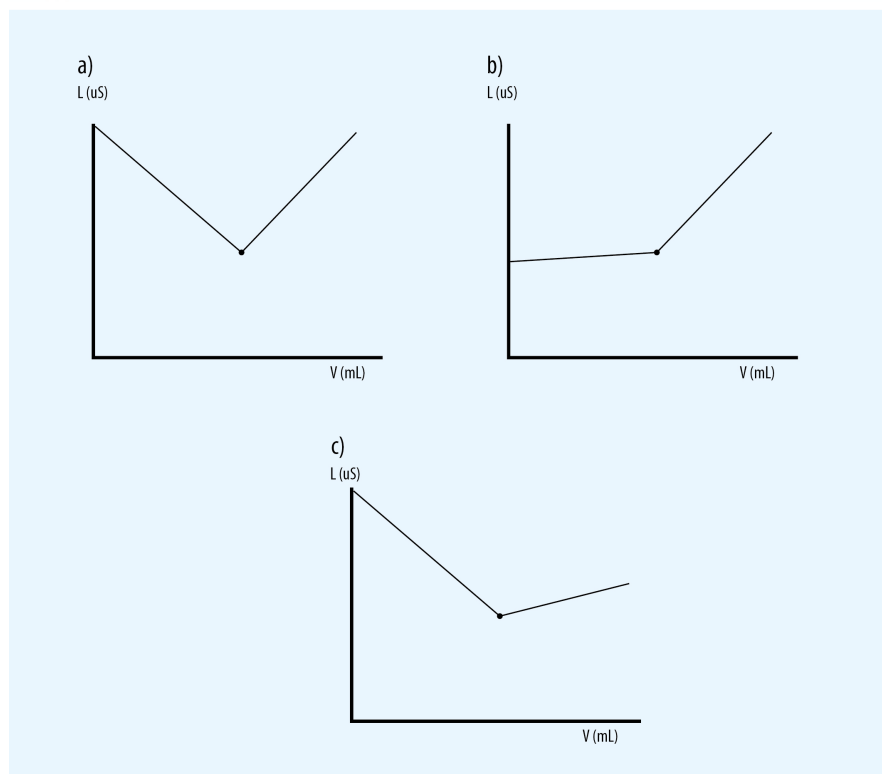
La conductividad de una solución depende además de la cantidad de iones presentes ya considerada, del tamaño y movilidad de los mismos. Cuánto más pequeño y móvil sea un ión mayor será su conductividad eléctrica. (Skoog y colaboradores, 2001)

Generalmente se representan en la rama de la izquierda las conductividades iónicas de la sustancia a valorar y de los iones del reactivo; en la segunda rama la de las sustancias producto de la reacción, más el exceso de reactivo añadido. La intersección de ambas ramas de la curva determina el punto final de la titulación. La conductancia de la solución y el consumo de reactivo se miden progresivamente.

Entre los factores que influyen en la conductancia de una solución, se encuentran: concentración, temperatura, tamaño y movilidad iónica, así como la naturaleza química del solvente utilizado. Cuánto más polar sea el mismo, mayor será la ionización del soluto, siendo el agua el solvente ideal.

A los efectos de mantener baja la variación de volumen durante la titulación, se debe mantener una concentración de titulante 20 veces superior a la de la solución titulada. De lo contrario deberá efectuarse la corrección respectiva utilizando un factor de dilución.

FIGURA 31. Curvas de titulaciones conductimétricas correspondientes a titulaciones conductimétricas de: a) ácido fuerte con base fuerte; b) ácido débil con base fuerte; c) ácido fuerte con base débil



4.5.2.2. Equipamiento

El circuito tradicional para medir conductancia electrolítica es el puente de Wheatstone (Figura 32), convenientemente modificado para operar en corriente alterna, de manera de evitar tanto como sea posible los efectos de electrólisis y polarización electrodica.

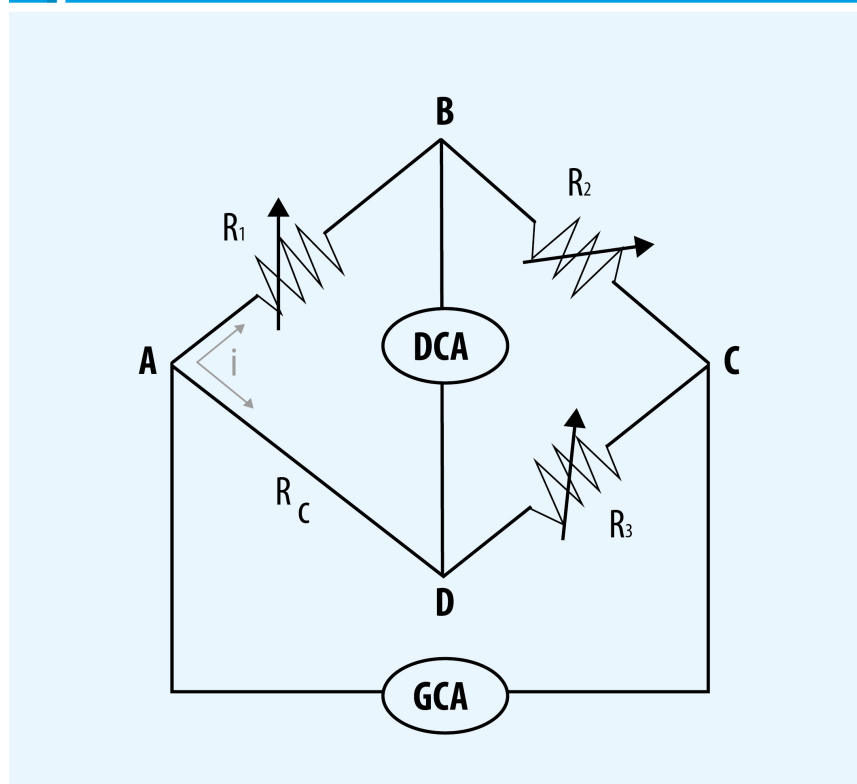
DCA es un Detector de Corriente Alterna de aproximadamente 1000Hz, GCA es un Generador de Corriente Alterna de la misma frecuencia que el detector.

El puente se alimenta mediante del GCA, generalmente a la frecuencia de la electricidad. Las resistencias R_2 y R_3 permiten seleccionar distintas relaciones de trabajo a efectos de lograr que la medida entre en escala. Un condensador en paralelo con R_1 corrige los pequeños fenómenos capacitivos que pueden presentarse y permite equilibrar la celda de capacitancia. (Hammerly y Marracino, 1984)

Las celdas comunes de uso en el laboratorio son de vidrio con electrodos de Pt, recubiertos por una capa de negro de platino a efectos de lograr una mayor superficie efectiva y reducir los efectos de polarización.

Para evitar errores de medida debidos a la distribución del campo eléctrico, las medidas se llevan a cabo en un volumen definido de solución. Por ello las celdas de inmersión están siempre rodeadas por una campana de vidrio. (Harris, 2009)

FIGURA 32. Puente de Wheatstone para medición de conductancia



4.6 EXPERIMENTAL 6

CUANTIFICACIÓN DE PARACETAMOL EN COMPRIMIDOS POR TITULACIÓN CONDUCTIMÉTRICA

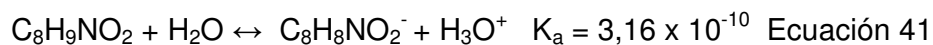
Publicado en la Revista Industria y Química
Nº 355, 2007, pp 47-50.

Los ensayos experimentales de este método fueron llevados a cabo por Débora Radovancich, en el marco de una beca de pregrado, en nuestra cátedra.

Se desarrolló una técnica conductimétrica para la cuantificación de paracetamol en comprimidos que lo contienen como monodroga.

Cuando una reacción química da lugar a un cambio (aumento ó disminución) del número total de iones en solución, ó bien iones de gran movilidad son sustituidos por otros de menor movilidad y viceversa, la misma es aplicable a una titulación conductimétrica.

El paracetamol es un ácido débil ($pK_a = 9,5$) debido a su grupo hidroxilo aromático:



Por lo tanto, en la titulación con una base fuerte como el NaOH tiene lugar la neutralización:



Los iones $\text{C}_8\text{H}_8\text{NO}_2^-$ de baja movilidad iónica, debido a su gran tamaño, son reemplazados por iones Na^+ de mayor movilidad, lo que conduce a un aumento de la conductancia de la solución en el transcurso de la primera fase de la titulación.

La curva de titulación del paracetamol con NaOH presenta un gran ángulo entre la línea de titulación y la de exceso de valorante, lo que conlleva cierta dificultad para localizar con precisión el punto final, ubicado en la intersección de dos líneas de pendientes crecientes y similares.

Este resultado puede mejorarse mediante la adición de un exceso de una base débil, como amoníaco, lo cual conduce a:



por lo que la reacción de titulación del paracetamol con agregado de un exceso de amoníaco frente a una base fuerte como el NaOH consiste sustancialmente en la neutralización de los iones amonio, estequiométricamente equivalentes al paracetamol.

Antes del punto de equivalencia, los OH^- añadidos neutralizan a los NH_4^+ . El cambio en la conductividad resulta de la diferencia entre las movilidades iónicas del Na^+ y el NH_4^+ (Tabla 11). Después del punto de equivalencia, la conductancia crece con gran pendiente como consecuencia del incremento de iones OH^- en exceso. El agregado de amoníaco facilita la ubicación gráfica del punto final.

Tabla 11: Conductancias Iónicas Equivalentes a Dilución Infinita y 25°C

CATION	Λ_0^+ (ohm ⁻¹ cm ² mol ⁻¹)	ANION	Λ_0^- (ohm ⁻¹ cm ² mol ⁻¹)
H+	398,2	OH-	198
Li+	38,69	Cl-	75,23
Na+	50,11	I-	76,8
K+	73,52	CH ₃ COO-	40,9
NH ₄ +	73,4	NO ₃ -	71,4

(Extraído de Robinson y Robinson, 2001)

Las titulaciones conductimétricas, de naturaleza electroquímica, hacen posible su aplicación a muestras coloreadas ó turbias. Este es generalmente el caso en la industria farmacéutica, debido principalmente a la presencia de excipientes en los medicamentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras y reactivos

Se utilizó paracetamol 500 mg comprimidos lote N° 054/08 provistos por PLAMECOR.

NaOH, grado analítico, Cicarelli (Argentina).

NH₃, grado analítico, Biopack (Argentina)

Equipamiento

Conductímetro de laboratorio Antares III, Parsec (Argentina)

Experimental

Soluciones de trabajo: 1 mg/mL, según rótulo, de mezcla homogénea de comprimidos de paracetamol finamente pulverizados.

Reactivo titulante: NaOH 1N.

Titulación conductimétrica

Se sumergieron los electrodos del conductímetro en un vaso de precipitados conteniendo 150 mL de la solución 1 mg/mL de paracetamol comprimidos. Para mejora de la detección del punto final, se agregaron 0,5 mL de amoníaco concentrado. Se registró la conductancia. A continuación se hicieron agregados de 1 a 15 mL de reactivo titulante, registrando la conductancia luego de cada uno de ellos. Se graficó Conductancia L (μS) vs. Volumen V (mL) y se localizó el punto final.

RESULTADOS

Se obtuvieron curvas de titulación correspondientes a la valoración de un ácido débil con una base fuerte (Figura 33).

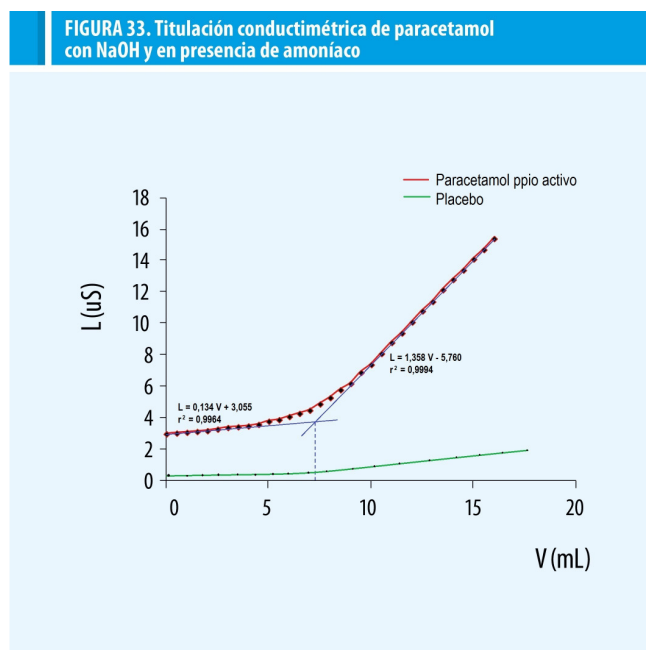


Figura 33: Conductancia (L) vs. volumen de titulante, se señalan las rectas correspondientes a la determinación del punto final

Determinación del punto final: se determinan las ecuaciones por regresión lineal de los puntos más alejados del equilibrio (los 4 puntos iniciales y 4 puntos finales de la titulación respectivamente), se trazan ambas rectas. Se determina el punto de intersección, el cual corresponde al volumen final de la titulación. En dicho punto, la igualación de las rectas permite calcular matemáticamente el valor del volumen correspondiente al punto final. (Miller y Miller, 2000)

A partir de la determinación del punto final de la titulación se calculó el contenido de paracetamol presente en los comprimidos de paracetamol 500 mg elaborados por PLAMECOR.

CONCLUSIONES

Es posible la valoración conductimétrica de paracetamol 500 mg comprimidos farmacéuticos, con precisión aceptable en un tiempo breve de análisis sin interferencias por parte de los excipientes y con instrumental de bajo costo.

Actualmente, la titulación conductimétrica de comprimidos de paracetamol forma parte de la nómina de Trabajos Prácticos de Laboratorio de los alumnos de Química Analítica Instrumental y Química Analítica II, de las carreras de Bioquímica y Licenciatura en Química, de ésta Facultad.

Debido al gran número de variables operativas, la robustez de estas metodologías electroquímicas no resultó adecuada, por lo cual no se procedió a la validación según la normativa establecida por el ANMAT para su uso en controles de calidad de medicamentos.

5. SEPARACIONES ANALÍTICAS: MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS Y ELECTROFORESIS CAPILAR

5.1 HPLC (Cromatografía de líquidos de alta eficacia)

5.1.1 Fundamentos

La Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) es una técnica cromatográfica que utiliza partículas muy pequeñas de fase estacionaria y una gran presión para forzar al disolvente a pasar a través de la columna, consiguiendo separaciones de gran resolución. (Rubinson y Rubinson, 2001)

En función del mecanismo de interacción del soluto con la fase estacionaria, la cromatografía se divide en las siguientes categorías (Figura 34):

Cromatografía de adsorción: utiliza una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida o gaseosa. El soluto se adsorbe en la superficie de las partículas sólidas. Cuánto más fuertemente se adsorbe un soluto, más lento es su pasaje a través de la columna.

Cromatografía de reparto: utiliza una fase estacionaria líquida, en forma de una fina película de alto punto de ebullición sobre la superficie de un soporte sólido, típicamente la cara interna de una columna de sílice. El soluto está en equilibrio entre el líquido estacionario y la fase móvil.

Cromatografía de intercambio iónico: existen aniones o cationes covalentemente unidos a la fase estacionaria sólida. Los iones en la disolución de carga opuesta, son atraídos a la fase estacionaria por fuerzas electrostáticas. La fase móvil es un líquido.

Cromatografía de exclusión molecular (también filtración por gel o permeación por gel): separa moléculas por su tamaño. Las moléculas de mayor tamaño pasan más rápidamente que las de menor tamaño. A diferencia de las otras cromatografías, no hay una interacción atractiva entre la fase estacionaria y el soluto. La fase móvil pasa a través del gel poroso. Los poros son bastante pequeños para excluir a los solutos grandes, pero no a los pequeños. Las moléculas grandes pasan de largo sin entrar en los poros. Las moléculas pequeñas tardan más tiempo en pasar a través de la columna porque penetran dentro del gel, y por consiguiente deben atravesar más volumen antes de abandonar la columna.

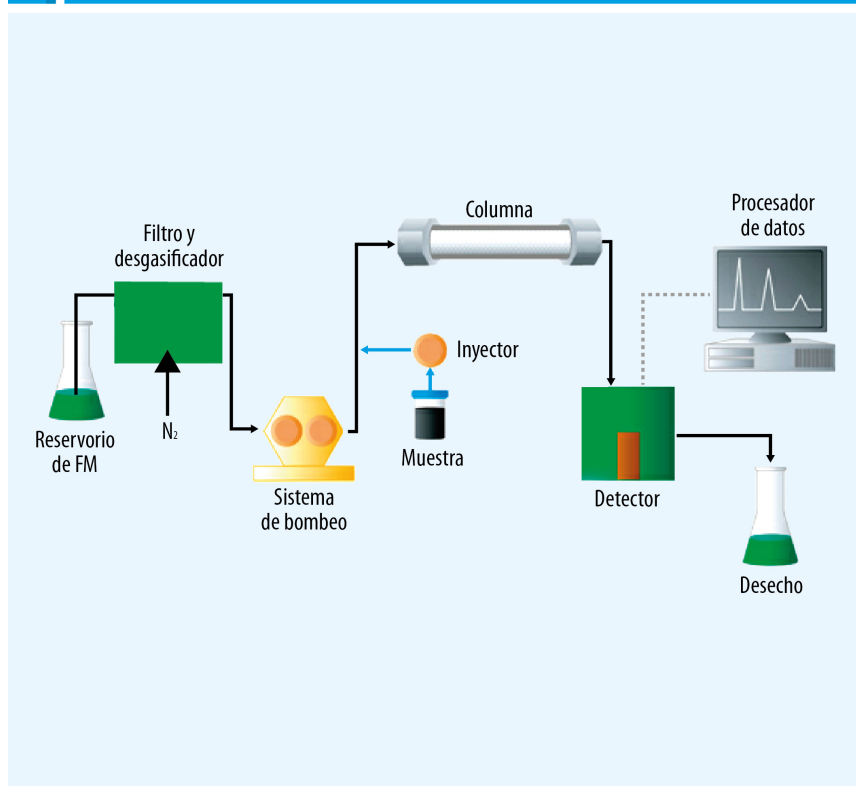
Cromatografía de afinidad: emplea interacciones específicas entre una clase de moléculas de soluto y una segunda molécula que está unida covalentemente (inmovilizada) en la fase estacionaria. (Harris, 2009)

FIGURA 34. Tipos de cromatografía



5.1.2 Equipamiento

FIGURA 35. Esquema de un equipo de HPLC



5.1.2.1 Bomba

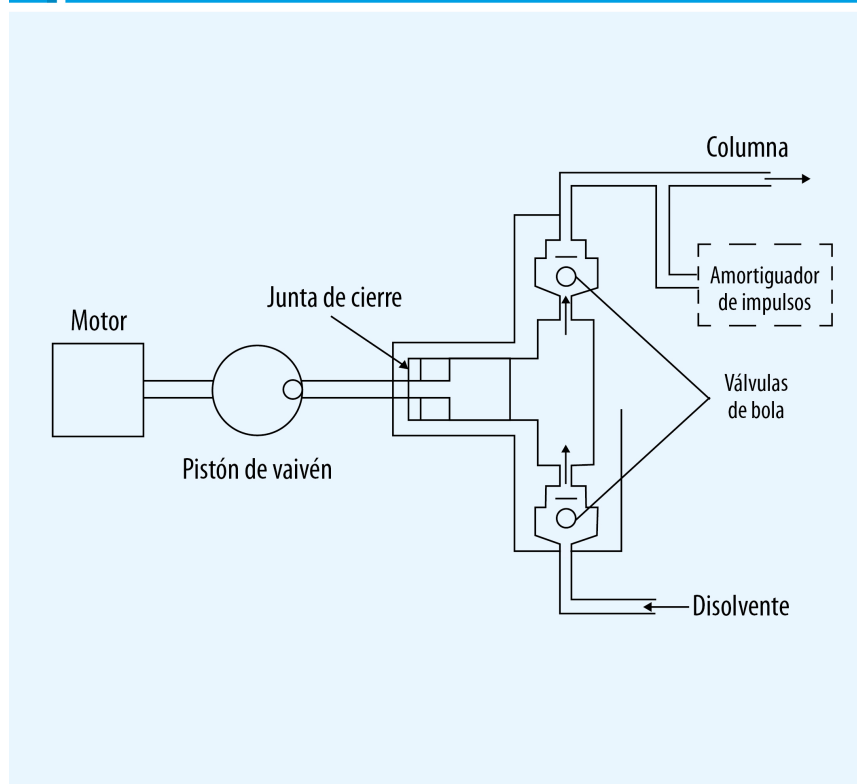
El sistema de bombeo impulsa la fase móvil por la columna. Los requisitos para un sistema de bombeo en HPLC son rigurosos e incluyen:

- generación de presiones por encima de 6000psi
- flujo libre de pulsaciones
- intervalo de caudales de 0,1 a 10 mL/min
- componentes resistentes a la corrosión

El 90% de los equipos de HPLC utilizan una bomba recíproca (Figura 36).

Consiste en una pequeña cámara en la que la fase móvil es empujada por el movimiento de vaivén de un pistón accionado por un motor de arrastre. Dos válvulas controlan el flujo de la fase móvil hacia adentro y hacia fuera de un cilindro. La fase móvil está en contacto directo con el pistón. Estas bombas tienen la desventaja de que producen un flujo pulsado, que se ha de amortiguar por medio de un damper, dado que su presencia se manifiesta como ruido en la línea de base del cromatograma. Entre las ventajas, se puede citar su pequeño volumen interno (35 a 400 μ L), sus altas presiones de salida (por encima de los 10000 psi), su fácil adaptación a la elución con gradiente, y sus caudales constantes prácticamente independientes de la contrapresión de la columna y de la viscosidad de la fase móvil. (Skoog y colaboradores, 2001)

FIGURA 36. Bomba recíproca de HPLC

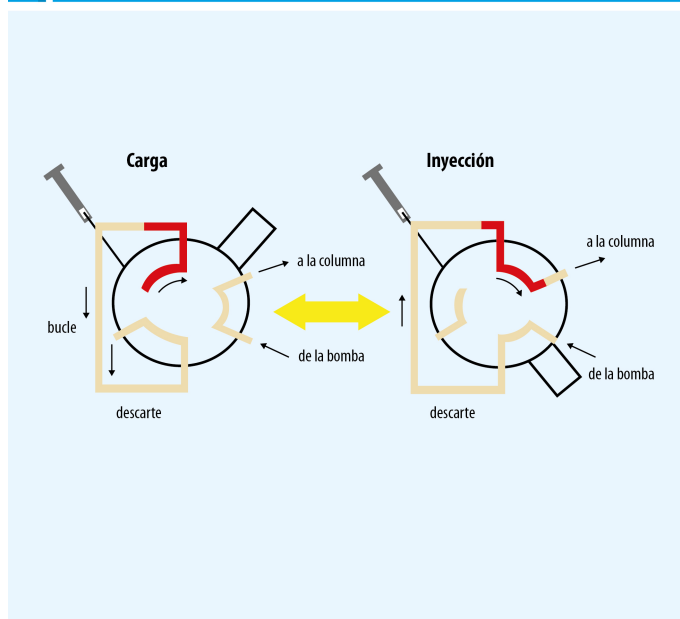


5.1.2.2 Sistema de inyección

Un factor limitante en la precisión de las medidas en HPLC es la reproducibilidad con que se puede introducir la muestra en la columna, lo cual debe hacerse sin que ésta se despresurice. El sistema de inyección más ampliamente utilizado para la introducción de la muestra utiliza válvulas de inyección que constan de bucles cargados con la solución a analizar (Figura 37). Este dispositivo es una parte integrada del equipo, pero se pueden intercambiar bucles de diferente capacidad a fin de permitir la elección de tamaños de muestra desde 5 a 500 μL . Con bucles de este tipo se puede introducir la muestra a presiones de hasta 7000 psi con una precisión relativa de unas décimas por ciento.

