

Facultad de Ciencias Médicas
Doctorado en Ciencias Biomédicas

Tesis de Doctorado

**DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE FORMAS
FARMACÉUTICAS LÍQUIDAS DE USO ORAL
PARA EL TRATAMIENTO DE CARDIOPATÍAS EN
PACIENTES PEDIÁTRICOS**

Presentada por Mauro Gaspar Morri

Rosario, Santa Fe, Argentina

-2022-

“Desarrollo y optimización de formas farmacéuticas líquidas de uso oral para el tratamiento de cardiopatías en pacientes pediátricos”

Mauro Gaspar Morri

Farmacéutico, Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biomédicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Planta Piloto de Producción de Medicamentos dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas y el Instituto de Química de Rosario, durante el período comprendido entre 2017 y 2022, bajo la dirección de la Dra. Silvana E. Vignaduzzo y la co-dirección del Dr. Darío Leonardi.

Tesista: Farm. Mauro G Morri

Directora Dra. Silvana E. Vignaduzzo.....

Co-director Dr. Darío Leonardi

“HAY COSAS QUE SE ENSEÑAN A OÍR Y QUE UNO SE ENSEÑA A OÍR DESDE LA PERSONA QUE
SE ENSEÑA A OÍR QUE SE LAS DIJERA. PERO NO SEAS COMO SORDO O COMO CIEGO OÍR LAS DE
AQUEL QUE LAS DICE DESDE SU CORAZÓN.”

“NO SIEMPRE ODEAMOS A LOS GRANDES COSAS, PERO SÍ ODEAMOS A LOS PEQUEÑOS
QUE OIGAN A ORAR”

MADRE TERESA DE CALCUTTA.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a mi Directora de tesis Silvana Vignaduzzo y a mi Co-Director de tesis Darío Leonardi, por el tiempo, el conocimiento y la paciencia que me brindaron desde el primer día, permitiendo expresarme libremente en cada una de las etapas recorridas.

A mi familia y amigos que siempre estuvieron y estarán en mis pensamientos con sus palabras y acciones, siendo un llamado a la reflexión constante para el crecimiento personal, recordando mis orígenes y lo esencial de la vida.

Quisiera agradecer también a las instituciones que contribuyeron al desarrollo de esta tesis y a las personas que trabajaron en colaboración: a todo el personal de la Planta Piloto y a quienes por diferentes motivos, nuevos desafíos o un merecido retiro, ya no se encuentran en el espacio. A ellos quisiera agradecer la experiencia y el conocimiento compartido, por acompañarme día a día en el camino de la investigación, permitiéndome poco a poco ir desarrollándome como profesional.

A la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario (UNR), que me formó como profesional Farmacéutico y al Doctorado de Ciencias Biomédicas de la Facultad Cs Médicas (UNR) que me dio la posibilidad de continuar con mi formación y especialización en esta alta casa de estudios.

A la Agencia Nacional de Laboratorios Públicos (ANLAP) por estar siempre presente brindando financiamiento y asesoramiento a los proyectos públicos de desarrollo y producción de medicamentos.

Al Laboratorio Industrial Farmacéutico (LIF-Santa Fe) y al Laboratorio de Especialidades Medicinales (LEM-Rosario) que mediante sus donaciones de materia prima permitieron dar los primeros pasos en esta tesis.

A todos ellos mi agradecimiento y reconocimiento.

Contenido

| | |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| Agradecimientos..... | 7 |
| Índice Figuras..... | 12 |
| Índice Tablas..... | 13 |
| Abreviaturas y Símbolos..... | 15 |
| Presentaciones en Reuniones Científicas | 19 |
| Publicaciones en Revistas Internacionales..... | 21 |
| RESUMEN | 23 |
| CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN..... | 27 |
| 1. Introducción..... | 29 |
| 1.1 El paciente pediátrico | 29 |
| 1.2 Medicamentos para pacientes pediátricos | 32 |
| 1.3 Contexto histórico..... | 33 |
| 1.4 Marco legal..... | 33 |
| 1.5 El factor económico | 35 |
| 1.6 Avance real o panacea | 36 |
| 1.7 Adaptación de fórmulas de adultos..... | 36 |
| 1.8 Medicamentos tamaño niños | 37 |
| 1.9 Trabajos previos y selección de IFAs | 38 |
| 1.9.1 Atenolol | 39 |
| 1.9.2 Citrato de Sildenafil | 40 |
| 1.9.3 Hidroclorotiazida..... | 40 |
| 1.9.4 Furosemida | 41 |
| 1.9.5 Maleato de Enalapril..... | 42 |
| 1.10 Diferencias entre los tratamientos para adultos y pediátricos | 43 |
| 1.11 Formas farmacéuticas | 43 |
| 1.11.1 Tecnología del desarrollo | 44 |
| 1.11.2 Formas farmacéuticas líquidas orales | 44 |
| 1.12 Control de calidad..... | 46 |
| 1.13 Estudios de estabilidad..... | 48 |
| 1.13.1 Estudios de estabilidad químico | 48 |
| 1.13.2 Estudios de estabilidad microbiológica | 49 |
| 1.14 Diseño de experimentos | 49 |
| 1.14.1 Diseño Plackett-Burman | 51 |
| 1.14.2 Diseños factoriales completos | 52 |
| 1.14.3 Diseño Central Compuesto (DCC)..... | 52 |