El dispositivo tiene dos posiciones: de carga y de inyección. En la posición de carga, se llena el bucle con muestra a la presión atmosférica, la fase móvil pasa de la bomba a la columna. Cuando la válvula se coloca en la posición de inyección, el bucle queda insertado entre la bomba y la columna, de tal modo que la fase móvil arrastra la muestra hacia la columna. (Harris, 2009)

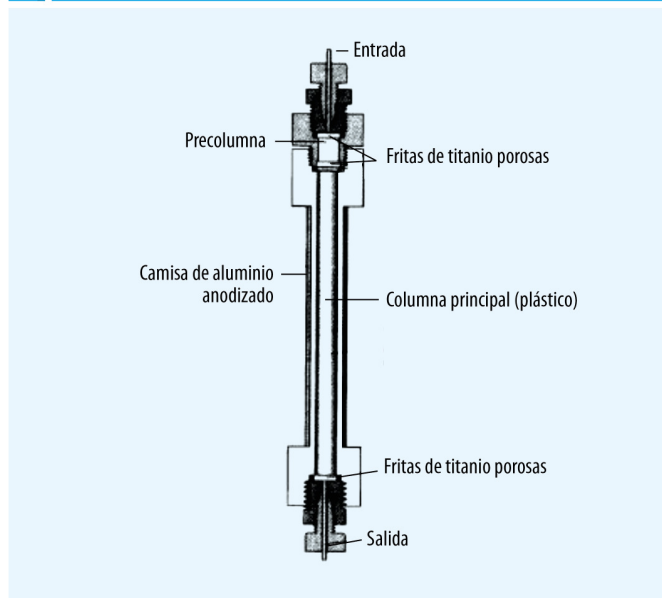
FIGURA 37. Sistema de inyección por bucles



5.1.2.3 Columnas

En HPLC se utilizan columnas empaquetadas, el tamaño de las partículas de fase estacionaria es de 3-10 μm . Las columnas son de acero o de plástico de una longitud de 5-30 cm y con un diámetro interior de 1-5 mm (Figura 38).

FIGURA 38. Columna de HPLC



Los soportes más comunes en HPLC son partículas microporosas esféricas de óxidos de silicio hidratados (sílice) y polímeros de óxido de aluminio hidratados (alúmina), permeables al disolvente, y con un gran área superficial. La fase estacionaria se enlaza covalentemente a la sílice o a la alúmina (Tabla 12).

Tabla 12: Fases estacionarias de uso frecuente en HPLC

Funcionalización	Porcentaje de uso	Tipo	Uso general
-Si-C ₁₈ H ₁₇	85%	Octadecilsilano (ODS)	Fase reversa
-Si-C ₈ H ₁₇	8%	Octalsilano	Menor retención que C ₁₈₊
-Si-(CH ₃) ₂	4%	Dimetilsilano	Menos retentiva, útil para compuestos muy polares
-Si - C ₆ H ₅	2%	Fenil	Selectivo para compuestos aromáticos, útil para péptidos
-Si-C ₃ H ₇ CN	1%	Ciano	Fase normal

Las fases estacionarias más usadas son: -C₈H₁₇, y -C₁₈H₃₇. De ellos, la cadena de 18 carbonos (grupo octadecilo) es la más común (ODS ó C18). Estos grupos orgánicos ligados producen un efecto similar al que tendría una capa extremadamente fina de disolvente orgánico sobre la superficie de las partículas de sílice del soporte. De esta manera la distribución de los solutos entre la película superficial y la fase móvil se parece más a una extracción líquido-líquido. Cuanto más larga es la cadena carbonada, la capa ligada se vuelve más orgánica e interacciona con más fuerza con los solutos que se disuelven en fases orgánicas. (Skoog y colaboradores, 2001)

5.1.2.4 Fase móvil

La cromatografía de adsorción sobre sílice pura, donde la fase estacionaria es polar y el eluyente es menos polar, es un ejemplo de cromatografía de fase normal. La cromatografía de fase reversa, que es la más utilizada, se caracteriza porque la fase estacionaria es no polar y el disolvente es polar. La cromatografía de fase reversa se caracteriza por picos más agudos y simétricos, y además es menos sensible a impurezas polares que pudieran existir en el eluyente.

En cromatografía de fase reversa, si se quieren obtener buenas separaciones en un tiempo razonable, se han de armonizar cuidadosamente las polaridades del soluto, de la fase móvil y de la fase estacionaria. (Rubinson y Rubinson, 2001)

Generalmente se emplea una mezcla de disolventes formada por agua y un disolvente orgánico polar (acetonitrilo, metanol, tetrahidrofurano, entre otros). El factor de retención puede ser fácilmente manipulado modificando la concentración de agua, consiguiendo así una mejor resolución. Casi todos los compuestos, excepto los más polares o más iónicos, experimentan una fuerza hidrofóbica fuerte que los conduce a la fase estacionaria y causa su retención.

Además de la calidad en la separación, la fase móvil debe:

- No alterar la columna ni sus características
- Ser compatible con el detector
- Disolver la muestra
- Tener una viscosidad baja
- Permitir la recuperación fácil de la muestra, si fuera necesario.
- Ser de pureza elevada y no tóxico
- Estar comercialmente disponible a un precio razonable

Los disolventes deben desgasificarse antes de su uso en HPLC, dado que la desgasificación reduce el riesgo de formación de burbujas en la columna o en el detector. Esto puede llevarse a cabo mediante: desplazamiento con un gas menos soluble (He); aplicación de vacío; aplicación de ondas de ultrasonido o calentamiento. (Harris, 2009)

La elución puede llevarse a cabo en dos modos: isocrático y en gradiente.

La elución isocrática se lleva a cabo con un único disolvente (o una mezcla de disolventes de composición fija). La elución en gradiente, se efectúa con dos disolventes (A y B), se produce un cambio continuo de la composición del eluyente en sentido de aumento de la fuerza eluyente; se van añadiendo cantidades crecientes de disolvente B al disolvente A, produciendo así un gradiente continuo. (Skoog y colaboradores, 2001)

5.1.2.5 Detectores

Las condiciones para un detector ideal en HPLC incluyen:

- Adecuada sensibilidad (10^{-15} a 10^{-8} g_{solute})
- Buena estabilidad y reproducibilidad
- Alta fiabilidad y manejo sencillo
- No ser destructivo de la muestra
- Respuesta lineal en varios ordenes de magnitud
- Tiempo de respuesta corto, e independiente del caudal
- Volumen interno mínimo a fin de reducir el ensanchamiento de banda (Skoog y colaboradores, 2001)

Entre los detectores usados en HPLC (Tabla 13) se pueden citar: detector UV, detector de índice de refracción, detector de dispersión de luz, detector de fluorescencia, detector electroquímico, detector de espectrometría de masas, detector de IR con transformada de Fourier, entre otros. (Harris, 2009)

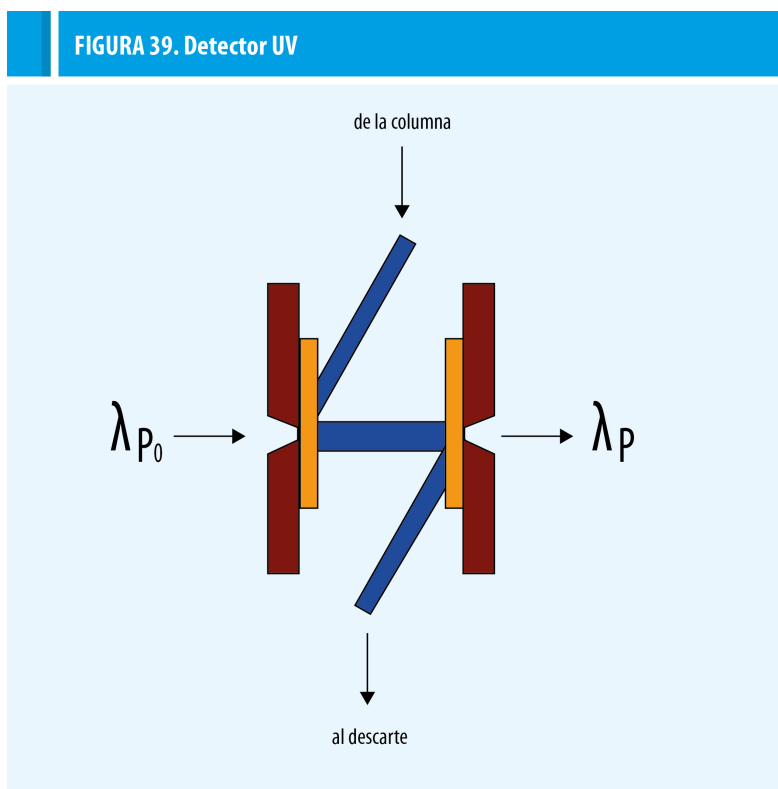
5.1.2.5.1 Detector UV

Es el más difundido. La celda del detector UV es en forma de Z a fin de minimizar el ensanchamiento de banda extra columna, el volumen de estas cubetas se limita de 1 a 10 μ L y las longitudes de la cubeta de 2 a 10 mm (Figura 39).

Tabla 13: Comparación de detectores usados en HPLC

Detector	Límite de detección (ng)	Permite gradiente
UV/VIS	0,1 – 1	Sí
Índice de refracción	100 – 1000	No
Dispersión de luz	0,1 – 1	Sí
Fluorescencia	0,001 – 0,01	Sí
Conductividad	0,5 – 1	No
Espectrometría de masas	0,1 – 1	Sí

(Extraído de Harris, 2009)

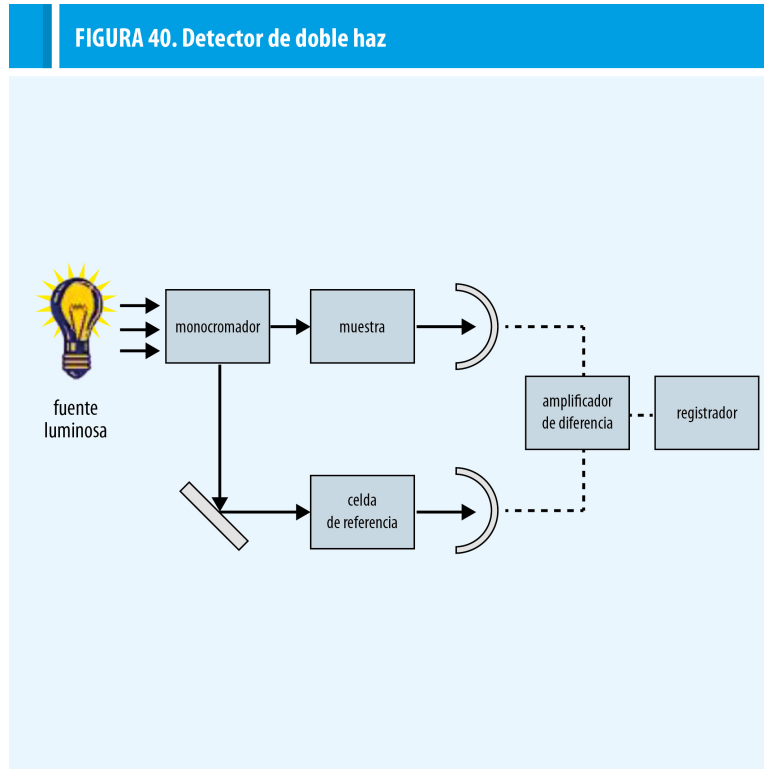


Muchos detectores de absorbancia son dispositivos de doble haz, en los que uno de los haces pasa por la cubeta de flujo y el otro a través de un filtro que reduce su intensidad. Para comparar las intensidades de los dos haces se utilizan detectores fotoeléctricos contrastados. Alternativamente, en combinación con un solo fototubo se utiliza un sistema de corte de haz (Figura 40).

El detector de doble haz tiene alta sensibilidad, es selectivo y no destructivo de la muestra. Mide la absorción de la luz UV o visible en el eluyente del HPLC.

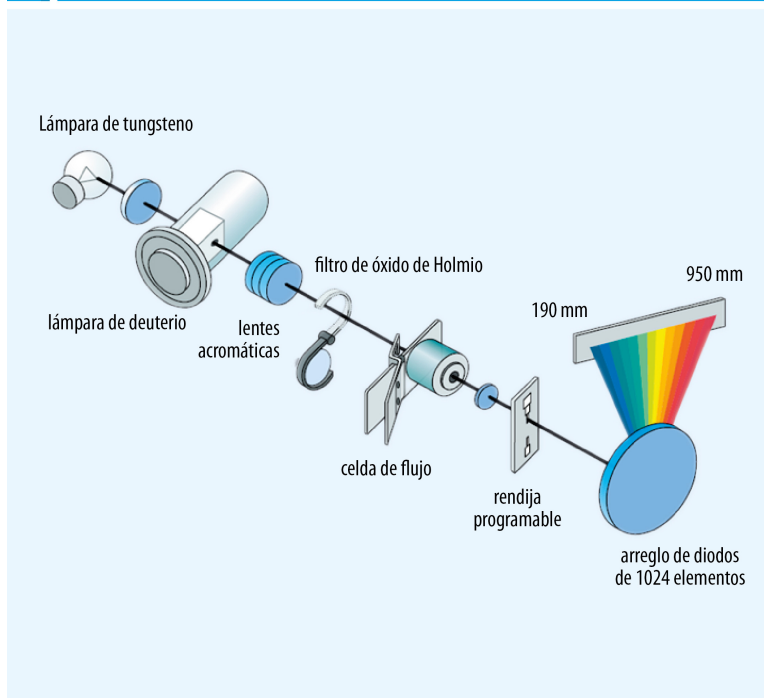
La mayoría de los fabricantes de instrumentos de HPLC ofrecen detectores con arreglos de diodos. Éstos utilizan una óptica invertida: toda la luz de la fuente atraviesa la muestra, y luego es dispersada en un monocromador que,

en lugar de una ranura de salida, tiene en el plano focal un dispositivo que integra en un pequeño circuito varios cientos de detectores tipo fotodiodo de silicio (Figura 41).



En los detectores de arreglo diodos el número de elementos varía actualmente entre 64 y 4096, siendo los más comunes de 512 y 1024 elementos. Cada elemento del arreglo recibe luz de un rango particular de longitudes de onda, y una computadora procesa los datos recibidos. Los datos de un espectro completo pueden ser recogidos en aproximadamente un segundo, lo cual permite almacenarlos a medida que van saliendo de la columna. Pueden obtenerse gráficos tridimensionales de los picos cromatográficos a diferentes intervalos de tiempo, esto resulta útil para la identificación de especies y para la elección de condiciones de determinación cuantitativa. (Skoog y colaboradores, 2001).

FIGURA 41. Detector de arreglo de diodos



5.2 ELECTROFORESIS CAPILAR

5.2.1 Fundamentos

Es una metodología analítica en la cual se produce la separación de los componentes de una mezcla mediante un campo eléctrico intenso, impuesto entre los dos extremos de un capilar estrecho lleno de la disolución de electrolito (Figura 42).

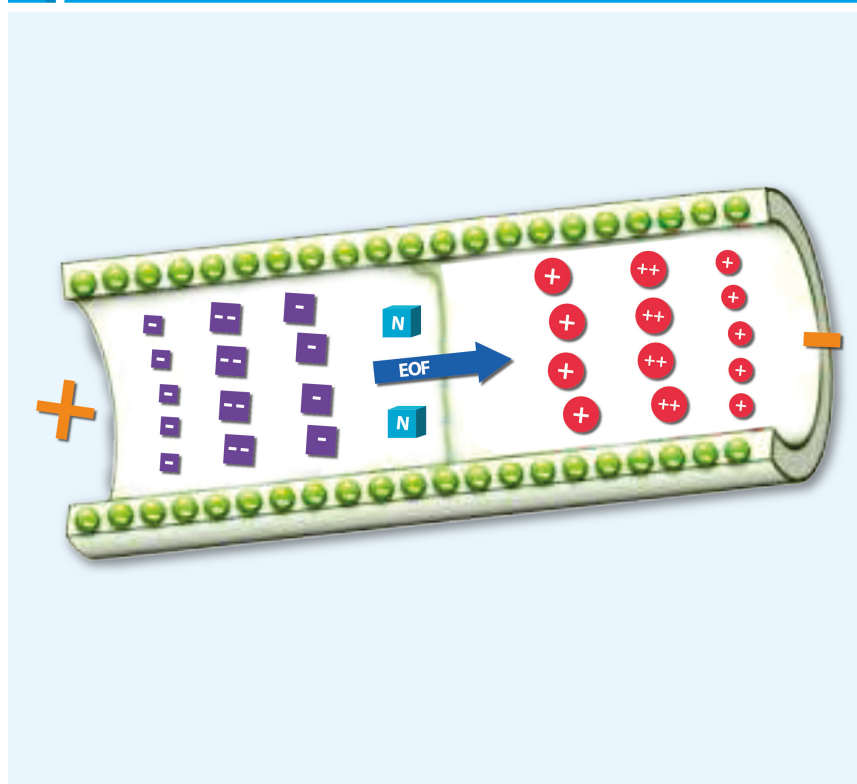
Los distintos solutos tienen diferentes movilidades electroforéticas, y por consiguiente migran a través del capilar con diferente velocidad.

Los capilares para electroforesis pueden ser tan pequeños que pueden ser insertados en una célula o hasta incluso en una vesícula celular para analizar su contenido.

La electroforesis capilar permite resoluciones sin precedentes. (Skoog y colaboradores, 2001)

Cuando se hace cromatografía en una columna empaquetada, los picos se ensanchan por tres mecanismos: caminos múltiples de corriente, difusión longitudinal y velocidad finita de transferencia de masa. Usando una columna tubular abierta se eliminan los caminos múltiples, con la consiguiente mejora en la resolución. La electroforesis capilar, a su vez, reduce mucho la altura de plato eliminando el tiempo finito de transferencia de masa. En la electroforesis capilar no existe fase estacionaria. Por consiguiente, la única fuente de ensanchamiento de pico en condiciones ideales, es la difusión longitudinal. La electroforesis capilar funciona con 50000 – 500000 platos teóricos, lo cual corresponde a un orden de magnitud mejor de resolución que en cromatografía. (Harris, 2009)

FIGURA 42. Principio separativo de Electroforesis Capilar



Otras ventajas importantes son tiempos muy cortos de análisis, requerimientos de pequeños volúmenes de muestra (del orden de los nL), y el uso de menores volúmenes de solventes orgánicos que en cromatografía, lo cual hace que esta técnica se considere “eco-friendly”. (Macia y colaboradores, 2007)

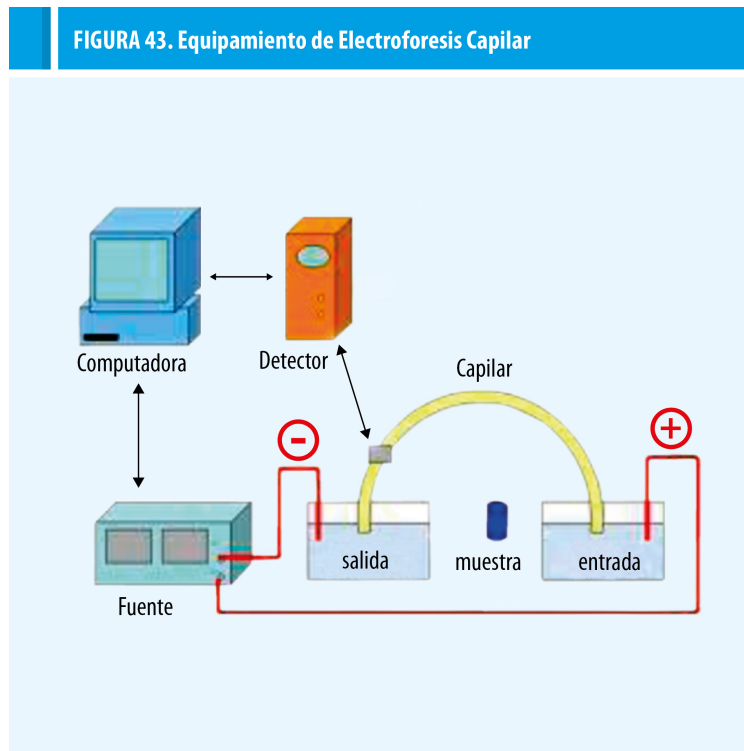
Entre sus desventajas se encuentra la falta de robustez, debido a la variabilidad de la inyección y al sistema de detección, y también al bajo volumen de muestra inyectado. Si bien hoy en día hay técnicas para subsanar estos inconvenientes, la sensibilidad de CE no es comparable a HPLC o GC.

5.2.2 Equipamiento

En la electroforesis capilar zonal (CZE) la separación se basa en diferencias de movilidad electroforética.

El equipo (Figura 43) consta de un tubo capilar con un cierto diámetro (20-100 μm) y longitud (20-100 cm), que conecta a dos viales (inlet y outlet) que contienen la solución reguladora de corrida (BGE, del inglés: *background electrolyte*) con la que se llena el capilar. A su vez, esos recipientes se conectan por dos electrodos, unidos a una fuente de alto voltaje, para generar la diferencia de potencial dentro del capilar. Luego de acondicionar correctamente el capilar, se introduce la muestra, reemplazando uno de los reservorios por el que contiene la muestra. (Skoog y colaboradores, 2001)

Existen dos modalidades de inyección: la inyección electrocinética, y la inyección hidrodinámica.



En el método de inyección electrocinética, se retiran del vial (inlet) uno de los extremos del capilar y el correspondiente electrodo, y se colocan en un pequeño recipiente donde está situada la muestra. Se aplica entonces un potencial durante un tiempo determinado, lo que hace que la muestra penetre en el capilar debido a la actuación conjunta de los fenómenos de migración iónica y flujo electroosmótico. El extremo del capilar y el electrodo vuelven a introducirse en la disolución del buffer de corrida, donde se mantienen durante el resto del proceso de separación. Esta técnica de inyección es discriminatoria al introducir mayor cantidad de los iones más móviles respecto a los más lentos.