| | | |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.15 | Objetivo | 53 |
| 1.15.1 | Objetivo General..... | 53 |
| 1.15.2 | Objetivos Particulares | 53 |
| CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS | | 55 |
| 2. | Materiales y métodos..... | 57 |
| 2.1 | Equipamiento, Instrumental analítico y de apoyo | 57 |
| 2.1.1 | Espectroscopia de absorción electrónica..... | 57 |
| 2.1.2 | Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE)..... | 57 |
| 2.1.3 | Separaciones cromatográficas..... | 57 |
| 2.1.4 | Propiedades de apariencia física y medición de pH..... | 59 |
| 2.1.5 | Pesadas | 59 |
| 2.1.6 | Agitación y sonicación | 59 |
| 2.2 | Adquisición y procesamiento computacional de los datos cromatográficos y espectroscópicos | 59 |
| 2.2.1 | Espectros y cromatogramas | 59 |
| 2.2.2 | Gráficos | 60 |
| 2.3 | Ingredientes farmacéuticos activos y excipientes..... | 60 |
| 2.3.1 | Ingredientes farmacéuticos activos..... | 60 |
| 2.3.2 | Excipientes | 60 |
| 2.4 | Reactivos y soluciones buffer para cromatografía..... | 61 |
| 2.5 | Soluciones madre y de trabajo para CLAE | 61 |
| 2.6 | Reactivos, soluciones y diluciones de las formulaciones desarrolladas | 61 |
| 2.6.1 | Gotas de Atenolol | 61 |
| 2.6.2 | Gotas de Citrato de Sildenafil | 63 |
| 2.6.3 | Gotas de Hidroclorotiazida..... | 64 |
| 2.6.4 | Gotas de Furosemida | 65 |
| 2.6.5 | Gotas de Maleato de enalapril | 66 |
| CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | | 67 |
| Gotas de Atenolol | | 69 |
| 3.1 | Gotas de Atenolol | 71 |
| 3.1.1. | Etapa de screening..... | 72 |
| 3.1.2. | Etapa de optimización. Diseño empleado para la superficie de respuesta..... | 74 |
| 3.1.3. | Verificación experimental..... | 79 |
| 3.1.4. | Estudios de estabilidad microbiológica | 79 |
| 3.1.5. | Estudios de estabilidad química..... | 81 |
| 3.1.6. | Conclusiones | 85 |
| Gotas de Citrato de Sildenafil | | 87 |

| | | |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2 | Gotas de citrato de sildenafil..... | 89 |
| 3.2.1. | Diseño Plackett-Burman | 90 |
| 3.2.2. | Estudios de estabilidad química | 92 |
| 3.2.3. | Estudios de estabilidad microbiológica | 94 |
| 3.2.4. | Análisis del enmascaramiento del sabor..... | 96 |
| 3.2.5. | Conclusión..... | 98 |
| | Gotas de Hidroclorotiazida | 101 |
| 3.3 | Gotas De Hidroclorotiazida | 103 |
| 3.3.1 | Optimización de la solubilidad mediante Diseño Central Compuesto..... | 104 |
| 3.3.2 | Optimización. Metodología de superficie de respuesta | 107 |
| 3.3.3 | Determinación de productos de degradación en soluciones de HCT | 111 |
| 3.3.4 | Estudios de estabilidad microbiológica | 113 |
| 3.3.5 | Composición final optimizada de gotas de HCT..... | 114 |
| 3.3.6 | Conclusión..... | 114 |
| | Gotas de Furosemida | 117 |
| 3.4 | Gotas De Furosemida..... | 119 |
| 3.4.1 | Etapas de desarrollo | 121 |
| 3.4.2 | Determinación de FURO empleando espectroscopia UV | 127 |
| 3.4.3 | Estudio de estabilidad microbiológica | 130 |
| 3.4.4 | Conclusiones | 131 |
| | Gotas Maleato de Enalapril | 133 |
| 3.5 | Gotas de Maleato de Enalapril..... | 135 |
| 3.5.1 | Estudios de estabilidad química. Influencia del pH final de la formulación .. | 137 |
| 3.5.2 | Estudios de estabilidad química. Influencia del tipo de agente antimicrobiano | 140 |
| 3.5.3 | Influencia de diferentes antimicrobianos en la recuperación del ENA | 141 |
| 3.5.4 | Estudio de estabilidad microbiológico | 154 |
| 3.5.5 | Conclusión..... | 155 |
| | CAPITULO 4 CONCLUSIONES | 157 |
| | Gotas de atenolol | 159 |
| | Gotas de Citrato de Sildenafil | 159 |
| | Gotas de Hidroclorotiazida | 160 |
| | Gotas de Furosemida | 160 |
| | Gotas de Maleato de Enalapril | 161 |
| | Conclusión general..... | 162 |
| | Referencias bibliográficas..... | 163 |
| | ANEXO..... | 173 |

Índice Figuras

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1.9.1 Estructura química Atenolol | 39 |
| Figura 1.9.2 Estructura química de Citrato de sildenafil | 40 |
| Figura 1.9.3 Estructura química de Hidroclorotiazida | 41 |
| Figura 1.9.4 Estructura química de la furosemida | 42 |
| Figura 1.9.5 Estructura química del Maleato de enalapril | 42 |
| Figura 1.14.1 Esquema del Diseño Central Compuesto | 52 |
| Figura 3.1.1 Gráficos de superficie de respuesta para la función de deseabilidad global, ATN-R (%) - 40°C y T (%) en función de los factores de influencia | 77 |
| Figura 3.1.2 Cromatogramas correspondientes a las tres formulaciones desarrolladas, a los seis meses de su elaboración. | 83 |
| Figura 3.2.1 Amargor del citrato de sildenafil | 97 |
| Figura 3.3.1 Deseabilidad en función de los diferentes factores..... | 108 |
| Figura 3.3.2 Estructura química de HCT y sus productos de degradación. PD-1: 4-amino-6-clorobenceno-1,3-disulfonamida; PD-2: clorotiazida | 112 |
| Figura 3.3.3 Cromatogramas a los 6 meses en las 3 condiciones de almacenamiento de la formulación F3B. PD: producto de degradación, 4-amino-6-clorobenceno-1,3-disulfonamida | 112 |
| Figura 3.5.1 Estructura química de Enalaprilat (A) y Dicotopiperazina (B) | 136 |
| Figura 3.5.2 Estructuras químicas de los agentes antimicrobianos | 140 |
| Figura 3.5.3 Cromatogramas correspondientes a las formulaciones disueltas en buffer citrato pHs 2, 3 y 4, con el agregado de metil y propilparabeno como agentes conservantes. . | 142 |
| Figura 3.5.4 Cromatogramas correspondientes a las formulaciones disueltas en buffer fosfato pHs 2, 3 y 4, con el agregado de metil y propilparabeno como agentes conservantes..... | 144 |
| Figura 3.5.5 Cromatogramas de la formulación elaborada con agua a 4 y 25°C. | 145 |
| Figura 3.5.6 Cromatogramas de las formulaciones conservadas en heladera preparadas con buffer citrato a pH 2, 3 y 4 y benzoato de sodio como agente conservante. | 147 |
| Figura 3.5.7 Cromatogramas correspondientes a las formulaciones elaboradas con buffer fosfato a pH 2, 3 y 4, conservadas en heladera, empleando benzoato de sodio como agente conservante..... | 148 |
| Figura 3.5.8 Cromatograma de la formulación preparada en agua y almacenada en heladera. | 149 |
| Figura 3.5.9 Cromatogramas de las formulaciones de enalapril elaboradas con buffer citrato y con propionato de calcio, almacenadas en heladera. | 151 |
| Figura 3.5.10 Cromatogramas de las formulaciones de enalapril, preparadas con buffer fosfato a pH 2, 3 y 4, almacenadas en heladera, empleando propionato de calcio como agente | 152 |
| Figura 3.5.11 Formulación de enalapril en agua, con benzoato almacenada en cámara ... | 153 |
| Figura 3.5.12 Formulación de enalapril en buffer fosfato, pH2, empleando propionato de calcio como agente conservante y almacenada en cámara..... | 154 |