En el método de inyección hidrodinámica, el extremo del capilar se coloca momentáneamente en un pequeño recipiente que contiene la muestra, y se utiliza una diferencia de presión para conducir la muestra al interior del capilar. Esta diferencia de presión proviene de aplicar vacío en el extremo del detector o de la aplicación de presión en el recipiente que contiene la muestra, o bien se consigue por elevación del extremo que contiene la muestra. La inyección por presión no diferencia los iones según su movilidad; sin embargo, no puede utilizarse en capilares rellenos de gel.

Una vez introducida la muestra al capilar el movimiento de los componentes de la muestra se inicia al aplicar una diferencia de potencial (10-30 kV). Se puede invertir la polaridad: cuando el detector se encuentra en el cátodo se

opera con polaridad normal, mientras que cuando el detector está en el ánodo se trata del modo polaridad inversa.

En general la detección se realiza sobre el mismo capilar, actuando éste como celda de detección. Entre los detectores utilizados en CE se pueden citar: detector UV-visible; fluorescencia; fluorescencia inducida por láser; amperometría; conductividad; espectrometría de masa; siendo el detector UV-visible el más ampliamente difundido por su universalidad y bajo costo.

El detector registra la señal de los analitos en función del tiempo en una gráfica de señal vs. tiempo, llamada electroferograma. Esa señal depende de las características de los analitos y del detector que posea el equipo, la posición de los picos se determina por las movilidades electroforéticas de los constituyentes y no por las diferencias en su interacción con la fase estacionaria, como es el caso de la cromatografía. (Harris, 2009)

5.2.3 Modos electroforéticos

Además de la CZE se puede trabajar con otras modalidades, como ser: electroforesis capilar en gel (CGE), isoelectroenfoque capilar (CIEF), isotacoforesis capilar (CITP), cromatografía micelar electrocinética (MEKC), electrocromatografía capilar (CEC) y electrocromatografía capilar quiral (QCE), siendo estos tres últimos modos cromatográficos. (Rubinson y Rubinson, 2001)

En la presente tesis, se ha recurrido a HPLC en **EXPERIMENTAL 3: MÉTODO CINÉTICO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA CUANTIFICACIÓN DE DICLOFENAC**, en el cual se comparó el método desarrollado con la metodología de referencia (HPLC). Expuesto en el Capítulo 3.

Así mismo, la Electroforesis Capilar se aborda en **EXPERIMENTAL 7: SEGUIMIENTO DEL PERFIL DE DISOLUCIÓN DE COMPRIMIDOS DE DICLOFENAC POR ELECTROFORESIS CAPILAR**, donde a su vez, se compara estadísticamente la Electroforesis Capilar con HPLC (véase Capítulo 6).

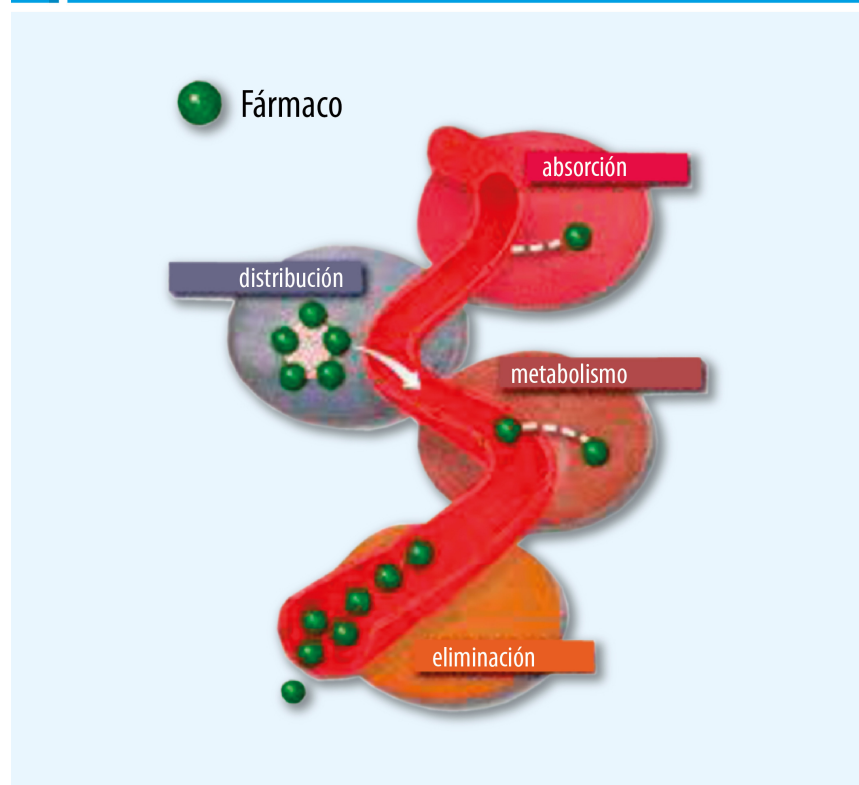
6. FARMACOCINÉTICA

6.1 INTRODUCCIÓN TEÓRICA

La farmacocinética es la rama de la farmacología que estudia las relaciones entre el fármaco y los procesos que sufre en el cuerpo. (Moynihan y Crean, 2009)

Cuando un medicamento se administra a un organismo, el fármaco sufre una serie de procesos, que incluyen: liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción, llamados comúnmente procesos LADME (Figura 44).

FIGURA 44. Procesos LADME



La cuantificación de estos procesos se basa en modelos matemáticos, en los cuales se supone al organismo dividido en compartimientos, en los cuales el fármaco entra (se absorbe o se distribuye) y sale (se distribuye o se elimina) a una determinada velocidad, regida por parámetros farmacocinéticos concretos. La cuantificación de estos parámetros es de suma utilidad en:

- La elaboración de medicamentos, dado que los principios activos tienen un comportamiento farmacocinético determinado, que no sólo depende del propio principio activo, sino también de los excipientes, así como del proceso de elaboración.
- La comparación *in vitro* del perfil farmacocinético del mismo principio activo en dos formas farmacéuticas distintas, en aras de la intercambiabilidad de medicamentos con igual composición.
- En el monitoreo de determinados medicamentos, cuya posología (dosis/Kg de peso) resulta difícil de establecer *a priori*.

De esta forma, al estudiar la farmacocinética a través de modelos matemáticos, se puede añadir todo el rigor y exactitud de las matemáticas a algo tan variable como la respuesta farmacológica en los organismos vivos (Aguilar Ros y colaboradores, 2008).

El proceso de liberación de un fármaco en el organismo está íntimamente ligado a su velocidad de disolución. Este parámetro es considerado hoy en día, una de las pruebas de control de calidad más importantes realizadas en los preparados farmacéuticos.

En el año 1985 Amidon y colaboradores propusieron el sistema de clasificación biofarmacéutica de los medicamentos (Tabla 14), que se aplica a formulaciones sólidas oral de liberación inmediata. Éstas constituyen la forma más utilizada de administración de fármacos, debido a la practicidad para el paciente, su fácil manipulación y la exactitud en la dosificación. El sistema de clasificación biofarmacéutica permite establecer los requerimientos que deben satisfacer dichas formulaciones para garantizar eficacia y seguridad, sobre la base de las propiedades fisicoquímicas de los fármacos y de la fisiología del tracto gastrointestinal (Connors, 1982).

Tabla 14: Sistema de clasificación biofarmacéutica

Clase	Solubilidad (relativa a la dosis)	Permeabilidad intestinal
I	Alta	Alta
II	Baja	Alta
III	Alta	Baja
IV	Baja	Baja

La OMS considera disolución rápida a aquella en la cual se disuelve al menos el 85% de la cantidad rotulada del principio activo en 30 min. Se aplica a productos con principios activos de clase I y II, que son ácidos débiles y cumplen el requerimiento de alta solubilidad a pH intestinal. Las expectativas de correlación *in vitro* – *in vivo* se satisfacen fundamentalmente para medicamentos de estas dos clases.

Paracetamol es un principio activo clase I: altamente soluble y de gran permeabilidad intestinal. Tanto diclofenac como ibuprofeno pertenecen a la clase II: baja solubilidad y alta permeabilidad.

6.1.1 Caracterización del proceso de disolución

El proceso de disolución de un fármaco se puede caracterizar mediante parámetros modelo dependientes y modelo independientes.

Nos referiremos en los puntos siguientes a la disolución de las Formulaciones Solidas Orales de Liberación Inmediata (FSOLI) que se corresponde con las presentaciones de los AINE analizados en el presente estudio.

6.1.1.1 Parámetros Modelo Dependientes

La disolución es el proceso mediante el cual una sustancia sólida se dispersa en un determinado solvente, ocurriendo una transferencia de masa desde la superficie sólida a la fase líquida. Dicho proceso se rige por la ecuación de Noyes y Whitney (1897):

$$\frac{dC}{dt} = -KS(C_s - C) \quad \text{Ecuación 44}$$

donde dC/dt es la velocidad del proceso de disolución, K es la constante de velocidad que depende de las condiciones experimentales, S es la superficie del sólido expuesta al medio de disolución, C_s es la concentración de saturación del fármaco en el medio de disolución (solubilidad) y C es la concentración de fármaco en el medio de disolución a tiempo t .

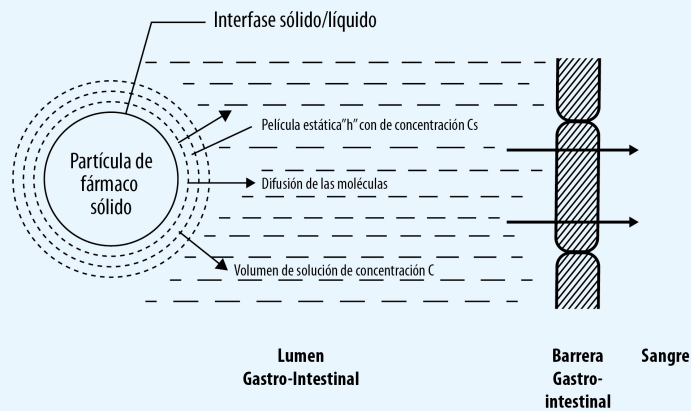
La teoría del modelo de partícula (Nernst y Brunner, 1904) explica el proceso de disolución, y establece que una partícula sólida sumergida en un líquido es sometida a dos pasos consecutivos:

1. Disolución del sólido en la interfase, con formación de una película estática alrededor de la partícula.
2. Difusión desde esa capa en el límite hacia el seno del líquido (Figura 45).

El primer paso es prácticamente instantáneo, en tanto que el paso difusional, mucho más lento, es el que rige la velocidad. Estos autores modifican la ecuación de Noyes-Whitney y aplican la ley de difusión de Fick, estableciendo la relación entre la constante de velocidad de disolución y el coeficiente de difusión.

Debido a la complejidad de los fenómenos físicos y químicos puestos en juego, no existe un mecanismo de liberación universal válido para cualquier droga. Es por ello que se han propuesto diferentes modelos matemáticos para explicar el comportamiento de los perfiles de disolución.

FIGURA 45. Modelo de la capa de difusión



6.1.1.1.1 Cinética de orden cero

El término condición *sink* (del inglés: sumidero) deriva del hecho de que la concentración de una droga a ambos lados de la capa epitelial de la pared intestinal se aproxima al equilibrio en un breve lapso donde el tracto gastrointestinal actúa como un sumidero natural; es decir, la droga es absorbida en forma instantánea en el momento en que se disuelve. Por lo tanto, *in vivo* no se produce el efecto retardador del gradiente de concentración sobre la disolución.

Las condiciones *sink* se presentan *in vitro* cuando el volumen del medio de disolución es 5 a 10 veces mayor que el volumen requerido para preparar una solución saturada, sin la influencia del gradiente de concentración (Gennaro, 2003). Al trabajar en condiciones *sink*, la ecuación de Noyes y Whitney se simplifica:

$$\frac{dC}{dt} = -K_1 S \quad \text{Ecuación 45}$$

Si la superficie del sólido expuesta al medio de disolución es constante, la disolución sigue una cinética de orden cero y la ecuación 45 se reduce a:

$$\frac{dQ}{dt} = -K_0 \quad \text{Ecuación 46}$$

Siendo Q la cantidad de fármaco disuelto y K_0 la constante de velocidad de disolución de orden cero. La integral de la ecuación diferencial entre tiempo cero y t es:

$$Q = K_0(t - t_0) \quad \text{Ecuación 47}$$

Si se considera la cantidad de fármaco remanente en la forma farmacéutica que lo contiene:

$$(Q_\infty - Q) = -K_0(t - t_0) + Q_\infty \quad \text{Ecuación 48}$$

Siendo Q_∞ la cantidad de fármaco disuelta a tiempo infinito, que coincide con la dosis si la disolución es total; Q la cantidad de fármaco disuelta a cada tiempo, $(Q_\infty - Q)$ la cantidad de fármaco remanente o no disuelto; K_0 la constante de disolución de orden cero, y t_0 el período de latencia o tiempo que tarda en iniciarse el proceso de disolución.

6.1.1.1.2 Cinética de primer orden

La cinética de primer orden implica que la superficie de fármaco expuesta al medio de disolución varía a lo largo del proceso de disolución en función de la cantidad de fármaco remanente, sin disolver.

$$S = K(Q_\infty - Q) \quad \text{Ecuación 49}$$

La ecuación de Noyes-Whitney queda expresada de la siguiente forma:

$$\frac{dQ}{dt} = -K_d(Q_\infty - Q) \quad \text{Ecuación 50}$$

La integral de la expresión diferencial es:

$$(Q_\infty - Q) = Q_\infty e^{-K_d(t-t_0)} \quad \text{Ecuación 51}$$

Esta ecuación se puede expresar en su transformada logarítmica:

$$\ln(Q_\infty - Q) = \ln Q_\infty - K_d(t - t_0) \quad \text{Ecuación 52}$$

6.1.1.1.3 Cinética de raíz cúbica o modelo de Hixson-Crowell

La cinética de raíz cúbica contempla que la superficie de fármaco expuesta al medio de disolución varía a lo largo del proceso de disolución en función de la raíz cúbica del cuadrado del volumen del sólido:

$$S = k\sqrt[3]{V^2} \quad \text{Ecuación 53}$$

La agitación afecta toda la superficie de la partícula, la cual se considera de forma esférica a lo largo de todo el proceso de disolución.

La ecuación de Noyes-Whitney queda expresada de la siguiente forma:

$$\frac{dQ}{dt} = K_d \sqrt[3]{(Q_\infty - Q)^2} \quad \text{Ecuación 54}$$

La integral de la expresión diferencial es:

$$Q = Q_\infty - (Q_\infty^{1/3} - K_d t)^3 \quad \text{Ecuación 55}$$

6.1.1.1.4 Cinética de raíz cuadrada o modelo de Higuchi

Esta cinética se ajusta a procesos de disolución de fármacos formulados como sistemas de liberación modificada o como formas de dosificación semisólidas.

$$Q = \sqrt{(2C_0 - C_s)C_s D(t - t_0)} \quad \text{Ecuación 56}$$

Siendo D el coeficiente de difusión del fármaco. C_0 , C_s y D son constantes para la misma forma cristalina de fármaco y el mismo tipo de matriz o sistema de liberación modificada, por lo cual se puede simplificar la ecuación anterior a la siguiente expresión:

$$Q = K_d \sqrt{t - t_0} \quad \text{Ecuación 57}$$

Esta expresión también puede ser aplicada a sistemas semisólidos que contienen el fármaco en suspensión.

6.1.1.1.5 Función de Weibull

Es un modelo matemático sin base fisicoquímica que se puede aplicar a los procesos de disolución de fármacos. Se expresa:

$$Q = Q_\infty \left[1 - e^{-\left(\frac{t-t_0}{t_d}\right)^\beta} \right] \quad \text{Ecuación 58}$$

Siendo su transformada lineal:

$$\ln \left(\ln \frac{Q_\infty}{Q_\infty - Q} \right) = \beta \ln(t - t_0) - \beta \ln t_d \quad \text{Ecuación 59}$$

Donde t_d es el tiempo que tarda en disolverse el 63,2% de la dosis y β es un parámetro de forma, adimensional.

Para analizar qué tipo de cinética o modelo matemático sigue el proceso de disolución de un determinado fármaco (orden cero, primer orden, Hixson-Crowell, Higuchi o función de Weibull), se realizan regresiones lineales por mínimos cuadrados transformando los datos en función de la ecuación representativa de cada modelo cinético (Tabla 15)

Tabla 15: Expresiones de las variables regresionales para cada modelo cinético

Variable indep	Variable Dependiente			V indep	Vdep	V indep	V dep
	Orden cero	Primer orden	Raíz cúbica Hixson-Crowell	Raíz cuadrada Higuchi		Función de Weibull	
t(min)	Q(mg)	$\ln(Q_{\infty}-Q)$	$Q_{\infty}^{1/3} - (Q_{\infty} - Q)^{1/3}$	$t^{1/2}(\text{min}^{1/2})$	Q(mg)	Int	$\ln \left[\ln \left(\frac{Q_{\infty}}{Q_{\infty} - Q} \right) \right]$

El mejor ajuste de los datos a una línea recta nos indicará la cinética del proceso.

Un parámetro más discriminatorio de modelos es el criterio de información de Akaike (AIC), que tiene en cuenta la suma de cuadrados residuales, que debe ser mínima, y el número de parámetros de la función de ajuste. El valor de AIC más pequeño indicará cuál es el modelo que estadísticamente explica mejor el proceso de disolución. AIC se calcula según:

$$AIC = n \ln SSQ + 2p \quad \text{Ecuación 60}$$

siendo n el número de pares de datos experimentales empleados en el ajuste; SSQ es la suma de los cuadrados de los residuales y p es el número de parámetros de la función de ajuste. (Aguilar Ros y colaboradores, 2008)

6.1.1.2 Parámetros Modelo Independientes

El proceso de disolución puede caracterizarse, además, mediante parámetros modelos independientes. Éstas son magnitudes que se calculan o se deducen de los datos experimentales:

1. $t_{10\%}$, $t_{50\%}$, $t_{80\%}$: corresponden al tiempo que tarda en disolverse un determinado porcentaje de la dosis.

2. **Eficiencia de disolución** (DE% del inglés *dissolution efficiency*): se calcula a partir de las curvas acumulativas de fármaco disuelto, siendo necesario que se haya disuelto, como mínimo, el 90% de la dosis:

$$DE(\%) = \frac{ABC_0^T}{Q_{100} \cdot T} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 61}$$

siendo ABC_0^T el área bajo la curva del perfil de disolución desde tiempo cero hasta el último valor experimental T, y Q_{100} la cantidad máxima disuelta.

La eficiencia de la disolución permite, por un lado, una fácil comparación entre varias formulaciones, y por otro puede ser relacionada con los datos *in vivo*. Si se supone que el grado de absorción de un fármaco *in vivo* es proporcional a la concentración del fármaco en la solución y al tiempo que esta solución está en contacto con la región del tracto gastrointestinal donde se

produce la absorción, se puede ver que la eficiencia de la disolución se describe como una función de estas dos variables.

3. Tiempo medio de disolución (MDT, del inglés *mean dissolution time*): se calcula a partir de las curvas acumulativas de las cantidades disueltas de fármaco en función del tiempo:

$$MDT = \frac{\sum (t_i \cdot \Delta Q_i)}{Q_\infty} \quad \text{Ecuación 62}$$

Siendo t_i los tiempos intermedios de la disolución, ΔQ_i el incremento de las cantidades de fármaco disuelto a cada intervalo considerado, y Q_∞ la cantidad de fármaco disuelto a tiempo infinito. (Aguilar Ros y colaboradores, 2008)

6.1.1.3 Comparación de perfiles de disolución

La comparación entre perfiles de disolución de comprimidos de distinto origen puede hacerse mediante los factores de diferencia y de similitud. Los tiempos de toma de muestra deben ser los mismos para los perfiles que se comparan, así como las condiciones de ensayo.

Factor de diferencia (f_1)

$$f_1 = \frac{\sum_{t=1}^n (R_t - T_t)}{\sum_{t=1}^n R_t} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 63}$$

Para calcular f_1 se utilizan las cantidades acumuladas de fármaco disuelto al tiempo t : R_t para la formulación de referencia y T_t para la formulación problema. Cuando f_1 toma valores entre 0 y 15 se considera que no hay diferencias significativas entre los perfiles de disolución.

Factor de similitud (f_2)

$$f_2 = 50 \cdot \log \left(\frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2}{n}}} \cdot 100 \right) \quad \text{Ecuación 64}$$

El cálculo de f_2 se realiza con el porcentaje de fármaco disuelto a cada tiempo, R_t para la formulación de referencia y T_t para la formulación problema. Una vez alcanzado el 85% de la dosis disuelta, sólo debe tomarse una muestra. Cuando f_2 toma valores entre 50 y 100 se considera que los perfiles son similares. (Moore y Flanner, 1996)

6.1.2 Modalidades de ensayo de disolución

La USP y la FA establecen que las pruebas fisicoquímicas de disolución de tabletas deben llevarse a cabo en un disolutor (Figura 46). Dicho equipo permite realizar el ensayo de varios comprimidos simultáneamente.

El disolutor, identificado como “aparato 2” por la USP y la FA consta de: vaso (con o sin tapa), motor, eje propulsor metálico, y una paleta compuesta por un aspa y un eje. El vaso está parcialmente sumergido en un baño de agua adecuado y recibe calor de una camisa de calentamiento. Durante el transcurso de la prueba, el baño de agua mantiene la temperatura en el interior del vaso en $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y garantiza que el fluido del baño se mantenga en movimiento suave y constante. El vaso es cilíndrico y de fondo semiesférico, con capacidad para 1 L. La paleta (Figura 47) sigue las especificaciones de la FA y debe guardar una distancia máxima de 2 mm con respecto a cualquier punto del eje vertical del vaso, además debe rotar suavemente sin fluctuaciones significativas que pudieran afectar los resultados.

Se coloca el volumen indicado de medio de disolución en el vaso del aparato. Se introduce 1 unidad de dosificación en el vaso, verificando que no queden burbujas de aire en su superficie y se pone el aparato en funcionamiento inmediatamente a la velocidad indicada en la monografía individual. A cada tiempo especificado, se toma una muestra y se analiza según se indica para cada sustancia en particular.

Para los ensayos de disolución de diclofenac, paracetamol e ibuprofeno, la USP y la FA establecen:

Diclofenac tabletas

Medio de disolución: fluido intestinal artificial (sin enzima), 900 mL

Disolutor con sistema de agitación por paletas, velocidad: 50 rpm

Tiempo: 60 min

Determinar el porcentaje de diclofenac disuelto mediante absorción en el UV a 276 nm. Filtrar previamente la solución por medio de filtros de $0,45\ \mu\text{m}$.

Tolerancia: no menos del 80% (Q) del valor del rótulo disuelto.

Paracetamol tabletas

Medio de disolución: buffer fosfato pH 5,8; 900 mL

Disolutor con sistema de agitación por paletas, velocidad: 50 rpm

Tiempo: 30 min

Determinar el porcentaje de paracetamol disuelto mediante absorción en el UV a 243 nm. Filtrar previamente la solución por medio de filtros de $0,45\ \mu\text{m}$.

Tolerancia: no menos del 80% (Q) del valor del rótulo disuelto.