Índice Tablas

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabla 1.10.1 Dosis recomendadas en pediatría y adultos..... | 43 |
| Tabla 1.13.1 Condiciones de los estudios de larga duración y acelerados..... | 48 |
| Tabla 1.14.1 Diseños experimentales más empleados y su aplicación general | 51 |
| Tabla 2.6.1 Diseño Plackett-Burman para la selección de factores gotas de ATN | 62 |
| Tabla 2.6.2 Diseño Plackett-Burman para la selección de factores gotas de SIL | 63 |
| Tabla 3.1.1 Diseño Plackett-Burman para la selección de factores..... | 72 |
| Tabla 3.1.2 Valores de p obtenidos para los diferentes factores en las tres respuestas..... | 74 |
| Tabla 3.1.3 Diseño central compuesto usado para la optimización de las respuestas | 75 |
| Tabla 3.1.4 Verificación experimental | 79 |
| Tabla 3.1.5 Estudios microbiológicos durante el almacenamiento de las preparaciones en diferentes las condiciones | 80 |
| Tabla 3.1.6 Estudios de estabilidad acelerados y a largo plazo. | 82 |
| Tabla 3.1.7 Recuperaciones ATN en envase de polietileno de media densidad de F1 | 84 |
| Tabla 3.1.8 Resultados de las recuperaciones obtenidas de ATN en ambos envases..... | 85 |
| Tabla 3.2.1 Diseño Plackett-Burman. Composición y recuperación de SIL en las formulaciones..... | 90 |
| Tabla 3.2.2 Test ANOVA del diseño Plackett-Burman | 91 |
| Tabla 3.2.3 Recuperación de SIL (2 mg mL ⁻¹) después de 6 meses de almacenamiento. ... | 93 |
| Tabla 3.2.4 Recuperación de SIL (4 mg mL ⁻¹) después de 6 meses de almacenamiento ... | 94 |
| Tabla 3.2.5 Conteo de microorganismos en las diferentes formulaciones de SIL (2 mg mL ⁻¹) y condiciones de almacenamiento..... | 95 |
| Tabla 3.2.6 Conteo de microorganismos en las diferentes formulaciones de SIL (4 mg mL ⁻¹) y condiciones de almacenamiento..... | 96 |
| Tabla 3.3.1 Variables experimentales y sus niveles en el Diseño Central Compuesto | 105 |
| Tabla 3.3.2 Análisis de la varianza (ANOVA) para la recuperación (%) de HCT | 106 |
| Tabla 3.3.3 Composición final de las formulaciones optimizadas aplicando metodología de superficie de respuesta | 109 |
| Tabla 3.3.4 Composición de las formulaciones optimizadas conteniendo HPMC..... | 110 |
| Tabla 3.3.5 Resultados de los estudios de estabilidad química de HCT | 111 |
| Tabla 3.3.6 Recuperaciones de HCT y PD-1 a los 6 meses de elaboración en las formulaciones F3A y F3B. | 113 |
| Tabla 3.3.7 Resultado de la estabilidad microbiológica de las formulaciones 3A y 3B durante 12 meses de almacenamiento en condiciones normales y 6 en cámara de estabilidad. | 114 |
| Tabla 3.4.1 Resumen de las recuperaciones de FURO-B elaboradas por el procedimiento 1 hasta 6 meses en envases de vidrio color ámbar..... | 122 |
| Tabla 3.4.2 Resumen de las recuperaciones de FURO-B elaboradas por el procedimiento 1 hasta 6 meses en envases de polietileno de media densidad | 123 |
| Tabla 3.4.3 Valores de pH en las diferentes formulaciones elaboradas por el procedimiento 1 y almacenados en envases de vidrio color ámbar | 124 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabla 3.4.4 Valores de pH en las diferentes formulaciones elaboradas por el procedimiento 1 y almacenadas en envases de polietileno de media densidad..... | 124 |
| Tabla 3.4.5 Resumen de las recuperaciones de FURO-B elaboradas por el procedimiento 2 hasta 6 meses en envases de vidrio tipo III color ámbar | 125 |
| Tabla 3.4.6 Resumen de las recuperaciones de FURO-B elaboradas por el procedimiento 2 hasta 6 meses en envases de polietileno de media densidad | 126 |
| Tabla 3.4.7 Valores de pH en las diferentes formulaciones elaboradas por el procedimiento 2 y almacenadas en vidrio color ámbar | 126 |
| Tabla 3.4.8 Valores de pH en las diferentes formulaciones elaboradas por el procedimiento 2 y almacenadas en envases de polietileno de media densidad..... | 127 |
| Tabla 3.4.9 Recuperación de furosemida cuantificada por CLAE y UV elaboradas por el procedimiento 1..... | 129 |
| Tabla 3.4.10 Recuperación de furosemida cuantificada por CLAE y UV elaboradas por el procedimiento 2..... | 130 |
| Tabla 3.4.11 Conteo de microorganismos en las formulaciones de 5,07 mg/ml de FURO-B, en diferentes tipos de envases y condiciones de almacenamiento..... | 131 |
| Tabla 3.5.1 Recuperaciones de enalapril, enalaprilat y dicetopiperazina a los 6 meses y a 3 temperaturas empleado solución reguladora citrato | 138 |
| Tabla 3.5.2 . Recuperaciones de enalapril, enalaprilat y dicetopiperazina a los 6 meses y a 3 temperaturas empleado solución reguladora fosfato | 139 |
| Tabla 3.5.3 Recuperaciones de enalapril, enalaprilat y dicetopiperazina a los 6 meses y a 3 temperaturas en agua | 139 |
| Tabla 3.5.4 Recuperaciones de enalapril, enalaprilat y dicetopiperazina a los 6 meses y pH final empleando metil y propilparabeno en solución reguladora citrato | 141 |
| Tabla 3.5.5 Recuperaciones de enalapril, enalaprilat y dicetopiperazina a los 6 meses y pH final empleando metil y propilparabeno en solución reguladora fosfato | 143 |
| Tabla 3.5.6 Recuperaciones de enalapril, enalaprilat y dicetopiperazina a los 6 meses y pH final empleando metil y propilparabeno en agua como medio | 144 |
| Tabla 3.5.7 Recuperaciones de enalapril, enalaprilat y dicetopiperazina a los 6 meses y pH final empleando benzoato de sodio y solución reguladora citrato | 146 |
| Tabla 3.5.8 Recuperaciones de enalapril, enalaprilat y dicetopiperazina a los 6 meses y pH final empleando benzoato de sodio y solución reguladora fosfato | 147 |
| Tabla 3.5.9 Recuperación de enalapril, enalaprilat, dicetopiperazina a los 6 meses y pH final empleando benzoato de sodio y preparadas en agua como medio | 149 |
| Tabla 3.5.10 Recuperación de enalapril, enalaprilat, dicetopiperazina a los 6 meses y pH final empleando propionato de calcio y solución reguladora citrato | 150 |
| Tabla 3.5.11 Recuperación de enalapril, enalaprilat, dicetopiperazina a los 6 meses y pH final empleando propionato de calcio y buffer fosfato | 151 |
| Tabla 3.5.12 Recuperación de enalapril, enalaprilat, dicetopiperazina a los 6 meses y pH final empleando propionato de calcio y preparadas en agua como medio | 153 |
| Tabla 3.5.13 Resultados de los estudios de estabilidad microbiológica de las formulaciones optimizadas a los 6 meses de su elaboración..... | 155 |