Ibuprofeno tabletas

Medio de disolución: buffer fosfato pH 7,2; 900 mL

Disolutor con sistema de agitación por paletas, velocidad: 50 rpm

Tiempo: 60 min

Determinar el porcentaje de ibuprofeno disuelto mediante absorción en el UV a 221 nm. Filtrar previamente la solución por medio de filtros de $0,45\ \mu\text{m}$.

Tolerancia: no menos del 80% (Q) del valor del rótulo disuelto.

FIGURA 46. Disolutor Vankel 7000

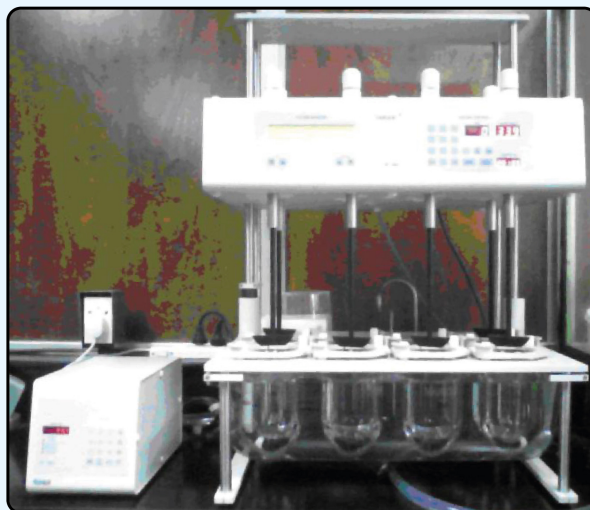
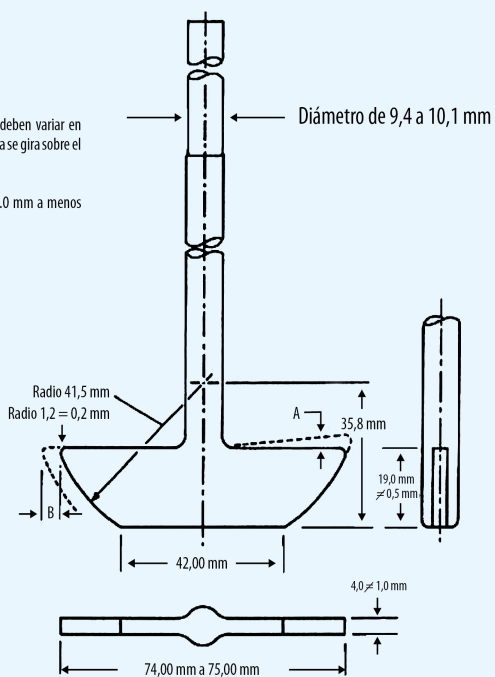


FIGURA 47. Paleta del disolutor

Notas

(1) Las dimensiones A y B no deben variar en más de 0,5 mm cuando esta pieza se gira sobre el eje ζ .

(2) Las tolerancias son de $\pm 1,0$ mm a menos que se indique lo contrario.



Es necesario establecer las diferencias entre “ensayo de disolución” y “perfil de disolución”. El ensayo de disolución hace referencia a un único punto tomado a un tiempo en el cual se considera que un alto porcentaje (80%) de droga se ha disuelto. En cambio, el perfil de disolución corresponde al seguimiento de la disolución a intervalos de tiempo acotados, y se confecciona a partir de varios puntos experimentales. Un perfil de disolución permite:

- el análisis cinético de la disolución de un fármaco determinado
- la determinación del tiempo de latencia
- la determinación de los cambios en el proceso de disolución
- la comparación de dos perfiles de la misma droga pero de distinto origen

A su vez, el perfil de disolución es el método *in vitro* aceptado para la determinación de la intercambiabilidad entre un medicamento de patente y un genérico.

6.2 EXPERIMENTAL 7

SEGUIMIENTO DEL PERFIL DE DISOLUCIÓN DE COMPRIMIDOS DE DICLOFENAC POR ELECTROFORESIS CAPILAR

**Publicado en Current Pharmaceutical Analysis
10(1), 2014, 38-43.**

Los ensayos del siguiente trabajo fueron desarrollados en el marco de una Pasantía de Investigación, en el Laboratorio de Desarrollo Analítico y Quimiometría (LADAQ), de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional del Litoral (UNL), bajo la dirección de la Dra. Luciana Vera-Candioti.

En este trabajo se efectuó el monitoreo de la disolución de comprimidos de diclofenac 50 mg de PLAMECOR por electroforesis capilar, y posteriormente el análisis cinético de sus perfiles de disolución.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras y reactivos

Se utilizó diclofenac principio activo lote N°1004-30-5, origen China (99,99% pureza) y diclofenac comprimidos 50 mg lote N°112/12, provistos por PLAMECOR.

Como estándar interno, se utilizó paracetamol principio activo lote N°4120374, origen China (99,99% pureza), provisto por PLAMECOR.

El placebo utilizado en las determinaciones de especificidad y exactitud, también fue provisto por PLAMECOR, y su composición es la misma presente en los comprimidos de diclofenac: estearato de magnesio 1%, talco 2%, almidón glicolato de sodio 3,5%, polivinilpirrolidona (PVP) 1,2%, precompactado verde 73,2%.

Hidróxido de sodio, grado analítico, Merk (Alemania)

Borato de sodio, grado analítico, Merk (Alemania)

Fosfato de sodio, grado analítico, Merk (Alemania)

Ácido clorhídrico, grado analítico, Merk (Alemania)

Metanol, grado analítico, Merk (Alemania)

En todos los experimentos se trabajó con agua ultrapura Millipore (Bedford, Estados Unidos).

Soluciones diclofenac y paracetamol principios activos 100 mg/L: se prepararon pesando y disolviendo las masas correspondientes de cada droga en agua.

Solución 100 mg/L diclofenac comprimidos: a partir de una mezcla homogénea de 10 comprimidos de diclofenac, finamente pulverizados, se pesó y disolvió la masa correspondiente en agua. Patrón interno: a todas las soluciones (tanto principio activo como comprimidos de diclofenac) se agregó el mismo volumen de una solución de paracetamol 70 mg/L, de manera tal que en ambas soluciones hubiera idéntica concentración de patrón interno.

Buffer de corrida: solución de borato de sodio 15 mM pH 9,2.

Todas las soluciones fueron desgasificadas en un baño ultrasónico Cole Palmer 8891 (Cole Palmer, Estados Unidos) y posteriormente filtradas a través de un filtro de membrana de nylon de 0,45 μ m (Sartorius, Alemania).

Equipamiento

Sistema electroforético Agilent, con detector de diodos.

HPLC Agilent 1120 series compact LC, con detector UV.

Disolutor AVIC D-II, de tipo paleta.

Electroforesis capilar

La separación se llevó a cabo en un capilar de sílice desnudo de 35,5 cm de longitud total, con un diámetro interno de 75 μ m (MicroSolv Technology Corporation, Estados Unidos). Se trabajó en modo normal a un voltaje de 20 kV. El cartucho se mantuvo a 25°C. Se registraron los electroferogramas a 200 nm. Las inyecciones fueron hidrodinámicas, desde el electrodo positivo, aplicando 50 mbar durante 10 s.

Acondicionamiento del capilar: lavado con hidróxido de sodio (10 min), seguido de agua (10 min) y finalmente con buffer de corrida (3 min). Entre corridas, el capilar fue lavado con hidróxido de sodio 0,1 M, agua y buffer de corrida (3 min cada uno).

Validación del método

Para el estudio de linealidad se construyó una curva de calibración con diclofenac principio activo en un rango entre 50 y 90 mg/L.

Se evaluó la especificidad mediante corridas electroforéticas de placebo, preparado con excipientes en idéntica proporción a la de los comprimidos de diclofenac 50 mg.

La precisión fue analizada como repetibilidad. Se procesaron por triplicado 6 muestras, el mismo día, por el mismo operador y utilizando el mismo equipamiento. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA.

Para el estudio de exactitud se prepararon muestras con diferentes niveles de concentración de diclofenac (80, 100 y 120% del valor declarado en el rótulo), y se determinó el porcentaje de recuperación de cantidades conocidas de analito sobreagregadas a placebo. Estos análisis se realizaron por triplicado.

Cromatografía

Para la cuantificación de diclofenac se usó una fase móvil metanol – buffer fosfato pH 2,5 (70:30); columna RP-18C, 125x4,5 mm. Flujo: 1 mL/min. La longitud de onda de detección se estableció en 276 nm. Volumen de inyección 20 μ L. Se utilizaron soluciones 70 mg/L diclofenac principio activo y 81 mg/L

diclofenac comprimidos. Se confirmó la identidad de picos con el tiempo de retención de diclofenac (8,2 min). Se determinaron las áreas de pico que luego fueron convertidas a concentración mediante la Ecuación 65.

$$C_{muestra} = C_{dicloppioactivo} \cdot A_{dicloppioactivo} / A_{muestra} \quad \text{Ecuación 65}$$

Disolución

El perfil de disolución se obtuvo mediante el método USP. Se trabajó en condiciones fisiológicas, simulando el fluido intestinal con 900 mL de buffer fosfato pH 7,4, a $37,0 \pm 0,5$ °C. La velocidad de agitación se mantuvo en 50 rpm a lo largo del todo el ensayo.

Los tiempos seleccionados para la elaboración del perfil fueron los siguientes: 0; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 45 y 60 min.

En los intervalos mencionados, se extrajo del disolutor una alícuota de 500 µL a la cual se adicionaron 17,5 µL de paracetamol (solución de patrón interno) y se llevó a volumen final de 2 mL con agua MilliQ. Posteriormente las muestras fueron filtradas a través de un filtro de membrana de nylon de 0,45 µm.

Las muestras fueron analizadas por medio de electroforesis capilar. En el análisis de datos, se calculó el porcentaje de droga disuelta a partir del promedio de 3 determinaciones.

Cinética de disolución

Aplicación de los métodos Modelo Independientes

La disolución de los comprimidos de diclofenac de PLAMECOR se caracterizó mediante diversos parámetros calculados a partir de los datos experimentales.

- $t_{10\%}$, $t_{50\%}$, $t_{80\%}$: correspondientes al tiempo que tardan en disolverse estos porcentajes de la dosis.

- Eficiencia de disolución (DE %: del inglés *dissolution efficiency*): calculada a partir de las curvas acumulativas de fármaco disuelto, siendo necesario que se haya disuelto, como mínimo, el 90% de la dosis.

- Tiempo medio de disolución (MDT: del inglés *mean dissolution time*): calculado a partir de las curvas acumulativas de las cantidades disueltas de fármaco en función del tiempo.

Aplicación de los métodos Modelo Dependientes

Los modelos cinéticos estudiados fueron: orden cero; primer orden; raíz cúbica o modelo Hixson-Crowell; raíz cuadrada o modelo Higuchi; y función de Weibull.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 48 se presenta el electroferograma de diclofenac principio activo, con el correspondiente agregado de patrón interno.

FIGURA 48. Electroferograma de diclofenac principio activo

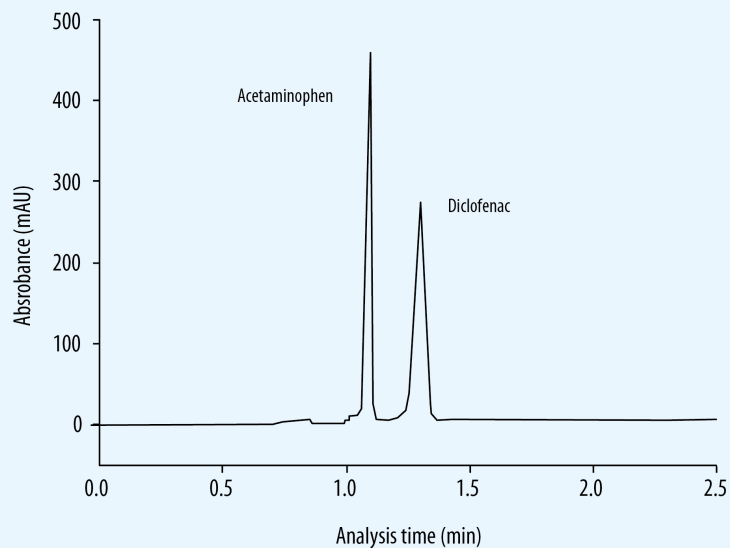


Figura 48: Absorbancia vs tiempo de análisis

Validación del método

Curva de calibración: a partir del análisis de regresión se obtuvo una buena linealidad [Rel de áreas = $(0,0208 \pm 0,0007) C_{\text{diclof}} - (0,0292 \pm 0,0479)$] con $r^2 = 0,9972$ con un nivel de confianza del 95%. El rango lineal se verifica entre 50 y 90 mg/L (Figura 49).

FIGURA 49. Curva de calibración (relación de áreas diclofenac/paracetamol) vs Concentración de diclofenac ppm

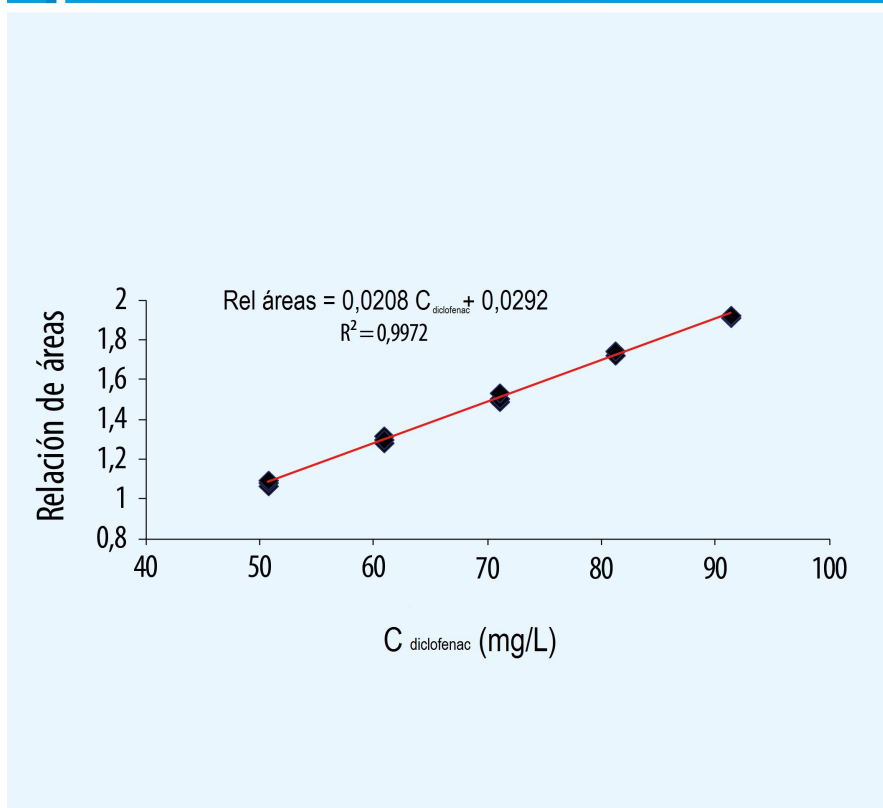


Figura 49: Relación de áreas (patrón interno/diclofenac) vs Concentración de diclofenac (mg/L)

El análisis electroforético de placebo demuestra que los excipientes presentes en los comprimidos de diclofenac no interfieren en la determinación, confirmando esta manera, la especificidad del método (Figura 50).

Precisión: el método propuesto resultó ser altamente preciso, teniendo un coeficiente de variación para repetibilidad (n=10) de 1,72% (Tabla 16), valor que se encuentra por debajo del máximo aceptado por las farmacopeas para preparados farmacéuticos ($CV \leq 2\%$).

Exactitud: Los porcentajes de recuperación por el método de sobreagregado, adicionando distintas cantidades del analito sobre placebo, estuvieron en el rango de 100,36 – 103,47%, valores que están dentro del rango permitido por USP y ANMAT (Tabla 17).

FIGURA 50. Electroferograma de placebo

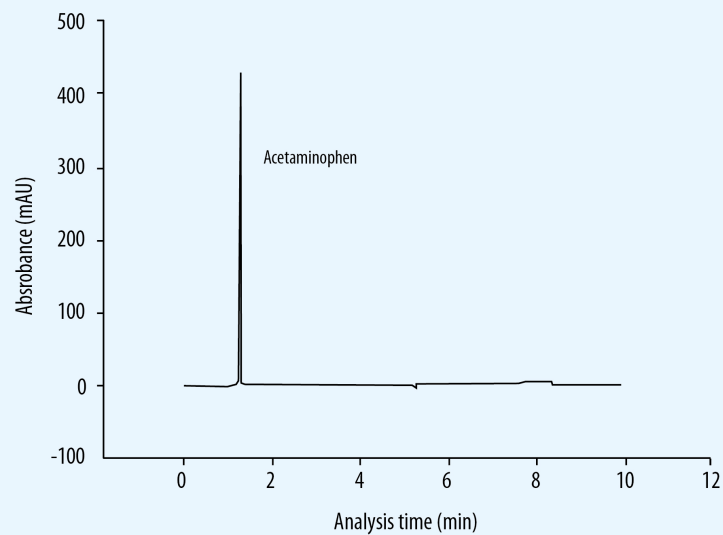


Figura 50: Absorbancia vs tiempo de análisis

Tabla 16: Precisión (Repetibilidad), se efectuó el análisis de 10 alícuotas de muestras homogéneas equivalentes al contenido de diclofenac presente en un comprimido

Muestra N°	% Masa recuperada
1	99,32
2	96,68
3	95,37
4	95,23
5	94,05
6	94,47
7	95,48
8	96,12
9	97,35
10	98,14
X_{promedio}	96,22
SD	1,66
CV%	1,72

Tabla 17: Exactitud de CE (porcentajes de recuperación del analito sobreagregado al placebo)

Concentración de diclofenac (% del valor declarado en el rótulo)	% Recuperación
80	101,18
	101,09
	102,79
100	102,14
	101,69
	102,93
120	102,02
	103,47
	100,36

El método electroforético fue comparado estadísticamente con HPLC mediante ANOVA (Tabla 18). El valor experimental de t resultó ser menor que el valor crítico de t de tablas, lo cual indica que la diferencia entre el método electroforético y HPLC se debe a errores aleatorios. En cuanto a la prueba F, el valor experimental de F es menor que el valor tabulado, lo cual indica que ambos métodos no presentan desviaciones estándar significativamente diferentes en un nivel de confianza del 95%.

Tabla 18: Comparación estadística del método electroforético con el método de referencia

Parámetro	Electroforesis Capilar	HPLC-UV
Xm ± SD	48,11 ± 0,80	49,55 ± 0,68
CV%	1,73	1,38
S²	0,69	0,47
F	1,47 (3,1788)	
T	-4,22 (2,1009)	

(Los valores entre paréntesis corresponden a los valores críticos tabulados para p=0,05)

Perfil de Disolución

FIGURA 51. Perfil de Disolución de Diclofenac

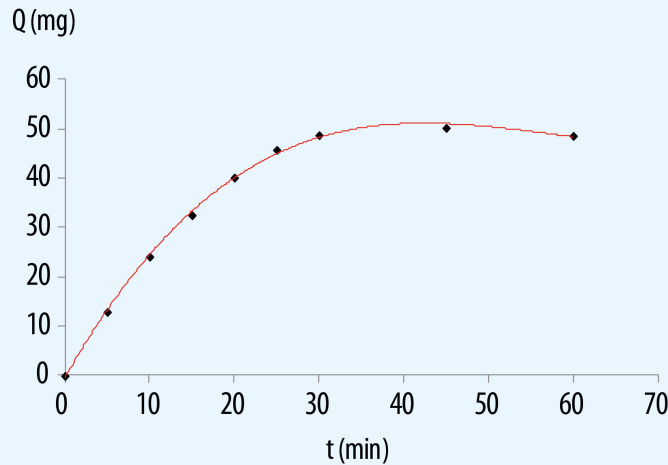


Figura 51: Cantidad de principio activo disuelto (Q) vs tiempo de disolución transcurrido.

Cinética de disolución

Métodos Modelo Independientes

Parámetros calculados:

$$t_{50\%} = 10,34 \text{ min}$$

$$t_{80\%} = 20 \text{ min}$$

$$DE\% = 79,41\%$$

$$MDT = 10,85 \text{ min}$$

Estos resultados señalan que los comprimidos de diclofenac de PLAMECOR son de rápida disolución, alcanzándose el 80% de droga disuelta en 20 min.

Métodos Modelo dependientes

En las Figuras 52, 53, 54, 55, y 56 se muestran los resultados obtenidos a partir de los modelos cinéticos estudiados.

Para determinar el modelo que mejor explica la disolución de comprimidos de diclofenac se usaron como criterios de selección los valores de r^2 y AIC (Criterio de Información de Akaike). El valor más elevado de r^2 y el menor valor

de AIC establecen el modelo que mejor ajusta este perfil de disolución (Tabla 19).

Tabla 19: Comparación de valores de r^2 y AIC de los modelos cinéticos estudiados para comprimidos de diclofenac de 50 mg

Modelos cinéticos	r^2	AIC
Orden cero	0,9782	15,2552
Primer orden	0,9837	-12,1213
Raíz cúbica (Hixson-Crowell)	0,9984	-27,8613
Raíz cuadrada (Higuchi)	0,9979	3,4225
Función de Weibull	0,9634	-6,6849

En base a estos dos criterios, el modelo de raíz cúbica de Hixson-Crowell, es el que mejor ajusta al perfil de disolución de comprimidos de diclofenac de PLAMECOR. Este modelo considera que la superficie del comprimido expuesto al medio de disolución, varía en función de la raíz cúbica del cuadrado del volumen del sólido, a lo largo del proceso.

CONCLUSIONES

La electroforesis capilar es aplicable al control de calidad de comprimidos de diclofenac 50 mg, sin interferencia por parte de los excipientes. Éste método es simple, rápido y específico. Permite la separación y cuantificación en tiempos menores que HPLC, con la consiguiente reducción de gasto de solventes y reactivos, lo cual hace de la electroforesis capilar una técnica amigable con el medio ambiente. A su vez los requerimientos de volumen de muestra son muy bajos, lo que permite el seguimiento de la disolución sin reposición de volumen. Los comprimidos de diclofenac de PLAMECOR son de rápida disolución, ya que el 80% de droga se disuelve en 20 min, y el modelo que mejor explica dicho perfil es el de raíz cúbica de Hixson-Crowell.