Abreviaturas y Símbolos

| Abreviatura o símbolo | Significado |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------|
| ADME | absorción, distribución, metabolismo y excreción |
| ANMAT | Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica |
| ANOVA | Análisis de varianza (del inglés <i>analysis of variance</i>) |
| ATN | Atenolol |
| ATN-R | recuperación de ATN |
| ATN %(p/v) | concentración de ATN |
| AV | agente viscosizante |
| AV%(v/v): | concentración de agente viscosizante |
| BpH | pH de la solución buffer |
| BPCA | Ley sobre los Mejores Medicamentos de Uso Infantil |
| CA | Condición de almacenamiento |
| CIOMS | Consejo de las Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas |
| CLAE | Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia |
| CMAT | Conteo de microbios aerobios totales |
| CTHyL | Conteo total de hongos y levaduras |
| DCC | Diseño central compuesto |
| di | Respuesta individual |
| EEUU | Estados Unidos |
| Ec | Escherichia coli |
| EMA | Agencia Europea de Medicamentos |
| ENA | Maleato de enalapril |
| ENA-R | recuperación de ENA |
| F | Formulación |

| | |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FDA | Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (<i>del inglés Food and Drug Administration</i>) |
| FpH | Valor final de pH de la formulación |
| FURO | Furosemida |
| FURO-B | Furosemida base |
| g | Gramos |
| Gli | Glicerina |
| HCT | Hidroclorotiazida |
| HCT-R | recuperación de HCT |
| HPMC | Hidroxipropilmetilcelulosa |
| ICH | Conferencia Internacional de Armonización (<i>del inglés International Conference on Harmonization</i>) |
| IFA | Ingrediente farmacéutico activo |
| IUPAC | Unión Internacional de Química Pura y Aplicada |
| LEM | Laboratorio de Especialidades Medicinales |
| LIF | Laboratorio Industrial Farmacéutico |
| LOD | Límite de detección |
| LOQ | Límite de cuantificación |
| mg | Miligramos |
| min | Minutos |
| mL | Mililitros |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| PA | Pro-análisis |
| PDE-5 | Fosfodiesterasa tipo 5 |
| PEG 400 | Polietilenglicol 400 |
| PIP | Plan de Investigación Pediátrica |
| PPG | Propilenglicol |

| | |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| PPPM | Planta Piloto de Producción de Medicamentos |
| PREA | Ley de Equidad de Investigación Pediátrica |
| %p/v | Concentración porcentual peso en volumen |
| %p/p | Concentración porcentual peso en peso |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SIL | Citrato de sildenafil |
| SIL-R | recuperación de SIL |
| Sor | Sorbitol |
| T (%) | Transmitancia |
| T _r | Tiempo de retención |
| UE | Unión Europea |
| UFC | Unidades formadoras de colonias |
| USP | Farmacopea de los Estados Unidos (del inglés <i>United States Pharmacopeia</i>) |
| UV-VIS | Ultravioleta-Visible |

Presentaciones en Reuniones Científicas

M. Morri, L. Allegro, P.M. Castellano, S.E. Vignaduzzo, Silvana, “Desarrollo y optimización de gotas de atenolol para el tratamiento de cardiopatías en pacientes pediátricos”, XVIII Congreso y la XXXVI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, 5 y 6 de diciembre de 2016, UNR.

M. Morri, P. M. Castellano, S.E. Vignaduzzo, “Desarrollo y optimización de gotas de atenolol para el tratamiento de cardiopatías en pacientes pediátricos”. 4° Jornadas profesionales Farmacéuticas, FEFARA, 8 y 9 de Junio de 2017, Termas de Río Hondo, Santiago del estero.

M. Morri, P. M. Castellano, S.E. Vignaduzzo, “Desarrollo y optimización de gotas de hidroclorotiazida para el tratamiento de cardiopatías en pacientes pediátricos”, 9° Congreso Argentino de Química Analítica (AAQA) 7 al 10 de Noviembre de 2017, Río Cuarto.

M. Morri, P. M. Castellano, S.E. Vignaduzzo, “Desarrollo y optimización de gotas de atenolol aplicando diseño de experimentos”, XIX Congreso y la XXXVII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, 28 y 29 de Noviembre de 2017, Facultad de Ciencias Agrarias, Zavalla, UNR.

M. Morri, P. M. Castellano, S.E. Vignaduzzo, “Desarrollo y optimización de una solución oral de sildenafil apta para pacientes pediátricos” 1° Reunión conjunta, 5^{ta} Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas” (RICiFa), 50° Reunión anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE), San Luis, 14 al 16 de Noviembre de 2018.

M. Morri, P. M. Castellano, S.E. Vignaduzzo, “Desarrollo, optimización y estudios de estabilidad de gotas solución de hidroclorotiazida aplicando un diseño central compuesto”, 6^{tas} Jornadas Profesionales Farmacéuticas, Mar del Plata, Buenos Aires, 7 de Junio de 2019.

Publicaciones en Revistas Internacionales

First Development, Optimization, and Stability Control of a Pediatric Oral Atenolol Formulation. Mauro Morri, Patricia Castellano, Darío Leonardi, Silvana Vignaduzzo. *AAPS PharmSciTech*, 2018 May;19(4):1781-1788.

<https://doi.org/10.1208/s12249-018-0992-5>.

Orphan Formulations for Pediatric Use: Development and Stability Control of Two Sildenafil Citrate Solutions for the Treatment of Pulmonary Hypertension. Mauro Morri, Cecilia Casabonne, Darío Leonardi, and Silvana Vignaduzzo. *AAPS PharmSciTech*, 2020 July, 21:221.

<https://doi.org/10.1208/s12249-020-01768-z>.

RESUMEN

Introducción

Una gran cantidad de medicamentos han sido investigados y autorizados sólo para el tratamiento de pacientes adultos, sin embargo, ante la falta de formulaciones destinadas a niños y neonatos, los mismos son adaptados y administrados a este grupo de pacientes.

Para adaptar las dosis al peso corporal del paciente los medicamentos se modifican de forma rutinaria, por lo que la forma de dosificación se manipula. En estos casos, no es posible garantizar la estabilidad física, química y microbiológica de la formulación elaborada, como tampoco la uniformidad de las dosificaciones. Por tal motivo, es necesario fomentar el desarrollo de formulaciones adaptadas a las necesidades del paciente, que sean seguras, confiables y garanticen la adherencia al tratamiento. Por lo descrito anteriormente, esta Tesis propone el desarrollo y optimización de formas farmacéuticas líquidas de uso oral para el tratamiento de cardiopatías en pacientes pediátricos. Entre los ingredientes farmacéuticos activos para el tratamiento de cardiopatías se seleccionaron al atenolol, sildenafil, hidroclorotiazida, furosemida y enalapril. De todos los activos se desarrollaron gotas orales que pueden ser administradas a pacientes pediátricos.

Resultados

Se desarrollaron dos formulaciones conteniendo 2 mg mL^{-1} de atenolol. Estas formulaciones fueron almacenadas en envases de vidrio tipo III color ámbar y en envases de polietileno de media densidad, resultando estables química y microbiológicamente al menos 6 meses.

Se desarrollaron seis formulaciones líquidas conteniendo 2 y 4 mg mL^{-1} de citrato de sildenafil. Estas formulaciones resultaron ser estables química y microbiológicamente al menos 6 meses. Los estudios de palatabilidad realizados empleando leche como diluyente, indicaron que la dilución en leche permitía mejorar el sabor de estas formulaciones, lo que garantizaría la adherencia al tratamiento.

Se desarrollaron dos formulaciones líquidas conteniendo 2 mg mL⁻¹ de hidroclorotiazida, Estas formulaciones resultaron ser estables química y microbiológicamente al menos 6 meses.

Se desarrollaron formulaciones conteniendo 2, 5 y 14,7 mg de furosemida base, empleando dos procedimientos diferentes. Estas formulaciones fueron almacenadas en envases de vidrio tipo III color ámbar y en envases de polietileno de media densidad, resultando estables química y microbiológicamente al menos 6 meses. Por otro lado, se desarrolló y validó un método de espectrofotometría UV-VIS simple, rápido y sencillo para determinar el contenido de este IFA, siendo posible realizar su cuantificación sin necesidad de un tratamiento previo de la muestra.

Se prepararon gotas de 2 mg mL⁻¹ de maleato de enalapril. En una primera etapa, se evaluó la influencia del pH final de las formulaciones en la estabilidad química del maleato de enalapril. En una segunda etapa, se evaluó la influencia del tipo de agente conservante empleado para garantizar la estabilidad microbiológica de las formulaciones. Las formulaciones conservadas en heladera, empleando metil y propilparabeno, benzoato de sodio o propionato de calcio, preparadas con las soluciones buffer a todos los pH estudiados y la elaborada en agua, resultaron ser estables química y microbiológicamente al menos 6 meses.