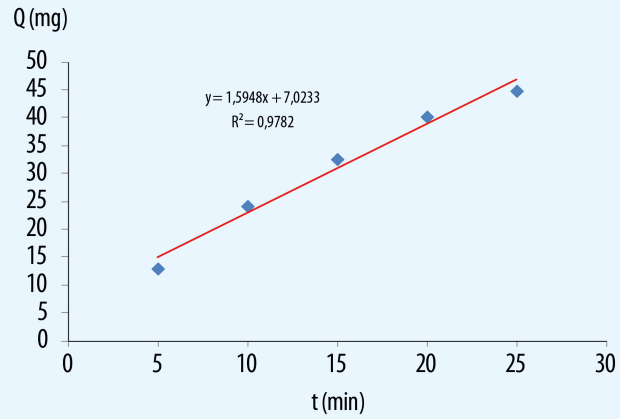
FIGURA 52. Métodos Modelo Dependientes. Orden cero


Figura 52: Cantidad de principio activo disuelto (Q) vs tiempo de disolución transcurrido

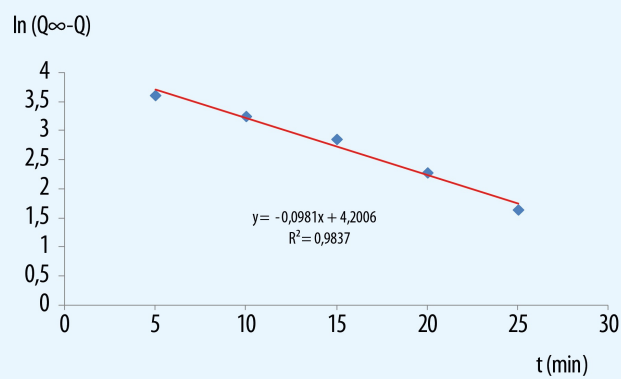
FIGURA 53. Métodos Modelo Dependientes. Primer Orden


Figura 53: $(Q_{\infty} - Q)$ es la cantidad de fármaco remanente o no disuelto vs tiempo de disolución

FIGURA 54. Métodos Modelo Dependientes. Raíz cúbica o modelo de Hixson Crowell

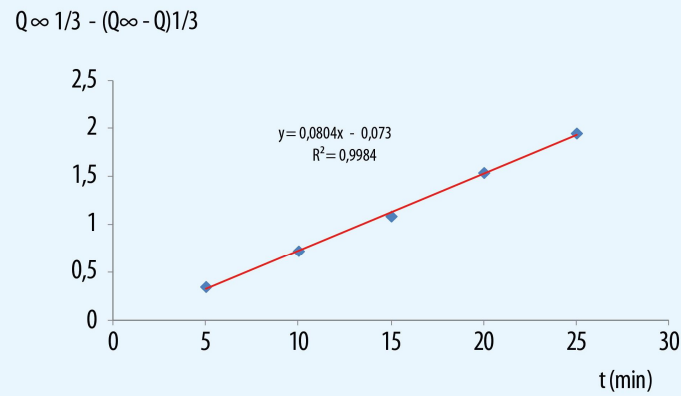


Figura 54: $Q_{\infty}^{1/3} - (Q_{\infty} - Q)^{1/3}$ vs tiempo de disolución

FIGURA 55. Métodos Modelo Dependientes. Raíz cuadrada o modelo de Higuchi

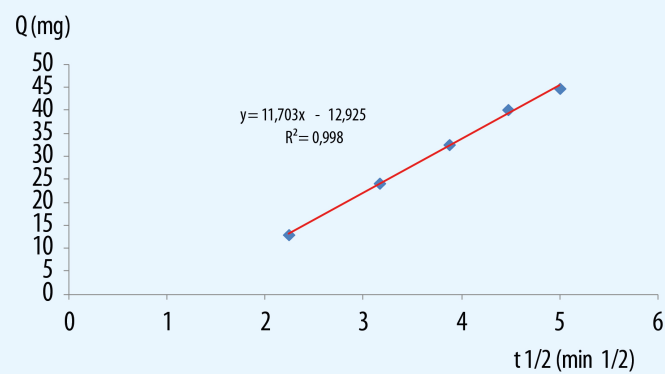


Figura 55: Cantidad de principio activo disuelto (Q) vs raíz cuadrada del tiempo de disolución transcurrido

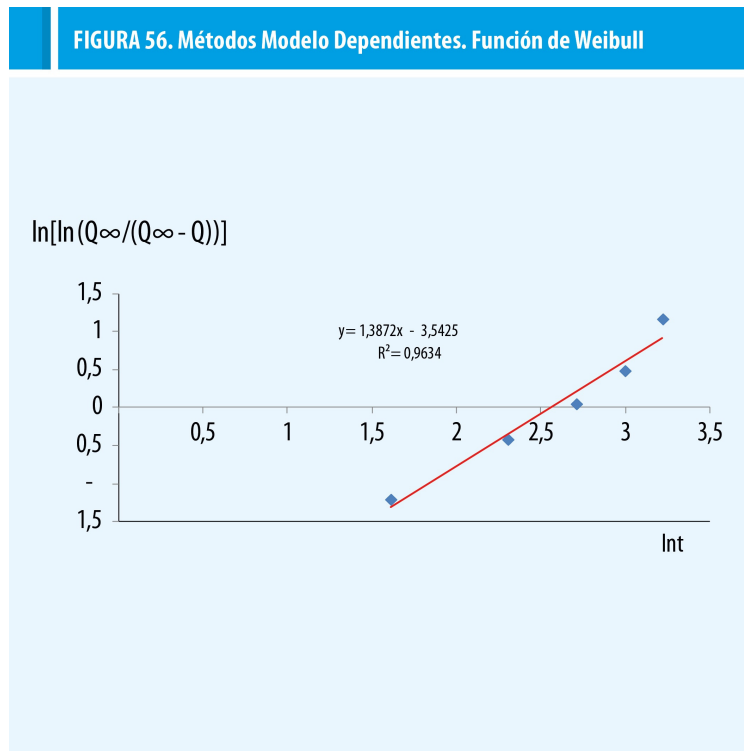


Figura 56: $\ln \left[\ln \left(\frac{Q_{\infty}}{Q_{\infty} - Q} \right) \right]$ vs ln del tiempo de disolución

6.3 ESTABILIDAD DE DROGAS

Los estudios de estabilidad tienen como objetivo asegurar que el principio activo en una determinada forma farmacéutica mantenga su eficacia, sea estable, seguro y esté biodisponible hasta la fecha de su vencimiento.

En el año 1990 se estableció la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH del inglés *International Conference of Harmonisation*) con el fin de unificar criterios para los procesos de desarrollo y registro de nuevos medicamentos. Forman parte de esta organización las unidades regulatorias de la industria farmacéutica de Europa, Estados Unidos y Japón.

Según la ICH el propósito de un estudio de estabilidad es proveer evidencia de cómo la calidad de una droga varía con el tiempo; proponer el envase; las condiciones de conservación y establecer el período de vida útil durante el cual se mantienen los parámetros químicos, físicos y/o microbiológicos prefijados en el diseño del producto y determinados en la liberación del mismo.

Una de las consecuencias relativamente frecuentes de las condiciones inadecuadas de transporte y de almacenamiento de medicamentos es la modificación de la biodisponibilidad, en general, asociada con dificultad en la disgregación y disolución de los comprimidos. Es por ello que acompañando a los estudios de estabilidad, es importante recabar información en los perfiles de disolución con el fin de comprobar no solamente la cantidad de principio activo y los posibles productos de degradación, sino su perfil de entrega en condiciones normalizadas. (Ercolano y colaboradores, 2010)

6.3.1 Degradación

El envejecimiento suele desencadenar modificaciones en la molécula del principio activo, originadas como consecuencia de las interacciones entre los componentes de la especialidad farmacéutica. (Kumar y colaboradores, 2012)

La degradación puede producirse por: hidrólisis, oxidación, descomposición fotoquímica, polimerización, isomerización, reordenamientos moleculares. Estas reacciones de degradación están influenciadas por:

1. Factores intrínsecos (del sistema): relacionados con las interacciones entre los componentes del producto, como ser: excipiente-excipientes; principio activo-excipientes; principio activo-envase; excipiente-envase; principio activo-excipientes-envase.
2. Factores externos (del medio ambiente): luz, temperatura, humedad, oxígeno, pH y factores relacionados con la elaboración del producto.

Todos estos factores inciden sobre el período de vida útil de un medicamento. (Rivas de López, 1983)

6.3.2 Estudios de estabilidad

La estabilidad de un producto farmacéutico es la resultante de:

- el desarrollo farmacéutico
- la calidad de las materias primas
- el proceso de fabricación y de empaque
- las condiciones de conservación, almacenamiento y transporte.

La OPS, a través de su Revista Panamericana de Salud Pública insiste con la realización de estudios de estabilidad de los medicamentos debido a que los climas tropicales que ponderan en los países sudamericanos conciernen a la degradabilidad acelerada de los ingredientes activos. Sumado a ello, se ha incrementado la producción de especies farmacéuticas genéricas lo que induce a los químicos analíticos a volcarse al estudio de la estabilidad de los distintos principios activos a fin de prolongar o acortar los periodos de vencimiento fijados para los productos, amparados siempre en la efectividad o potencia del mismo, conociendo cuáles parámetros (humedad, temperatura, luz) son más importantes en su cinética de degradación.

Estos estudios permiten determinar la estabilidad intrínseca de las moléculas estableciendo las vías degradativas más probables. El método analítico propuesto en un estudio de estabilidad debe ser específico, es decir, debe detectar el principio activo intacto en presencia de los eventuales productos de degradación y/o impurezas. (Ercolano y colaboradores, 2010)

Los estudios de estabilidad deben orientarse para la región donde serán destinados considerando la zona climática estipulada. El mundo se encuentra dividido en 4 zonas climáticas, nuestro país se encuentra en la Zona II (subtropical con posible humedad elevada).

El diseño del programa de estabilidad para un producto farmacéutico debe estimar los cambios que pueden ocurrir durante la distribución, almacenamiento y período de uso subsiguiente de la sustancia, y sobre esta base seleccionar las variables de la formulación a estudiar durante el ensayo. (Farmacopea Argentina, 2011)

Según la ICH, las condiciones a las que debe ser sometido el producto en un estudio de estabilidad son las siguientes (Tabla 20):

Tabla 20: Condiciones para un estudio de estabilidad (ICH)

Estudio	Condiciones	Tiempo
Tiempo real	25°C ± 2°C y 60 ± 5% HR o	12 meses
	30°C ± 2°C y 65 ± 5% HR	24 meses
Acelerado	40°C ± 2°C y 75 ± 5% HR	6 meses
Cuando se producen cambios significativos durante el estudio acelerado, se deben realizar los ensayos de todos los parámetros en condiciones intermedias		
Intermedio	30°C ± 2°C y 65 ± 5% HR	12 meses

HR: humedad relativa

Los estudios de estabilidad acelerada están diseñados para aumentar la velocidad de degradación química y de cambios físicos de una droga usando condiciones de almacenamiento exageradas.

Los estudios de estabilidad de tiempo real o de largo plazo son estudios experimentales llevados a cabo durante y más allá de la fecha de vencimiento en las condiciones de conservación indicadas para el período de comercialización de un medicamento. (Mostafa, 2010)

Un cambio significativo en un estudio acelerado se define como:

1. Una pérdida del 5% de potencia del valor inicial de valoración.
2. Cualquier producto de degradación que exceda los límites establecidos.
3. Un exceso del producto en sus límites de pH.
4. Resultados del ensayo de disolución fuera de los límites especificados.
5. No cumplimiento del producto con las especificaciones de apariencia y propiedades físicas como color, suspendibilidad, dureza, aparición de separación de fases, etc.

Los resultados de los estudios de estabilidad son elementos clave durante todas las etapas de desarrollo y de la posterior performance del producto en el mercado en cuanto a calidad, eficacia y seguridad. (Ercolano y colaboradores, 2010)

6.3.3 Descomposición química en estado sólido

La estabilidad de las drogas en presentaciones orales sólidas es de mucha relevancia, ya que estas formas farmacéuticas son las más difundidas en el mercado.

La degradación de la fase sólida ocurre principalmente en solución, en la capa de solvente asociada a la fase sólida. Las descomposiciones químicas de las sustancias en estado sólido se agrupan en cuatro categorías:

1. Hidrólisis: es la reacción de descomposición más importante en el estado sólido. La reacción puede ser una hidrólisis u otra forma de reacción que involucre a un solvente (solvólisis).
2. Oxidación: por interacción de la droga con el oxígeno. Ocurre mayormente en solución.
3. Fotólisis: por la penetración de la luz en la superficie de la forma farmacéutica (penetración < 0,3 mm), por lo cual la descomposición fotolítica queda confinada a la superficie del comprimido.
4. Pirólisis: es la ruptura térmicamente inducida de una ligadura. Tiene lugar cuando la droga es sometida a muy altas temperaturas.

El ensayo de disolución de productos farmacéuticos sólidos asegura la calidad de los mismos, ya que la disolución cambia en función del tiempo de almacenamiento debido al envejecimiento de los aglutinantes y de los desintegrantes. Es de rigor efectuar el ensayo de disolución en todo estudio de estabilidad de formas farmacéuticas sólidas periódicamente a lo largo de todo el tiempo correspondiente. (Jiménez Cerezo y colaboradores, 2006)

6.3.4 Métodos de ensayo indicadores de estabilidad

Los métodos de ensayo indicadores de estabilidad son métodos cuantitativos validados que pueden detectar los cambios con el tiempo en las propiedades químicas, físicas o microbiológicas del producto droga y son específicos de manera tal que los contenidos de principio activo, productos de degradación y otros componentes de interés puedan ser medidos en forma segura y sin interferencia. (Lorenzo y colaboradores, 2005)

6.3.5 Estudios de descomposición forzados para generar productos de degradación de la droga

La guía ICH Q1A (R2) sugiere las siguientes condiciones:

- Incrementos de 10°C por encima de las temperaturas del estudio de estabilidad acelerada.
- Humedad cuando sea apropiado.
- Hidrólisis en un amplio rango de pH en solución o suspensión: La degradación hidrolítica de una droga en condiciones ácidas y alcalinas puede ser estudiada por reflujo de la droga en 0,1N HCl/NaOH durante 8 horas. El tiempo de reflujo debe ser aumentado si no se ha observado degradación. Si se observa degradación completa de la droga, pueden disminuirse tiempo y temperatura.
- Oxidación: La degradación oxidativa de la droga puede darse por reacción con oxígeno molecular o por reacción con otros agentes presentes en la formulación. Para estudiar este proceso degradativo se deben agregar concentraciones conocidas de iniciadores, o también puede ser usado peróxido de hidrógeno en el rango de concentración entre 3-30%.
- Fotólisis (Fotoestabilidad ICH Q1B): Los estudios fotolíticos deben ser llevados a cabo exponiendo la droga a la luz. La energía de exposición debe ser mínimamente de 1,2 millones de horas lux y 200 Watt/hora/m² UV. Debe usarse un control, para lo cual una muestra protegida, envuelta en papel aluminio, se expone a la luz en iguales condiciones que la muestra sin protección. Si ninguna descomposición es vista, la intensidad debe ser aumentada cinco veces. En caso de que ninguna descomposición

aparezca, la droga puede ser declarada fotoestable (Ercolano y colaboradores, 2010).

6.4 EXPERIMENTAL 8

ESTABILIDAD DE PARACETAMOL

Los ensayos del siguiente trabajo fueron desarrollados por Iván Moisés Maciel, en el marco de una tesina de grado, en nuestro laboratorio.

Se estudió la influencia de factores medioambientales en el perfil y la cinética de disolución de comprimidos de paracetamol 500 mg elaborados por PLAMECOR. En base a los parámetros humedad y temperatura, se determinaron los modelos cinéticos que mejor se ajustan a los datos experimentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Principios Activos y Muestras

Se utilizó paracetamol principio activo lote N° 1009478, origen China, (99,99% pureza determinada por HPLC) y paracetamol 500 mg comprimidos lote N° 062/12 provistos por PLAMECOR.

El placebo utilizado en las determinaciones de especificidad y exactitud también fue provisto por PLAMECOR, y su composición es la misma presente en los comprimidos: estearato de magnesio 1%, talco 2%, almidón glicolato de sodio 4,8%, polivinilpirrolidona (PVP) 5,2%, precompactado blanco 16,6%, aerosil 1,4%.

Equipamiento

Disolutor VK 7000 con microprocesador, agitación con paletas, de acuerdo a los requerimientos de USP y FA.

Espectrofotómetro UV-Visible Boeco S-26.

Estufa de cultivo Faeta.

Experimental

Los comprimidos de paracetamol fueron sometidos a diferentes condiciones de almacenamiento:

- a. Temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) y al abrigo de la luz.
- b. Ambiente seco: temperatura $40 \pm 2^\circ\text{C}$, en baño de arena.
- c. Condiciones aceleradas: temperatura $40 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad $75\% \pm 5\%$.
Para ello los blíster de comprimidos fueron colocados en estufa dentro de un recipiente en el que se creó una atmósfera del 75% de humedad mediante una solución saturada de NaCl. (Stanisz, 2003)

Los comprimidos fueron conservados en el blíster en que habitualmente se distribuyen, por un período de 6 meses. Las muestras fueron tomadas cada 15 días. Las normas ICH establecen que en un estudio acelerado, se debe muestrear a los 0; 3 y 6 meses.

Se monitoreó el perfil de disolución durante el estudio de estabilidad. Las experiencias se llevaron a cabo en las siguientes condiciones de ensayo:

- Medio de disolución: agua destilada 900 mL, equilibrado a $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
- Disolutor con sistema de agitación por paletas, velocidad: 100 rpm

Se tomaron alícuotas de 2 mL, con reposición de volumen, cada 2 min hasta los 10 min, luego las extracciones se efectuaron cada 5 min hasta los 60 min. Las muestras extraídas del disolutor fueron centrifugadas, diluidas y posteriormente leídas en espectrofotómetro UV-visible a 243 nm.

RESULTADOS

Perfiles de disolución

Se construyeron los perfiles de disolución de comprimidos de paracetamol correspondientes a 15; 45; 90; 135 y 180 días de almacenamiento en las tres condiciones de ensayo mencionadas (temperatura ambiente, ambiente seco y condiciones aceleradas).

Mediante un análisis de estos perfiles se concluyó que existe una gran similitud entre los perfiles de disolución de los comprimidos almacenados en condiciones ambientales y aquellos mantenidos a 40°C y ambiente seco, en tanto que se observó una disolución más lenta para los comprimidos almacenados en condiciones de temperatura y humedad elevadas.

Se muestran los perfiles correspondientes a 15; 90 y 180 días (Figuras 57, 58 y 59).

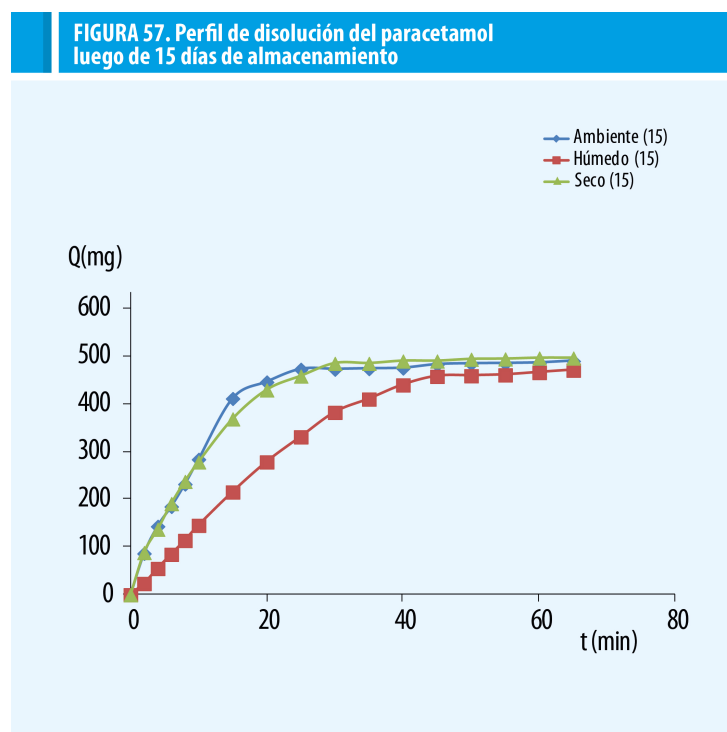


Figura 57: Cantidad de paracetamol disuelto (Q) vs tiempo de disolución transcurrido

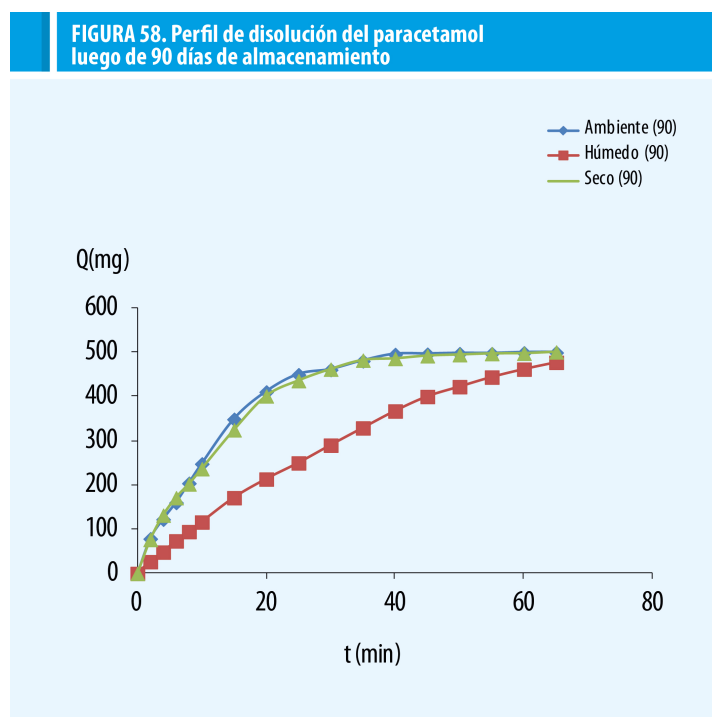


Figura 58: Cantidad de paracetamol disuelto(Q) vs tiempo de disolución transcurrido

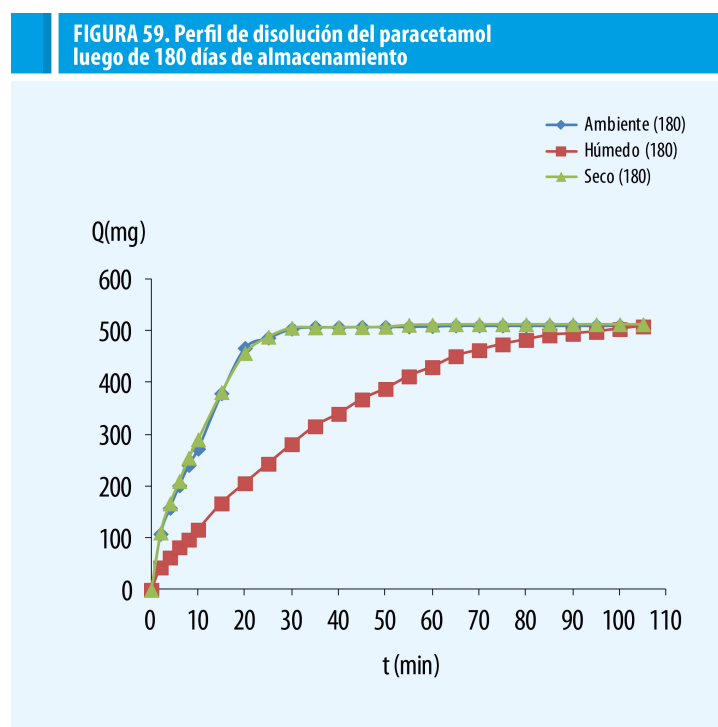


Figura 59: Cantidad de paracetamol disuelto(Q) vs tiempo de disolución transcurrido

Cinética de disolución

Los modelos cinéticos estudiados fueron: orden cero; primer orden; raíz cúbica o modelo Hixson-Crowell; raíz cuadrada o modelo Higuchi; y función de Weibull.

Para determinar los modelos que mejor explican la disolución de comprimidos de paracetamol se usaron como criterios de selección los valores de r^2 y AIC (Criterio de Información de Akaike) (Tabla 21).

Tabla 21: Modelos cinéticos estudiados en el perfil de disolución de paracetamol en distintas condiciones de almacenamiento

tiempo	Modelo cinético	Orden cero		Primer orden		Raíz cúbica		Raíz cuadrada		Weibull	
		r^2	AIC	r^2	AIC	r^2	AIC	r^2	AIC	r^2	AIC
15 días	Ambiente	0,999	27	0,953	-9	0,9717	-9	0,9736	47	0,9623	-9
	Seco	0,9919	38	0,9952	-23	0,9989	-31	0,9945	45	0,9889	-17
	Acelerado	0,995	16	0,997	-38	0,9986	-38	0,9822	69	0,9996	-36
90 días	Ambiente	0,9997	18	0,9772	-21	0,9900	-19	0,9782	43	0,9758	-13
	Seco	0,9924	35	0,9907	-29	0,9966	-26	0,9925	35	0,9925	-21
	Acelerado	0,9995	13	0,9977	-47	0,9991	-44	0,9807	35	0,9979	-27
180 días	Ambiente	0,9925	31	0,9699	-18	0,9867	-16	0,9841	41	0,9691	-13
	Seco	0,9973	37	0,9874	-23	0,9972	-26	0,9954	34	0,9834	-17
	Acelerado	0,9984	18	0,9932	-43	0,9955	-6	0,9703	36	0,9814	-18

Los perfiles de disolución de los comprimidos almacenados a temperatura ambiente responden al modelo de raíz cúbica o Hixson-Crowell. Aquellos mantenidos a temperatura $40 \pm 2^\circ\text{C}$, en baño de arena también presentan un ajuste al modelo de raíz cúbica. Sin embargo, condiciones de temperatura y humedad elevadas (temperatura $40 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad $75\% \pm 5\%$) responden a la expresión de primer orden al cabo de 180 días de almacenamiento (Figuras 60 y 61).

Es destacable el cambio en la cinética de disolución de paracetamol como consecuencia del almacenamiento en condiciones de temperatura y humedad elevadas, siendo la humedad un factor crítico: de una cinética de disolución de tipo raíz cúbica, ha pasado a una disolución de orden uno. Esta alteración en las propiedades de disolución se traducirá *in vivo* en alteraciones farmacodinámicas del producto, es decir en la producción de los efectos terapéuticos en el paciente.

CONCLUSIONES

Se comprobó que los comprimidos de paracetamol 500 mg elaborados por PLAMECOR son susceptibles a los cambios de temperatura y humedad en los ambientes en los que son transportados y almacenados.

El análisis de los perfiles de disolución permitió caracterizar, a través de modelos cinéticos de superficie variable, los cambios provocados por su almacenamiento a 40°C y humedad del 75%, condiciones características del clima subtropical de la región NE de nuestro país.

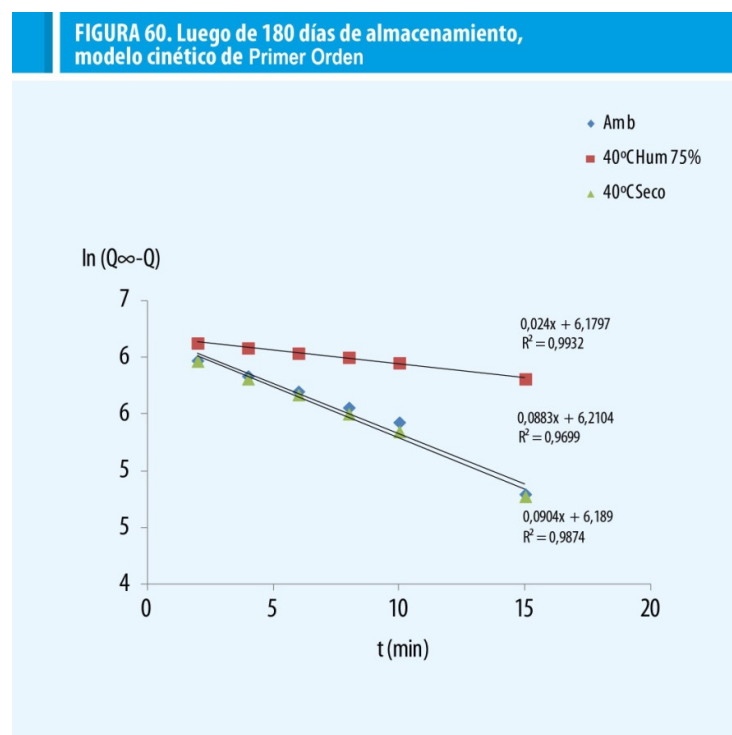


Figura 60: $(Q_{\infty} - Q)$ es la cantidad de fármaco remanente vs tiempo de disolución

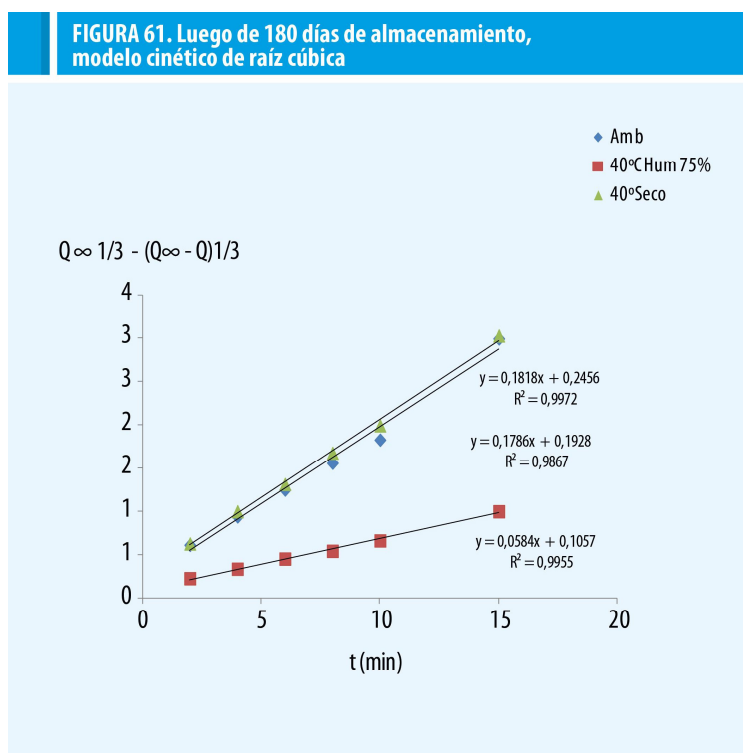


Figura 61: $Q_{\infty}^{1/3} - (Q_{\infty} - Q)^{1/3}$ vs tiempo de disolución

Los resultados alcanzados indican que dichos comprimidos mantienen sus dosis de principio activo de acuerdo al rótulo, durante almacenamiento y transporte por un período de 6 meses en condiciones ambientales en el blíster en que son habitualmente envasados, aún en temperaturas estivales, siempre que estén guardados en lugar seco. Sin embargo, deben evitarse condiciones de humedad elevada, que si bien no inactivan al paracetamol, retardan considerablemente su disolución en los estadíos iniciales, situación que de replicarse *in vivo*, podría llevar a una demora en producir el efecto analgésico en el paciente.

6.5 EXPERIMENTAL 9

DISOLUCIÓN DE COMPRIMIDOS GENÉRICOS DE IBUPROFENO ALMACENADOS EN CONDICIONES TEMPERATURA Y HUMEDAD ELEVADAS

Los ensayos del siguiente trabajo fueron desarrollados por María Cecilia Castro, en el marco de una beca de pregrado, en nuestro laboratorio.

En el presente trabajo se estudió la influencia de la temperatura y la humedad en la estabilidad de comprimidos de 400 mg de ibuprofeno elaborados por PLAMECOR, en condiciones de degradación forzada. Para ello previamente se optimizaron las condiciones de disolución para la construcción de los perfiles y luego se efectuó el análisis modelístico de la cinética de los comprimidos de ibuprofeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Principios Activos y Muestras

Se utilizó ibuprofeno 400 mg comprimidos lote N° 062/12 provisto por PLAMECOR. Cabe destacar que, en el caso de los comprimidos de ibuprofeno, PLAMECOR adquiere el polvo para compresión directa, Ibuprofeno DC90, origen China, con 90% de principio activo, por lo cual no se cuenta con la formulación exacta.

Equipamiento

Disolutor VK 7000 con microprocesador, agitación con paletas, de acuerdo a los requerimientos de USP y FA.

Espectrofotómetro UV-Visible Boeco S-26.

Estufa de cultivo Faeta.

Experimental

Los comprimidos de ibuprofeno fueron sometidos a diferentes condiciones de almacenamiento:

- a. Temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) y al abrigo de la luz.
- b. Ambiente seco: temperatura $40 \pm 2^\circ\text{C}$, en baño de arena.
- c. Condiciones aceleradas: temperatura $40 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad $75\% \pm 5\%$.
Para ello los blíster de comprimidos fueron colocados en estufa dentro de un recipiente en el que se creó una atmósfera del 75% de humedad mediante una solución saturada de NaCl. (Stanisz, 2003)

Los comprimidos fueron conservados en el blíster en que habitualmente se distribuyen, por un período de 6 meses. Las muestras fueron tomadas cada 15 días. Las normas ICH establecen que en un estudio acelerado, se debe muestrear a los 0, 3 y 6 meses.

Se monitoreó el perfil de disolución durante el estudio de estabilidad. Las experiencias se llevaron a cabo en las siguientes condiciones:

- Medio de disolución: buffer fosfato (pH = 7,2) 900 mL, equilibrado a $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
- Disolutor con agitación mediante paletas, velocidad: 25 rpm

Se retiraron alícuotas de la disolución a distintos tiempos (1; 3; 5; 7; 9; 12; 15; 30; 45; 60; 90 y 120 minutos), se centrifugaron para separar los excipientes insolubles, se separó el sobrenadante y se efectuó la lectura espectrofotométrica a 265 nm. Como referencia del 100% de disolución se tomaron las lecturas correspondientes a muestras de comprimidos de ibuprofeno a cuatro horas de iniciada la disolución.

Estas condiciones de trabajo fueron seleccionadas luego de ensayos preliminares debido a que:

- La velocidad de 50 rpm propuesta por la Farmacopea Argentina, para el ensayo de disolución, en el caso de los comprimidos estudiados, no permite contar con una cantidad de puntos experimentales adecuada en la zona de curva que se utiliza para el análisis cinético del perfil de disolución.
- El espectro de absorción del ibuprofeno presenta un máximo a 221nm y otro de menor intensidad a 265 nm. Para efectuar la lectura a 221 nm (recomendado por FA) la muestra debe ser diluida 1/25, con el incremento del error y el aumento del tiempo de trabajo que ello conlleva. Trabajando a 265 nm esa dilución es innecesaria.

Por otra parte, se compararon los perfiles de disolución de los comprimidos de ibuprofeno de PLAMECOR con 2 marcas comerciales: Ibupirac® e Ibu400®. La comparación se efectuó mediante los factores de diferencia f_1 (Ecuación 63) y similitud f_2 (Ecuación 64). Cuando f_1 toma valores entre 0 y 15 se considera que no hay diferencias significativas entre los perfiles de disolución. Cuando f_2 toma valores entre 50 y 100 se considera que los perfiles son similares. (Moore y Flanner, 1996)

RESULTADOS

Perfiles de disolución

Se construyeron los perfiles de disolución de comprimidos de ibuprofeno correspondientes a 15; 45; 75; 90; y 180 días de almacenamiento en las tres condiciones de ensayo mencionadas (temperatura ambiente, ambiente seco y temperatura y humedad elevadas). En las figuras 62, 63 y 64 se muestran los perfiles correspondientes a 15, 90 y 180 días.

Mediante el análisis comparativo se concluyó que existe una gran similitud entre los perfiles de disolución de los comprimidos almacenados en condiciones ambientales y aquellos mantenidos a 40°C y ambiente seco, en tanto que se observó una disolución más lenta para los comprimidos almacenados en condiciones de temperatura y humedad elevadas.

En la figura 65, se muestra la comparación entre los perfiles de disolución de comprimidos de ibuprofeno de PLAMECOR, versus las marcas comerciales ensayadas.

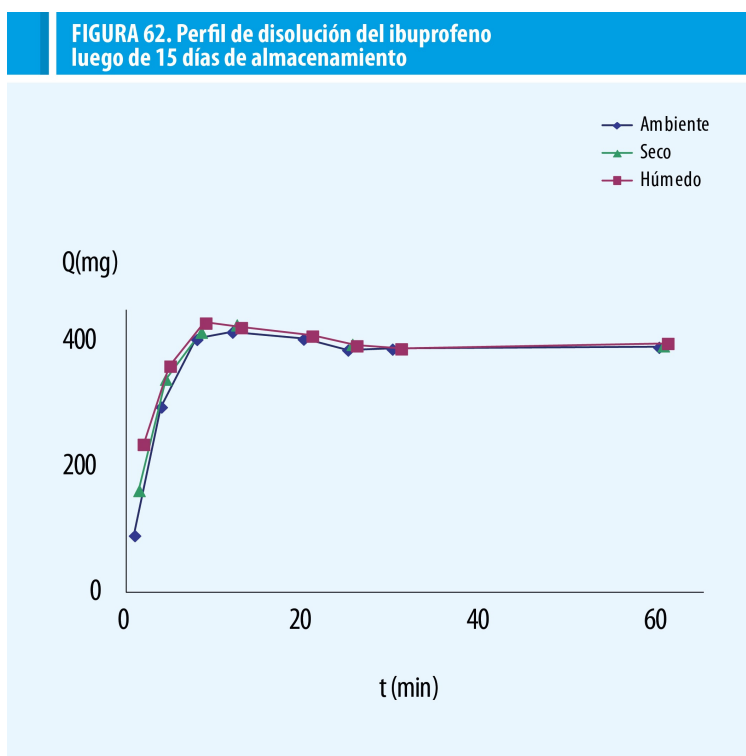


Figura 62: Cantidad de ibuprofeno disuelto (Q) vs tiempo de disolución transcurrido

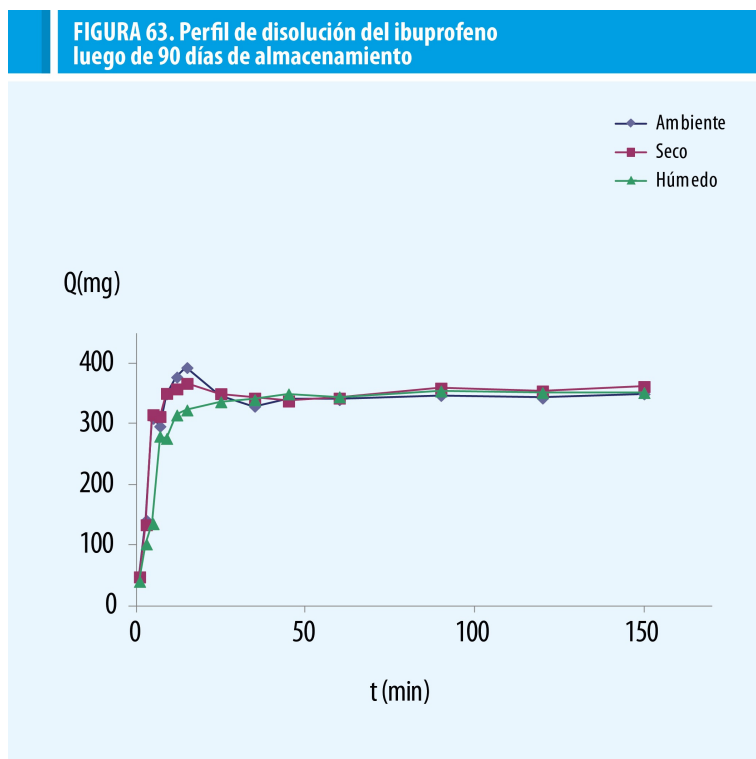


Figura 63: Cantidad de ibuprofeno disuelto (Q) vs tiempo de disolución transcurrido

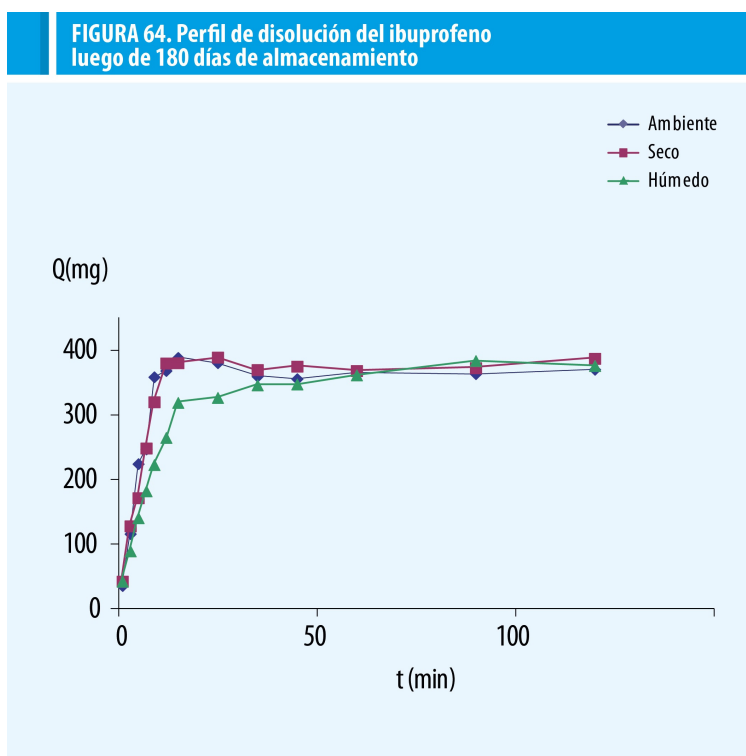


Figura 64: Cantidad de ibuprofeno disuelto (Q) vs tiempo de disolución transcurrido

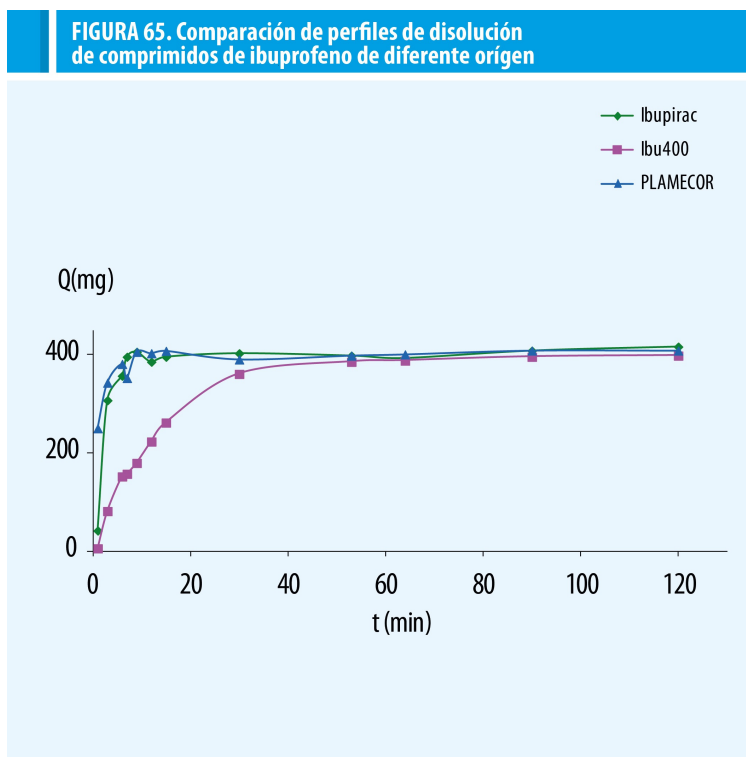


Figura 65: Cantidad de ibuprofeno disuelto (Q) vs tiempo de disolución transcurrido

Se compararon: Ibu400® y comprimidos de PLAMECOR; e Ibupirac® y comprimidos de PLAMECOR respectivamente. En el primer caso se calculó un factor de diferencia (f_1) de 101,36, y un factor de similitud (f_2) de 15,69, señalando que los perfiles son marcadamente diferentes. En el segundo caso se calculó un factor de diferencia (f_1) de 40,82, y un factor de similitud (f_2) de 25,77, señalando falta de semejanza en los perfiles de disolución, lo que implica que tampoco son comparables en este caso.

Cinética de disolución

Los modelos cinéticos estudiados fueron: orden cero; primer orden; raíz cúbica; raíz cuadrada o modelo Higuchi; y función de Weibull.

Se modelaron los perfiles correspondientes a 15; 90; y 180 días de almacenamiento en las tres condiciones de ensayo mencionadas (temperatura ambiente, ambiente seco y temperatura y humedad elevadas).

Para determinar los modelos que mejor explican la disolución de comprimidos de ibuprofeno se usaron como criterios de selección los valores de r^2 y AIC (Criterio de Información de Akaike) (Tabla 22).

Tabla 22: Modelos cinéticos estudiados en el perfil de disolución de ibuprofeno en distintas condiciones de almacenamiento

tiempo	Modelo cinético	Orden cero		Primer orden		Raíz cúbica		Raíz cuadrada		Weibull	
	Almacenamiento	r^2	AIC	r^2	AIC	r^2	AIC	r^2	AIC	r^2	AIC
15 días	Ambiente	0,943	36,1	0,992	-9,1	0,997	-12,9	0,978	32,2	0,999	-20,3
	Seco	0,891	38,7	0,994	-2,0	0,989	-6,1	0,987	29,9	0,999	-27,6
	Acelerado	0,843	40,3	0,978	-2,3	0,990	-16,9	0,987	30,1	0,979	-6,6
90 días	Ambiente	0,836	58,9	0,954	-4,8	0,933	0,9	0,917	54,8	0,968	-5,8
	Seco	0,883	56,2	0,851	0,5	0,878	3,2	0,918	54,1	0,946	-3,06
	Acelerado	0,815	59,1	0,750	0,6	0,813	-6,5	0,849	57,8	0,907	0,5
180 días	Ambiente	0,974	37,8	0,913	-6,3	0,947	-4,7	0,962	39,6	0,981	-7,8
	Seco	0,992	29,8	0,960	-13	0,978	-11,2	0,973	36,4	0,985	-10,8
	Acelerado	0,997	20	0,997	-33	0,870	-7,9	0,986	29,1	0,991	-15,6

Los perfiles de disolución de los comprimidos almacenados a temperatura ambiente y aquellos mantenidos a temperatura $40 \pm 2^\circ\text{C}$, en baño de arena responden a la expresión de función de Weibull (Figura 66).