Conclusiones

Se han desarrollado gotas destinadas al tratamiento de pacientes pediátricos con cardiopatías. Las gotas fueron formuladas con excipientes seguros y en dosis aprobadas para la población pediátrica. Finalmente, las formulaciones desarrolladas han demostrado ser estables química y microbiológicamente por al menos 6 meses.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1 El paciente pediátrico

La farmacología pediátrica es una ciencia que estudia los fármacos usados en pediatría y abarca aspectos relacionados con su acción, forma de administración, indicaciones terapéuticas y acciones tóxicas¹. A pesar de los avances en farmacología pediátrica ocurridos en los últimos años, los niños siguen siendo “huérfanos terapéuticos”, expresión utilizada en los años 60’ por el Dr. Harry Shirkey para referirse a la falta de recursos terapéuticos en esta población².

Los niños conforman una población única, con diferencias fisiológicas y de desarrollo definidas, con respecto a los adultos. Además, no son un grupo homogéneo, ya que estas mismas características son muy diferentes en distintos tramos de la edad pediátrica³. Entre los mencionados tramos podemos diferenciar: 1) Neonatos: es el recién nacido hasta la 4ª semana de vida; 2) Lactante: desde el mes de vida hasta los 2 años; 3) Preescolar: desde los 2 años hasta 6 años; 4) Escolar: desde los 6 años hasta los 12 años; y 5) Adolescente: desde los 12 años hasta los 18 años.

Adicionalmente, se debe tener presente que un paciente pediátrico no es un adulto pequeño, por lo tanto, ajustar la dosis proporcionalmente al peso o la superficie corporal del paciente puede ser un riesgo potencial para el mismo. Para disminuir tales riesgos, es necesario conocer la farmacocinética y la farmacodinamia en un organismo en constante desarrollo y maduración para una terapéutica efectiva, segura y racional⁴.

Particularmente más desafiante es el desarrollo de formulaciones pediátricas en comparación con las de los adultos, en gran parte debido a algunas diferencias en las funciones fisiológicas y demandas adicionales de esta población objetivo⁵. Para entender cómo el desarrollo afecta la farmacocinética de los medicamentos es necesario conocer la influencia de la edad pediátrica en los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME)

Absorción:

La absorción de un fármaco hacia el organismo depende en gran medida de la vía de administración. En pediatría la mayoría de los fármacos son administrados por vía oral, por lo que es necesario considerar cómo cambian distintos elementos de la absorción oral de acuerdo con la edad pediátrica^{6,7}.

- *Cambios en el pH intraluminal gástrico:* En los primeros momentos después del nacimiento se produce falta de ácido clorhídrico, que mantiene el pH estomacal en rangos de 6 a 7 y a los 2 años alcanza el valor adulto.
- *Vaciamiento gástrico más lento:* El vaciamiento es errático y prolongado durante el período neonatal, alcanzando los valores del adulto a los 6-8 meses. En muchos casos la velocidad de absorción de los medicamentos es más lenta en neonatos y lactantes que en niños más grandes, es decir que, para algunos medicamentos, mientras menor sea la edad del paciente, los tiempos necesarios para alcanzar niveles plasmáticos máximos van a ser más extensos.
- *Cambios en la flora bacteriana del intestino:* El tracto gastrointestinal es estéril durante la vida fetal y tras el nacimiento se produce la colonización bacteriana a las pocas horas de vida. La flora bacteriana metaboliza algunos fármacos y puede influir en su absorción; por ejemplo, los lactantes tienen problemas para biotransformar la digoxina a nivel intestinal, ya que su flora no está desarrollada completamente y recién en la adolescencia se alcanzan los niveles metabólicos del adulto.
- *Cambios en la función biliar:* Inmadurez en la función biliar, los fármacos liposolubles necesitan de los ácidos grasos para su absorción, lo que puede generar su disminución. Además, la inmadurez de la mucosa intestinal puede favorecer la permeabilidad y absorción.

Distribución:

Luego de que el fármaco ingresa a la sangre, una parte se une a proteínas y el resto circula en forma libre, esta última fracción es la que llega al sitio de acción donde se producirá el efecto farmacológico.

- *Contenido corporal de agua:* En niños pequeños el porcentaje de agua corporal total es muy elevado (hasta 90%); conforme crece, este valor va disminuyendo. Los fármacos hidrófilos precisan dosis mayores dado que el volumen de distribución es mayor para conseguir concentraciones terapéuticas.
- *Concentración de proteínas plasmáticas:* El grado de unión a proteína plasmática en neonatos está disminuida en parte debido a la baja concentración proteica. Esto se traduce en mayor porcentaje de fármaco libre, capaz de actuar sobre receptores incrementando el riesgo de toxicidad.
- *Permeabilidad de las membranas:* La permeabilidad de la barrera hematoencefálica en neonatos se considera mayor que en preescolares.

Metabolismo:

Los fármacos para ser eliminados del organismo deben ser transformados en compuestos más polares e hidrosolubles, los que llamamos metabolitos. El hígado es el principal órgano responsable del metabolismo de los fármacos. La maduración progresiva de las enzimas desde el nacimiento influye directamente en la capacidad metabólica. Hasta los dos meses de vida se recomienda administrar bajas dosis de fármacos debido a que la semivida de eliminación generalmente está prolongada.

Excreción:

La principal vía de excreción de fármacos es la renal. La filtración glomerular en los prematuros está disminuida y recién a los 2 años de vida se alcanzan tasas de filtración equivalentes a un adulto. Por otro lado, la secreción tubular está muy reducida al nacimiento y necesita al menos 1 año para madurar. Además, la reabsorción renal tiene un proceso de maduración que es gradual hasta la adolescencia⁴.

1.2 Medicamentos para pacientes pediátricos

Durante mucho tiempo, la investigación de medicamentos pediátricos se ha regido predominantemente por la extrapolación de conocimientos adquiridos en adultos sin realmente probar medicamentos en niños. La comprensión de los cambios fisiológicos dependientes de la edad y su impacto en la disposición de los medicamentos ha sido desconocida durante mucho tiempo y las actividades de investigación sistemáticas sólo surgieron en los últimos años^{8,9,10}.

Además, hay que tener en cuenta que los diferentes tramos etarios que abarca la población pediátrica requieren dosis muy distintas de un mismo ingrediente farmacéutico activo (IFA), debido no solo a la variación de peso, sino también a las diferencias en la farmacocinética y la farmacodinamia. Por lo tanto, cuando un medicamento se va a usar en distintos grupos de edad pediátrica, se necesita contar con una forma farmacéutica que permita distintas dosis y concentraciones para asegurar una dosificación fácil, exacta y segura⁴.

La vulnerabilidad de la población pediátrica dentro de la investigación clínica, las dificultades prácticas para reclutar pacientes pediátricos, la disminución del interés comercial, el aumento de los costos y un mayor riesgo de responsabilidad, siguieron siendo argumentos fundamentales para descuidar la investigación y el desarrollo de fármacos centrados en la pediatría. Además, hasta hace poco tiempo, la pequeña cuota de mercado y el retorno de la inversión comparativamente más pequeño, a menudo hacían que los programas de desarrollo de fármacos pediátricos fueran impulsados por la estrategia de desarrollo de productos de una empresa para la población adulta, en lugar de las necesidades pediátricas reales^{11,12,13}.

En el caso de los medicamentos empleados en patologías comunes, como infecciones, se suele disponer de especialidades farmacéuticas adecuadas para niños, pero para el tratamiento de determinadas patologías, como la hipertensión, la insuficiencia

cardiaca y el cáncer entre otras, existen muy pocos medicamentos disponibles en una forma farmacéutica adecuada.

1.3 Contexto histórico

La investigación en seres humanos fue cambiando a lo largo de la historia e impactando de diferentes maneras en la población infantil. Podemos encontrar muchos registros de investigaciones en el campo de la salud en el periodo previo a la segunda guerra mundial, en dichos registros el uso de niños era frecuente en diferentes tipos de estudios, algunos de los cuales sin beneficio directo de los participantes. Finalizada la Segunda Guerra Mundial, en los juicios de Núremberg, se consideró a varios médicos como criminales de guerra. El código de Núremberg (1947) dejaba delimitado los límites para las investigaciones en seres humanos, que en la antigüedad eran poco claros y dependían casi exclusivamente del criterio de los investigadores. Por otro lado, un efecto inesperado fue el inicio de la era llamada “orfandad terapéutica”, porque excluyó a niños y adolescentes de participar en investigaciones, dada su incapacidad legal de consentir¹⁴.

1.4 Marco legal

Las directrices internacionales del Consejo de las Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS), en asociación con la Organización Mundial de la Salud (OMS), inició sus trabajos sobre ética de la investigación relacionada con la salud a fines de los años setenta. Desde entonces se dispuso, en cooperación con la OMS, a preparar pautas para indicar la manera de aplicar de forma efectiva los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial.

Desde entonces se publicaron ediciones revisadas de las pautas éticas del CIOMS, la primera en 1993 y posteriores modificaciones en 2002 y 2016. Las directrices de 1993 dedican un ítem específico a la investigación en niños. De la directriz 5, se pueden destacar tres ítems: 1) Los padres o representantes legales deben dar consentimiento por procuración; 2) el consentimiento de cada niño deber obtenerse de acuerdo con su

capacidad; 3) la recusación del niño a participar en la investigación siempre debe respetarse, a no ser que, de acuerdo con el protocolo de la investigación, la terapia que el niño recibirá no tenga ninguna alternativa médicamente aceptable¹⁵.

En cuanto a normativas vigentes encontramos que, en la Unión Europea (UE), una sola ley rige el desarrollo y la autorización de fármacos para uso pediátrico. Los reglamentos (CE) nº 1901/20061 y (CE) nº 1902/20062 de la UE requieren la inclusión de los niños en etapas iniciales del proceso de desarrollo de fármacos. Estos reglamentos establecen la presentación de un Plan de Investigación Pediátrica (PIP) una vez que se completan los primeros estudios con seres humanos y se empiezan a conocer los efectos del fármaco^{16, 17}.

El Reglamento Pediátrico entró en vigor en la UE el 26 de enero de 2007 con el objetivo de mejorar la salud de los niños europeos mediante la introducción de una serie de medidas, obligaciones e incentivos para las empresas farmacéuticas. Esta regulación tiene como objetivo garantizar que los medicamentos para uso en niños sean de alta calidad, éticamente investigados y debidamente autorizados. Además, su aplicación mejora la disponibilidad de información sobre el uso de medicamentos para niños, sin someter a los niños a ensayos innecesarios ni retrasar la autorización de medicamentos para uso en adultos.^{18,19}

En Estados Unidos hay dos leyes que rigen el desarrollo de fármacos pediátricos. La primera, que es la Ley de Equidad de Investigación Pediátrica (PREA) (2003), establece la necesidad de planes pediátricos en la mayoría de los casos y requiere un acuerdo para la evaluación pediátrica²⁰. La segunda ley, que es la Ley sobre los Mejores Medicamentos de Uso Infantil (BPCA) (2007), es opcional, pero la finalización del proceso establecido en esta ley conlleva un incentivo, que consiste en la exclusividad durante un período de 6 meses adicional (exclusividad pediátrica voluntaria) durante el cual se impide la introducción de especialidades farmacéuticas genéricas en el mercado²¹. En el año 2012 BPCA y PREA fueron incorporadas permanentemente en la Administración de Drogas y Alimentos, mediante la ley de Seguridad e Innovación (FDASIA).