En cambio, los comprimidos mantenidos en condiciones temperatura y humedad elevadas (temperatura $40 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad $75\% \pm 5\%$) presentan un mejor ajuste al modelo de raíz cúbica o Hixson Crowell en los primeros 3 meses evaluados, pero a los 180 días de almacenamiento, la cinética de disolución ajusta mejor a primer orden (Figura 67).

FIGURA 66. Luego de 180 días de almacenamiento, modelo cinético de Weibull

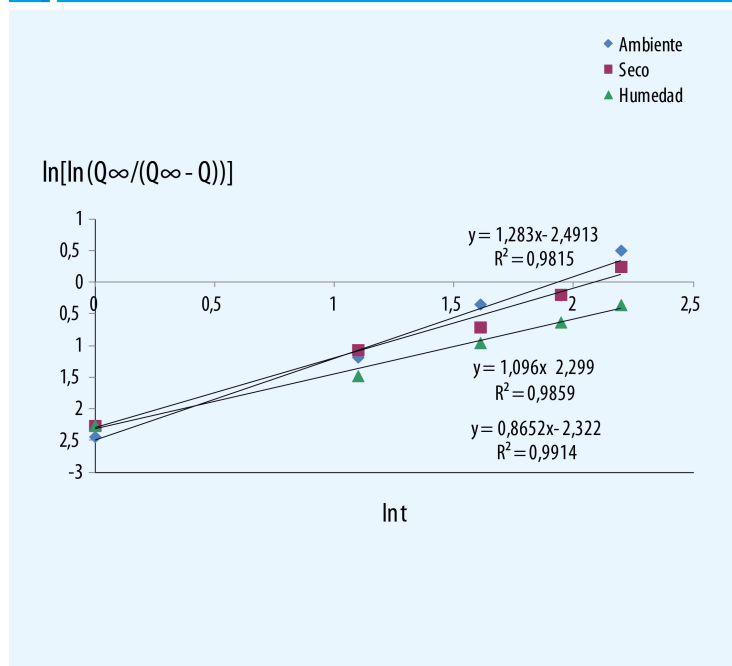


Figura 66: $\ln \left[\ln \left(\frac{Q_{\infty}}{Q_{\infty}-Q} \right) \right]$ vs \ln del tiempo de disolución

FIGURA 67. Luego de 180 días de almacenamiento, modelo cinético de Primer Orden

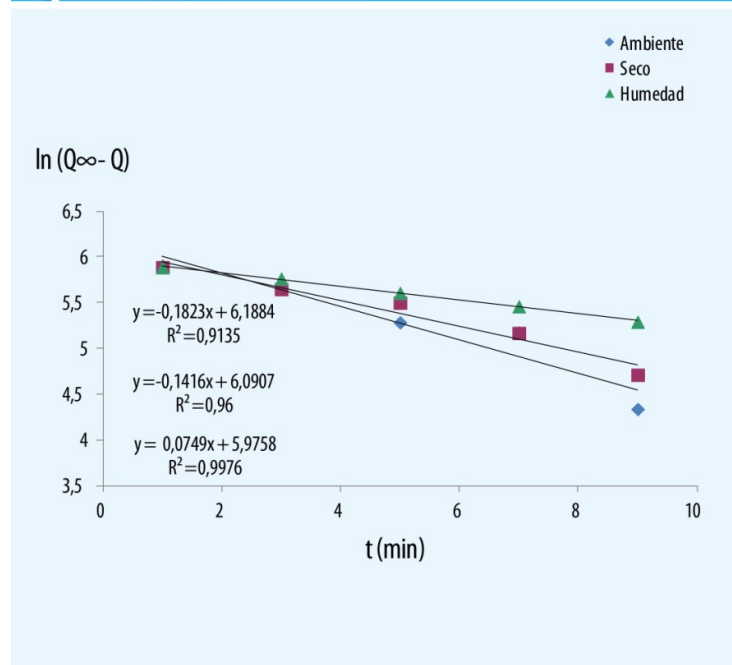


Figura 67: $(Q_{\infty}-Q)$ es la cantidad de fármaco remanente vs tiempo de disolución

Es destacable el cambio en la cinética de disolución de ibuprofeno como consecuencia del almacenamiento en condiciones de temperatura y humedad elevadas, siendo la humedad un factor crítico: de tener una cinética de disolución de función de Weibull, ha pasado a tener una cinética de disolución de raíz cúbica primeramente, y luego de primer orden. Esta alteración en las propiedades de disolución se traducirá *in vivo* en cambios en la farmacodinámica del producto, es decir en la producción de los efectos terapéuticos en el paciente.

CONCLUSIONES

Se comprobó que los comprimidos de ibuprofeno 400 mg elaborados por PLAMECOR son susceptibles a los cambios de temperatura y humedad en los ambientes en los que son transportados y almacenados.

El análisis de los perfiles de disolución permitió caracterizar, a través de modelos cinéticos de superficie variable, los cambios provocados por su almacenamiento a 40°C y humedad del 75%, condiciones características del clima subtropical de la región NE de nuestro país.

Los resultados alcanzados en el estudio de estabilidad acelerado de comprimidos de ibuprofeno de PLAMECOR indican que dichos comprimidos mantienen sus dosis de principio activo de acuerdo al rótulo, durante almacenamiento y transporte por un período de 6 meses en condiciones ambientales en el blíster en que son habitualmente envasados, aún en temperaturas estivales, siempre que estén guardados en lugar seco. Sin embargo, deben evitarse condiciones de humedad elevada, que si bien no inactivan al ibuprofeno, retardan considerablemente su disolución en los estadíos iniciales, situación que de replicarse *in vivo*, podría llevar a una demora en producir el efecto analgésico en el paciente.

6.6 EXPERIMENTAL 10 FOTÓLISIS DEL DICLOFENAC EN PRESENCIA DE EXCIPIENTES

Los ensayos del siguiente trabajo fueron desarrollados por Daniel Lotero Polesel, en el marco de una beca de pregrado, con la dirección del Dr. Delfino y mi Co-Dirección.

El diclofenac sódico es susceptible al estrés provocado por radiaciones UV. En el presente trabajo se estudió el comportamiento del diclofenac frente a la luz UV ($\lambda = 254$ nm) y la influencia de los excipientes que lo acompañan en la formulación de comprimidos. Esto tiene importancia en las áreas productivas, en las características que debe tener el envase primario, las precauciones que se deben tomar durante el control analítico de estos comprimidos y, finalmente, en la vida de anaquel y la conservación por parte del paciente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras y reactivos

Se utilizó diclofenac principio activo lote N°20010321, origen China (99,99% pureza) y diclofenac comprimidos 50 mg lote N°103/12, provistos por

PLAMECOR. Se preparó una muestra a partir de 18 unidades cuyo peso promedio fue de 274,5 mg.

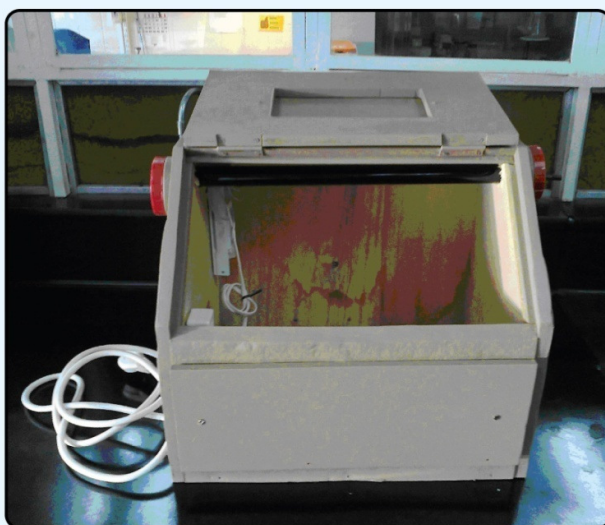
El placebo utilizado también fue provisto por PLAMECOR, y su composición es la misma presente en los comprimidos: estearato de magnesio 1%, talco 2%, almidón glicolato de sodio 3,5%, polivinilpirrolidona (PVP) 1,2%, precompactado verde 73,2%.

Equipamiento

Cámara de irradiación provista de una lámpara de mercurio UVP, modelo UVGL-58, con vidrio Wood, de 6 Watts de potencia, emitiendo a 254 nm. Ortoédrica de 30 x 25 x 20 cm (Figura 68).

Espectrofotómetro Boeco S-26 UV-visible con barrido.

FIGURA 68. Cámara de irradiación



Procedimiento

Se introdujeron en la cámara de irradiación dos placas de Petri de 9 cm de diámetro conteniendo 15 mL de la solución acuosa de diclofenac a estudiar. Una de ellas cubierta con una hoja de aluminio sirvió de control. A tiempo cero se encendió la lámpara UV, ubicada a una distancia fija de 15 cm de la superficie del líquido. Transcurrido el periodo establecido, se extrajeron las muestras de la cámara, y fueron envueltas en papel de aluminio hasta su análisis. Se centrifugó y se efectuó la dilución adecuada para la lectura espectrofotométrica.

Se ensayaron soluciones de 3,75; 7,5; 11,25 y 15 mg/L de diclofenac principio activo, e iguales concentraciones de soluciones de comprimido. Se efectuó el monitoreo espectrofotométrico a los 0; 5; 10; 15 y 20 min de exposición a la radiación.

Se analizó la influencia del pH, trabajando a valores de entre 7 y 10,5.

Se efectuaron lecturas espectrofotométricas con placebo para verificar la especificidad del método y con soluciones de distintas concentraciones del ingrediente activo para determinar linealidad y rango lineal aplicando regresión por cuadrados mínimos.

RESULTADOS

Selección de la longitud de onda de trabajo

Barriendo el espectro de absorción de soluciones de diclofenac sin exposición a la luz UV (control) y soluciones expuestas a dicha radiación (tratado) se observó que la longitud de onda donde se produce la máxima variación por incremento de la absorbancia es a 244 nm, la cual fue seleccionada como longitud de onda de trabajo, para el seguimiento de la degradación en el tiempo (Figura 69).

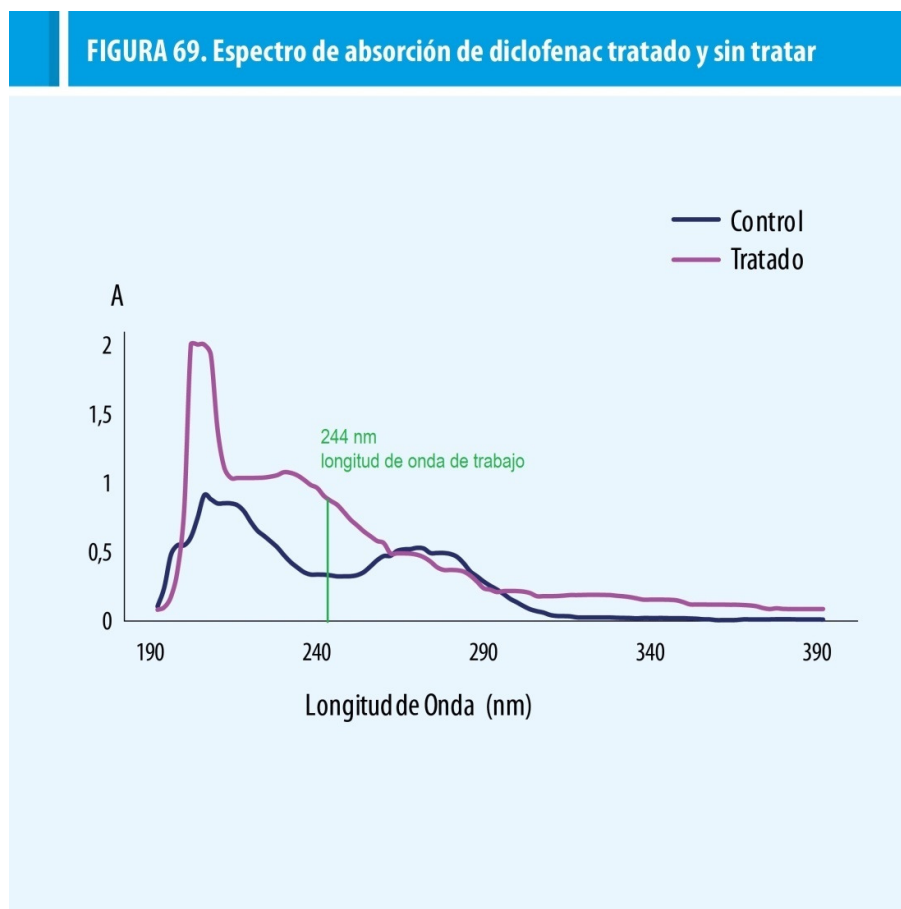


Figura 69: Absorbancia vs longitud de onda. Se señala la longitud de onda de trabajo

Selección del pH de trabajo

Con el objeto de conocer la influencia del pH en la reacción de fotólisis y seleccionar el pH de trabajo, teniendo en cuenta el carácter ácido de la molécula, se procesaron soluciones de 15 mg/L de diclofenac ajustadas a pH inicial 7; 9 y 10,5 (Figura 70).

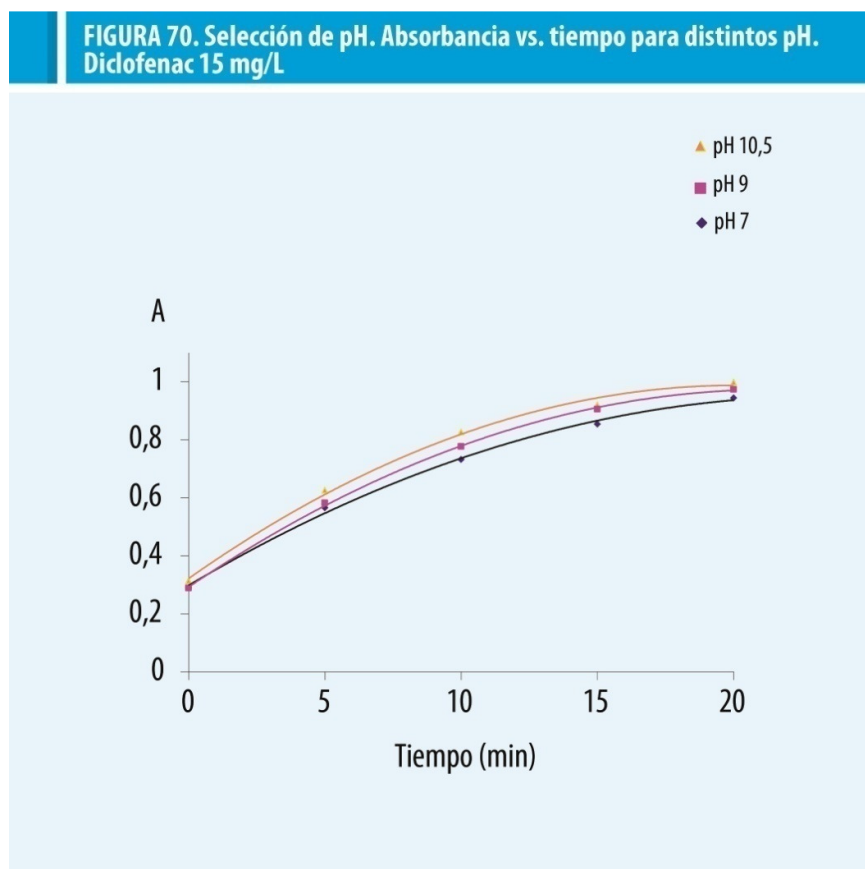


Figura 70: Absorbancia vs. tiempo de irradiación para pH 7, 9 y 10,5. Se trabajó con una solución de diclofenac principio activo 15 mg/L

Del análisis de las curvas para distintos tiempos de exposición a la luz UV se desprende que la máxima variación de la absorbancia con el pH no alcanza el 3%, por lo que se seleccionó el pH = 9 para las experiencias cinéticas posteriores.

Influencia de la Concentración inicial

La Figura 71 muestra la variación de la absorbancia a 244 nm con el tiempo de exposición a la luz UV, de soluciones de distinta concentración inicial de diclofenac, principio activo, a pH =9. La Figura 72 corresponde al mismo tratamiento para una mezcla homogénea de comprimidos.

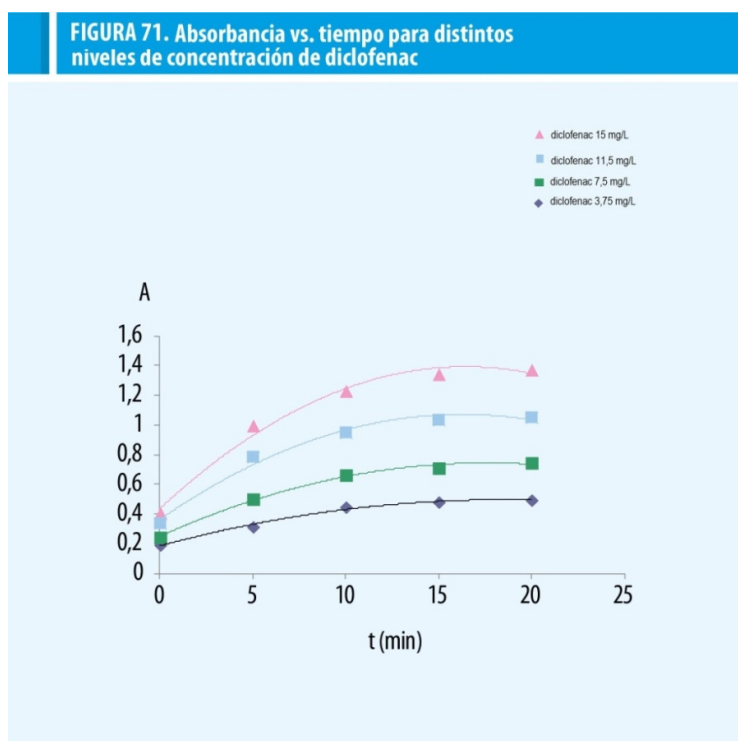


Figura 71: Absorbancia vs. tiempo de irradiación, para principio activo

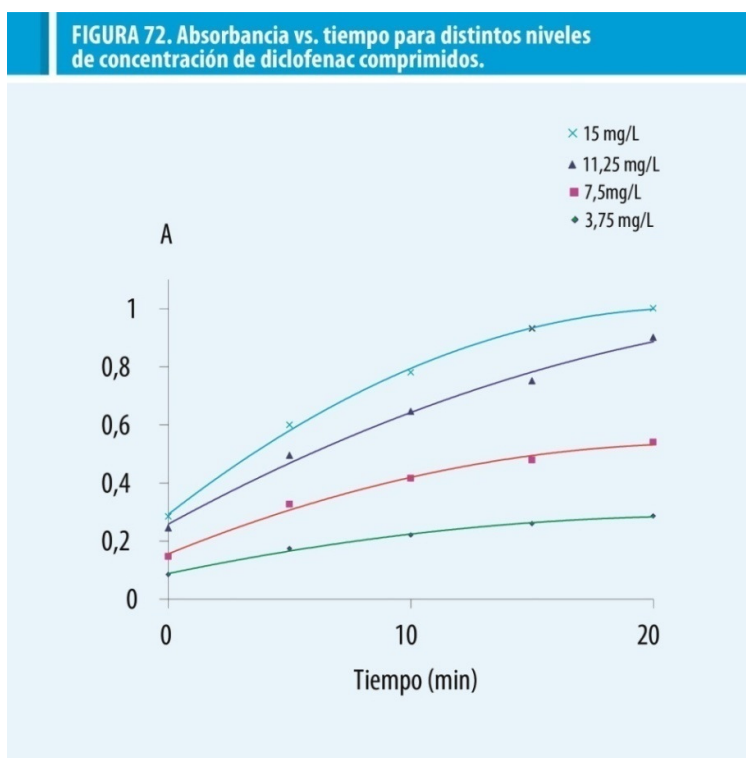


Figura 72: Absorbancia vs tiempo de irradiación, para soluciones de diclofenac comprimidos

Los datos cinéticos de absorbancia vs. tiempo de tratamiento, correspondientes a la fotodegradación del diclofenac, fueron procesados aplicando el método diferencial. Se graficaron las pendientes iniciales en función de la concentración de partida, obteniéndose la relación: $[\Delta A/\Delta t = 0,0076 C_{\text{diclofenac}} + 0,0014]$ con $R^2 = 0,9973$ para el principio activo y $[\Delta A/\Delta t = 0,0042 C_{\text{diclofenac}} + 0,0007]$ con $R^2 = 0,9951$ para las soluciones de comprimidos (Figura 73).

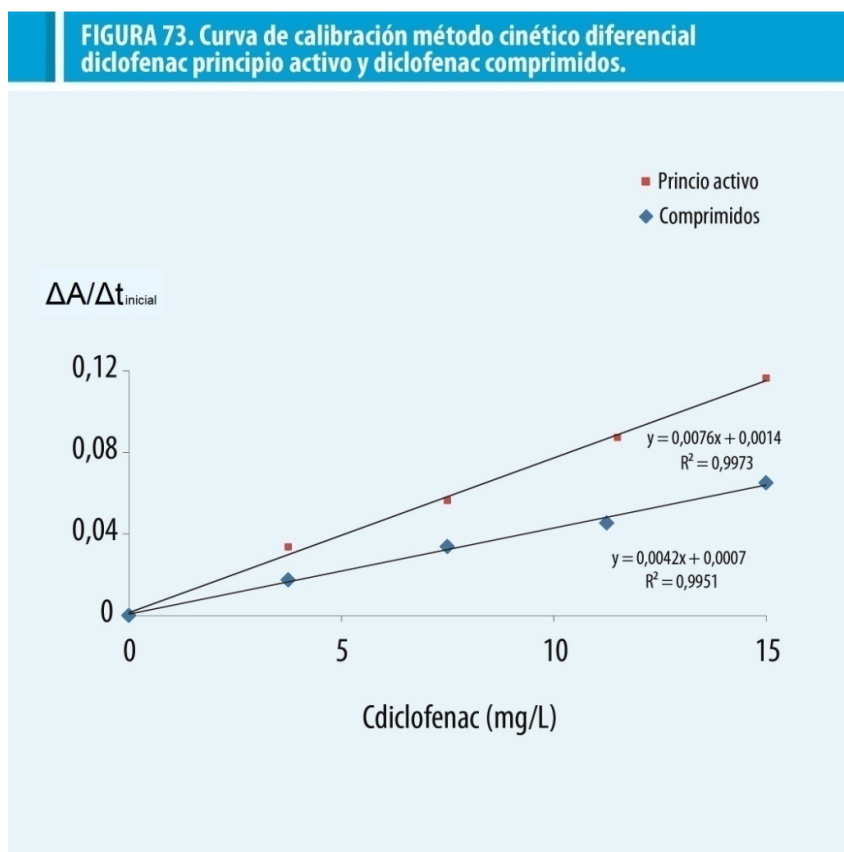


Figura 73: Pendiente inicial ($\Delta A/\Delta t$) vs concentración inicial de diclofenac principio activo y diclofenac comprimidos.

En la figura 73 se observa una disminución considerable de la pendiente inicial $\Delta A/\Delta t$ en la cinética correspondiente a los comprimidos, comparada con la del monitoreo del principio activo solo. Para verificar este efecto, se efectuaron corridas de fotólisis con soluciones de principio activo solo, principio activo más un excipiente y finalmente del excipiente sólo. Este monitoreo se efectuó con los componentes mayoritarios que acompañan al ingrediente activo en la formulación del comprimido: precompactado verde y almidón glicolato de sodio. En ambos casos se comprobó la inercia del excipiente respecto de la luz UV de 254 nm y la disminución de la absorbancia cuando estos compuestos acompañan al principio activo. La figura 74 muestra el efecto descrito para el precompactado verde.

FIGURA 74. Efecto protector del precompactado verde.

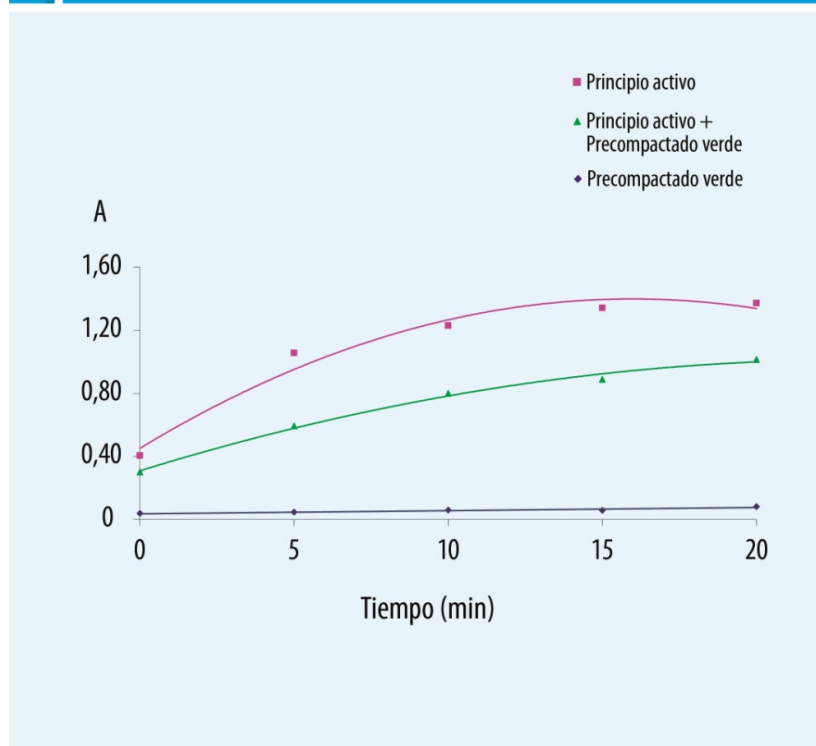


Figura 74: Absorbancia vs. tiempo de exposición para: principio activo solo; precompactado verde solo y principio activo con precompactado verde

CONCLUSIONES

Las soluciones acuosas a pH 9, de diclofenac sódico, tanto del principio activo como de los comprimidos, experimentan una reacción de fotólisis cuando son sometidas a la acción de la luz UV de 254 nm. Esto se pone de manifiesto a través de los cambios en el espectro de absorción, registrándose el máximo aumento de la absorbancia para 244 nm. Los cambios en el pH tienen poca influencia en el grado de degradación del ingrediente activo, siempre y cuando se trabaje en un medio alcalino, lo que favorece la solubilidad del diclofenac.

La cinética de la fotólisis se ajusta al método diferencial, presentando una relación lineal entre las pendientes iniciales de las curvas de absorbancia vs. Tiempo, en función de la concentración inicial de diclofenac.

Los excipientes que acompañan al diclofenac en la formulación del comprimido, disminuyen sensiblemente la velocidad de degradación del ingrediente activo frente a la luz UV.

7. CONCLUSIONES GENERALES

Los AINE han sido tratados de diferentes maneras y formas en los desarrollos experimentales expuestos: frente a reactivos que posibilitan su cuantificación; en situaciones de estrés que permiten su caracterización y establecimiento de criterios de estabilidad; métodos instrumentales distintos a la espectrofotometría para el seguimiento y modelaje de las curvas de disolución.

Estas técnicas aplicadas al ibuprofeno, diclofenac y paracetamol, cuyos desarrollos y alcances fueron abarcados en esta tesis, amplían suficientemente el espectro de ensayos a los que pueden ser sometidas estas especies con el fin de ganar confianza en sus cualidades farmacéuticas.

Estas aplicaciones, no encontradas en la bibliografía especializada y llevadas a la farmacoquímica, son condensadas en lo siguiente:

- 1) Método espectrofotométrico para cuantificación de diclofenac, basado en la reacción redox que ocurre entre el diclofenac y el hierro, en presencia de o- fenantrolina.
- 2) Método cinético espectrofotométrico de tiempo fijo por diazotación con bencidina, como reactivo azoico para la cuantificación de paracetamol.
- 3) Método cinético espectrofotométrico para cuantificación de diclofenac, utilizando KMnO_4 en medio ácido.
- 4) Culombimetría de paracetamol con Br_2 electrogenerado.
- 5) Culombimetría de diclofenac con Cl_2 electrogenerado.
- 6) Titulación conductimétrica de paracetamol con NaOH , en presencia de NH_3 .

Cuentan con las ventajas de ser simples, rápidas y de bajo costo. Han demostrado ser específicas y lineales en los rangos estudiados y permiten la cuantificación de estos AINE sin procesos extractivos preliminares y por ello, de fácil automatización.

Se consideraron relevantes los parámetros analíticos de exactitud, precisión, reproducibilidad y robustez, los que se ajustan a los criterios de aceptabilidad establecidos para las técnicas de referencia y completan la validación de los métodos propuestos.

Complementan esta tesis los estudios farmacocinéticos de las drogas mencionadas:

- 7) Monitoreo del perfil de disolución de comprimidos de diclofenac por CE.
- 8) Estudio de estabilidad acelerado del paracetamol.
- 9) Estudio de estabilidad acelerado del ibuprofeno.
- 10) Fotólisis del diclofenac en presencia de excipientes.

Este conjunto de métodos desarrollados, si bien no agotan el espectro de reactividad de estos AINE, han alcanzado, en la mayoría de los casos, los parámetros de validación suficientes para su aplicación en el control de calidad de las formulaciones farmacéuticas que los contienen, lo cual constituye el objetivo primordial de esta tesis.

8. PUBLICACIONES GENERADAS A PARTIR DE LA PRESENTE TESIS

1. **Monzón, C.M.; Sarno, M.C.; Delfino, M.R.** Diclofenac quantification: analytical attributes of a spectrophotometric method, *Lat. Am. J. Pharm.*, 2011, 30(5), 1001-1004.
2. **Monzón, C.M.; Sarno, M.C.; Delfino, M.R.** Kinetic spectrophotometric method for diclofenac quantification. *IOSR Journal of Pharmacy*, 2012, 5(2), 13-17.
3. **Monzón, C.M.; Vera-Candioti, L.; Delfino M.R.(h); Sarno, M.C.** Fast and efficient monitoring of diclofenac dissolution profile by CE. *Current Pharmaceutical Análisis*, 2014, 10(1), 38-43.
4. **Radovancich, O.D; Sarno, M.C.; Delfino, M.R.** Cuantificación de paracetamol en comprimidos por titulación conductimétrica. *Industria y Química*, 2007, 355, 47-50.

9. PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS

1. ESPECTROFOTOMETRÍA INDIRECTA DE DICLOFENAC CON O-FENANTROLINA

Autores: Monzón, C. M; Sarno, M.C.; Delfino, M.R.
V Congreso Argentino de Química Analítica
Bahía Blanca, Noviembre de 2009

2. DICLOFENAC – FERROÍNA. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN CON FINES CUANTITATIVOS

Autores: Monzón, C. M; Sarno, M.C.; Delfino, M.R.
Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE. Junio 2010
XXVIII Congreso Argentino de Química y 4to. Workshop de Química Medicinal.
Lanús, Septiembre de 2010

3. MÉTODO CINÉTICO PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE DICLOFENAC

Autores: Monzón, C. M; Sarno, M.C. y Delfino, M.R.
XXVII Congreso Argentino de Química
S. M. de Tucumán, Septiembre 2008.
Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE, Junio 2009.

4. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CINÉTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE DICLOFENAC EN COMPRIMIDOS FARMACÉUTICOS.

Autores: Monzón, C. M; Sarno, M.C.; Delfino, M.R.
VI Congreso Argentino de Química Analítica
Santa Fe, Septiembre de 2011
Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE, Julio 2011

5. LA CINÉTICA QUÍMICA EN LA CUANTIFICACIÓN DE PARACETAMOL EN FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

Autores: Popelka, E; Sarno, M.C.; Delfino, M.R.
Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE, Junio 2008.

6. CULOMBIMETRÍA DE PARACETAMOL A PARTIR DE COMPRIMIDOS FARMACÉUTICOS.

Autores: Popelka, E; Sarno, M.C.; Delfino, M.R.
XXVII Congreso Argentino de Química
Septiembre 2008. S. M. de Tucumán

Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE, Junio 2008.

7. **DICLOFENAC POR CULOMBIMETRÍA AMPEROSTÁTICA.**
Autores: Monzón, C. M; Sarno, M.C.; Delfino, M.R.
Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE, Junio 2009
V Congreso Argentino de Química Analítica
Bahía Blanca, Noviembre de 2009
8. **CUANTIFICACIÓN DE PARACETAMOL EN COMPRIMIDOS FARMACÉUTICOS POR CONDUCTIMETRÍA.**
Autores: Radovancich, O.D; Sarno, M.C.; Delfino, M.R.
XXVI Congreso Argentino de Química
San Luis, 2006.
Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE, 2006
9. **SEGUIMIENTO DEL PERFIL DE DISOLUCIÓN DE DICLOFENAC POR ELECTROFORESIS CAPILAR**
Autores: Monzón, C. M; Vera-Candioti, L.; Sarno, M.C.; Delfino, M.R (h).
VII Congreso Argentino de Química Analítica
Mendoza, 2013
Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE, Junio 2013
10. **PERFIL DE DISOLUCIÓN DE COMPRIMIDOS GENÉRICOS DE PARACETAMOL SOMETIDOS A UN ESTUDIO ACELERADO DE ESTABILIDAD**
Autores: Maciel, I.M; Sarno, M.C.; Delfino, M.R.
VI Congreso Argentino de Química Analítica
Santa Fe, Septiembre de 2011
Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE, Julio 2011
11. **CINÉTICA DE DISOLUCIÓN DE COMPRIMIDOS GENÉRICOS DE PARACETAMOL ALMACENADOS EN CONDICIONES DE ESTRÉS**
Autores: Maciel, I.M; Sarno, M.C.; Delfino, M.R.
Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE, Junio de 2012
12. **DISOLUCIÓN DE COMPRIMIDOS GENÉRICOS DE IBUPROFENO ALMACENADOS EN CONDICIONES DE ESTRÉS. PRIMERA ETAPA.**
Autores: Castro, M.C; Delfino, M.R; Sarno, M.C..
Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE, Junio de 2013
13. **DEGRADACIÓN FOTOLÍTICA DE DICLOFENAC SÓDICO**
Autores: Lotero, Daniel G; Monzón, C. M; Sarno, M.C.; Delfino, M.R.
XIX Congreso Argentino de Química,
Mar del Plata. Octubre de 2012
Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE, Junio 2012

10. BIBLIOGRAFÍA

Agatonović-Kuštrin S, Živanović L, Zečević M, Radulović D, 1997 Spectrophotometric study of diclofenac-Fe(III) complex, *J Pharmaceut Biomed.*, 16(1), 147-153.

Aguilar Ros A, Caamaño Somoza M, Martin-Martin F.R, Montejo Rubio M.C, 2008. *Biofarmacia y Farmacocinética*. 1ra. ed; Elsevier: Barcelona.

American Society of Health – System Pharmacist (AHFS) [Internet]. Bethesda: National Library of Medicine; 2008. [actualizado 01-04-2010; consultado 12-06-2013]. Disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginformation.html>

Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR, 1995. A theoretical basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*, 3(12), 413-420.

Arcelloni C, Lanzi R, Pedercini S, Molteni G, Fermo I, Pontirolic A, 2001. High-performance liquid chromatographic determination of diclofenac in human plasma after solid-phase extraction, *J Chromatogr B*. 763(1), 195–200.

Atkins P, Jones L, 2009. *Principios de Química*. 3ra. Ed; Editorial Médica Panamericana: Buenos Aires.

Aurora-Prado M.S, Steppe M, Tavares M, Kedor-Hackmann E, Santoro M, 2002. Comparison between Capillary Electrophoresis and Liquid Chromatography for the determination of diclofenac sodium in a pharmaceutical tablet. *J.AOAC Int.*, 85(2), 333-340.

Avery, H.E, 2002. *Cinética Química Básica y mecanismos de reacción*; Editorial Reverté: Madrid.

Baccarin M, Evangelista R, Lucinda-Silva R, 2006. Ethylcellulose microspheres containing sodium diclofenac: development and characterization, *Acta Farm. Bonaerense*. 25(2), 401- 404.

Barrow G, 1968. *Química Física*. 2da. edición; Editorial Reverté: México.

Blanco-Lopez MC, Fernandez-Llano L, Lobo-Castanon MJ, 2004. Potentiometric immunosensor using artificial antibody based on molecularly imprinted polymers, *Anal Lett*. 37(5), 915-927.

Boopathi M, Won M, Shim Y, 2004. A sensor for acetaminophen in a blood medium using a Cu(II)-conducting polymer complex modified electrode *Analytica Chimica Acta*, 2(512), 191- 197.

Ciapina EG, Santini AO, Weinert PL, Gotardo MA, Pezza HR, Pezza L, 2005. Spectrophotometric determination of diclofenac in pharmaceutical preparations assisted by microwave oven. *Eclet. Quím*, 1(30), 29-36.

Connors KA, 1982. *A textbook of Pharmaceutical Analysis*. 3rd. Ed; John Wiley & Sons Editorial: Michigan.

Cruz Vieira I, Omuro Lupetti K, Fatibello-Filho O, 2003. Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (*Cucurbita pepo*) *Quim. Nova*, 1(26), 39-43.

De Souza R, Tubino M, 2005. Spectrophotometric determination of diclofenac in pharmaceutical preparations, *J. Braz. Chem. Soc.*, 16(5), 1068-1073.

Dos Santos L, Guterres S, Bergold A, 2007. Caracterização e qualificação de diclofenaco de sódio como padrão secundário, *Lat. Am. J. Pharm.*, 26(3), 355-361.

El-Didamony AM, Amin AS, 2004. Adaptation of a color reaction for spectrophotometric determination of diclofenac sodium and piroxicam in pure form and in pharmaceutical formulations. *Analytical letters*, 6(37), 1151-1162.

Ercolano I, Pizzorno MT, Vidal M, 2010. *Estabilidad de drogas y medicamentos*. 3ra. Ed; Ediciones VR S.A: Buenos Aires.

Erk N, Ozkan Y, Banoglu E, Ozkan SA, Senturk Z, 2001. Simultaneous determination of paracetamol and methocarbamol in tablets by ratio spectra derivative spectrophotometry and LC. *J. Pharm. Biomed. Anal*, 3(24), 469–475.

Farmacopea Nacional Argentina, 2011. 8va edición. ANMAT.

Flores J, 1997. *Farmacología humana*. 3ra. Edición; Masson SA: Barcelona.

Gasco López AI, Izquierdo-Hornillos R, Jiménez A, 1999. LC method development for ibuprofen and validation in different pharmaceuticals. *J. Pharm. Biomed. Ana*, 21, 143-149.

Gennaro AR, 2003. *Remington Farmacia*, 20 ed; Ed. Médica Panamericana: Buenos Aires.

Hammerly JA, Marracino JM, Piagentini RO, 1984. *Curso de Química Analítica*, 1ra.ed; El Ateneo: Buenos Aires.

Harris DC, 2009. *Análisis Químico Cuantitativo*, 3ra ed; Ed. Reverté: Barcelona.

Handbook of Chemistry and Physics, 2005. 85va. Edición; CRC Press: Florida.

Haywood A, Mangan M, Glass B, 2006. Stability implications of repackaging paracetamol tablets into dose administration aids. *Journal of Pharmacy Practice and Research*, 1(36), 25-28.

ICH (Conferencia Internacional sobre Armonización), 1993. *Stability testing of new drug substances and products*. Harmonised tripartite guideline, Suiza.

Jiménez Cerezo MJ, Silgado Arellano R, Ferrari Piquero JM, Herreros de Tejada, Lopez Coterilla A, 2006. Fotosensibilidad asociada a medicamentos: una reacción adversa frecuente y poco conocida. *Revista de la OFIL*, 1(16), 61–70.

Kuhlmann O, Stoldt G, Struck HG, Krauss GJ, 1998. Simultaneous determination of diclofenac and oxybuprocaine in human aqueous humor with HPLC and electrochemical detection, *J Pharmaceut Biomed.*, 17(8), 1351–1356.

Kumar N, Sangeetha D, Reddy PS, Reddy AM, 2012. Development and Validation of a Dissolution Test for Delayed Release Capsule Formulation of Duloxetine Hydrochloride. *Curr Pharm Anal*, 8(3), 236-246.

Lachmann B, Kratzel M, Noe CR, 2012. Rapid determination of diclofenac in pharmaceutical formulations by capillary zone electrophoresis. *Sci Pharm.*, 80(2), 311-316.

Ley Nº 25649, 2002. Ley de Especialidades Medicinales. Congreso de la Nación Argentina. Septiembre.

Ley Nº 26688, 2011. Ley de Producción Pública de Medicamentos y Vacunas (PPMV). Congreso de la Nación Argentina. Julio.

Li M, Jing L, 2007. Electrochemical behavior of acetaminophen and its detection on the PANI–MWCNTs composite modified electrode. *Electrochimica Acta*, 9(52), 3250- 3257.

Logan SR, 2000. *Fundamentos de Cinética Química*. Editorial Addison Wesley: Madrid.

Lorenzo P, Moreno A, Leza JC, Lizasoain I, Moro MA, 2005. *Farmacología Básica y Clínica*, 17 ed; Médica Panamericana: España.

Ma S, Zhu MM, 2009. Recent advances in applications of liquid chromatography–tandem mass spectrometry to the analysis of reactive drug metabolites, *Chem-Biol Interact.*, 179(1), 25-37.

Macia A, Borrull F, Calull M, Aguilar C, 2007. Capillary electrophoresis for the analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Trends in Anal. Chem.*, 26(2), 133-153.

Mayer BX, Namiranian K, Dehghanyar P, Stroh R, Mascher H, Müller M, 2003. Comparison of UV and tandem mass spectrometric detection for the high-

performance liquid chromatographic determination of diclofenac in microdialysis samples, *J Pharmaceut Biomed.*, 33(4), 745-754.

Miller JC, Miller JN, 2000. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, 1ra. ed; Pearson-Prentice Hall: Madrid.

Mojtaba S, Fíame J, Sohrab E, 2005. Preparation of a diclofenac potentiometric sensor and its application to pharmaceutical analysis and to drug recovery from biological fluids, *J Pharmaceut Biomed.*, 37(5), 943–947.

Moore JW, Flanner HH, 1996. Mathematical comparison of dissolution profiles. *Pharmaceutical Technology*, 20(6), 64-74.

Mostafa N, 2010. Stability indicating method for the determination of paracetamol in its pharmaceutical preparations by TLC densitometric method. *Journal of Saudi Chemical Society*, 4(14), 341–344.

Moynihan H, Crean A, 2009. *The Physicochemical basis of pharmaceuticals*. Oxford University Press: New York.

Olivera M, Allemandi D, Manzo R, 2003. Equivalencia farmacéutica en comprimidos recubiertos de diclofenac sódico, *Acta Farm. Bonaerense*, 22(2), 143-146.

Operto M, Castellano P, Kaufman T, 2004. Evaluación y análisis de parámetros de calidad de comprimidos de paracetamol. *Latin American Journal of Pharmacy*, 4(27), 603-607.

Organización Mundial de la Salud (OMS), 2008. Office de las Naciones Unidas Alto Comisionado para los Derechos Humanos (OACDH). Folleto informativo N°31 “*El derecho a la salud*”. Ginebra.

Organización Panamericana de la Salud (OPS), 2011. “*Guía para la implementación de estrategias de medicamentos genéricos en los países de América Latina y el Caribe como mecanismo para mejorar el acceso a medicamentos*”. (Documento N° 3 Serie Técnica de Medicamentos Esenciales, Políticas Farmacéuticas) Washington, DC.

Ostrowski M, Baczek T, 2010. The Progress on the *In Vivo-In Vitro* Correlation (IVIVC) for Immediate Release Dosage Form as an Alternative to Bioavailability Studies. *Curr Pharm Anal.*, 6(4), 289-298.

Page C, Curtis M, Sutter M, Walker M, Hoffman B, 2008. *Farmacología Integrada*. Harcourt: Madrid.

Ravina M, Campanella L, Kiwi J, 2002. Accelerated mineralization of the drug Diclofenac via Fenton reactions in a concentric photo-reactor. *Water Research*, 36(1), 3555-3560.

Rezende Schaffazick S, Raffin Pohlmann A, De Lucca Freitas L, Stanisçuaski Guterres S, 2002. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. *Acta Farm. Bonaerense*, 21(2), 99-106.

Rivas de López LC, 1983. Estabilidad de medicamentos: breves consideraciones generales y estudio particular de algunas drogas constituyentes de medicamentos. *Acta Farm. Bonaerense*, 2(1), 37-45.

Rubinson KA, Robinson JF, 2001. *Análisis Instrumental*, 1ra ed; Prentice Hall: Madrid.

Sánchez V, Carreño P, Castelletto M, 2001. Liberación y permeación de diclofenaco sódico desde matrices hidrofílicas. *Acta Farm. Bonaerense*, 20(2), 101- 104.

Sjokvist E, Nysrom C, Alden M, Caram-Lelham N, 1992. Physicochemical aspects of drug release. The effects of some ionic and non-ionic surfactants on properties of sparingly soluble drug in solid dispersions. *Int. J. Pharm. Sci*, 2(79), 123–133.

Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA, 2001. *Principios de Análisis Instrumental*, 5ta. Edición; Mc Graw Hill: Madrid.

Solangi AR, Memon SQ, Mallah A, Khuhawar MY, Bhanger MI, 2009. Development and implication of a capillary electrophoresis methodology for ciprofloxacin, paracetamol and diclofenac sodium in pharmaceutical formulations and simultaneously in human urine samples, *Biomed Chromatogr.*, 23(9), 1007-1013.

Stanisz B, 2003. Evaluation of stability of enalapril maleate in solid phase, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 31(2), 375-380.

Stopher D, McClean S, 1990. An improved method for the determination of distribution coefficients. *J. Pharm. Pharmacol*, 2(42), 144-152.

Taylor M, Reide P, 2007. *Lo esencial en Farmacología*, 1ra. Edición; Harcourt: Madrid.

USP (Pharmacopoeia of the United States of America), 2012. 36va edición. National Formulary, 31ra edición. (USP 36-NF 31).