Fuera de la Unión Europea, Estados Unidos y Japón, actualmente no se aplica ningún requisito legislativo específico para el desarrollo de fármacos pediátricos, pero esto puede cambiar en el futuro. A pesar de la ausencia de legislación, algunos mercados requieren datos pediátricos locales para la autorización de comercialización.

Los cambios legislativos tanto en los Estados Unidos como en la UE son un gran logro, pero quedan un gran número de desafíos; por ejemplo, a menudo hay un largo retraso en la disponibilidad de medicamentos para niños en comparación con los de adultos. El sistema legislativo no es perfecto, sin embargo, ofrece un marco sostenible para el desarrollo de tratamientos pediátricos. Hay muchas oportunidades para optimizar aún más la implementación de estos marcos, para asegurar la *armonización global* entre todas las partes interesadas en la promoción de estudios, que realmente sean científicamente justificados y evitar la exposición de los niños en forma innecesaria²².

1.5 El factor económico

Dado que la mayoría de las industrias farmacéuticas consideran que el mercado de medicamentos pediátricos no es lucrativo ni atractivo, las mismas dirigen su producción principalmente a la población adulta. Esto deja a la población pediátrica sin otra opción que ser atendida con formas farmacéuticas para adultos a las cuales se les realiza el ajuste de dosis y la adaptación a una forma que pueda ser administrada⁹.

Por otro lado, encontramos que la postura de la industria farmacéutica frente al desarrollo de formulaciones pediátricas, a lo largo de la historia se mantuvo prácticamente sin cambios, solamente dan respuestas a aquellas patologías que se presentan en una alta proporción de la población infantil, de manera que el desarrollo de la formulación les permita obtener una patente y un beneficio económico en el tiempo, o se enfocan en medicamentos de alto costo.

1.6 Avance real o panacea

Específicamente, en cuanto al desarrollo y la optimización de los nuevos medicamentos, encontramos que los constantes avances en este campo no siempre traen consigo la cura para la patología tratada o una mejora en la calidad de vida de los pacientes. Lamentablemente, algunos tratamientos se transforman en paliativos de alto costo y difícil justificación de uso. Tampoco podemos dejar de mencionar los juegos de patentes que suelen realizar la industria farmacéutica, con la finalidad de tener el monopolio de un medicamento determinado, además de la presión de lobby que ejercen las multinacionales farmacéuticas sobre los distintos gobiernos para lograr la aprobación de nuevas patentes. Esta postura, está vulnerando el derecho humano a la atención sanitaria, ya que cientos de miles de personas no pueden comprar medicamentos que les han recetado por motivos económicos. Por lo tanto, los altos precios de los nuevos medicamentos erosionan a los sistemas de salud, limitan el acceso al medicamento y excluyen a los grupos más vulnerables²³.

1.7 Adaptación de fórmulas de adultos

Las enfermedades poco frecuentes, como las cardiopatías pediátricas, son aquellas que afectan a 1 persona cada 2.000 habitantes y no suelen ser atendidas por la industria farmacéutica. En estos casos, la única alternativa es el uso de magistrales o la manipulación de formulaciones para adultos, con sus correspondientes limitaciones.

Las manipulaciones de las formas de dosificación para adultos han sido el "método de referencia" para atender a los recién nacidos y a los niños. En el pasado, la mayoría de las formas de dosificación oral administradas a pacientes pediátricos no estaban aprobadas o no tenían licencia, fundamentalmente debido a la falta de medicamentos para este grupo desatendido. Todavía en estos días hay un uso significativo de medicamentos no aprobados, principalmente debido a las dificultades para realizar los ensayos clínicos necesarios en subconjuntos vulnerables con un número bajo de pacientes²⁴. Esto lleva a que los farmacéuticos de hospitales, padres o cuidadores a menudo enfrentan la necesidad

de manipular las formulaciones destinadas a pacientes adultos, sin que esto sea descrito en las características del producto, usos fuera de especificación, (*del inglés off label*). Esta manipulación puede ser simple (pulverizar comprimidos y mezclar el polvo con jugo; o romper los comprimidos en porciones más pequeñas hasta obtener la dosis deseada) o compleja (mediante el uso de comprimidos como fuente de un IFA para preparar una suspensión). Sin embargo, estas técnicas presentan grandes desventajas, por ejemplo, es difícil obtener la dosis correcta, especialmente cuando los comprimidos que no están ranurados deben partirse en mitades iguales. Además, en las formas de dosificación de liberación controlada o de liberación modificada, romper los comprimidos puede alterar drásticamente la liberación deseada.

Otro punto importante son los excipientes que habitualmente se emplean en las formulaciones destinadas a los adultos y que pueden tener un efecto negativo sobre el paciente pediátrico. Entre ellos podemos mencionar: 1) Alcohol bencílico, ácido benzoico y benzoatos; 2) Etanol; 3) Lactosa; 4) Propilenglicol; 5) Sorbitol; 6) Sulfitos⁴.

1.8 Medicamentos tamaño niños

Aunque se han logrado grandes avances en la reducción de la mortalidad infantil durante años, todavía existen grandes disparidades entre países. Casi 5,2 millones de niños menores de cinco años siguen muriendo cada año de enfermedades prevenibles y tratables, la mayoría de las cuales se encuentran en países de bajos y medianos ingresos²⁵.

En respuesta a estos desafíos, la OMS puso en marcha en diciembre de 2007 su iniciativa “Hacer medicamentos tamaño niño” (en inglés “Make medicines child size”) con el fin de crear conciencia y acelerar las acciones para mejorar la disponibilidad y el acceso de medicamentos específicos para niños²⁶.

Es bien conocido que las formas de dosificación sólidas han sido la formulación preferida por la industria farmacéutica, principalmente debido a la disponibilidad de plataformas tecnológicas bien establecidas que brindan estabilidad a largo plazo, una cadena de suministro sencilla y, lo que es más importante, un costo de fabricación bajo²⁷.

Las principales limitaciones asociadas con las formas de dosificación sólidas han sido la escasez de flexibilidad de la dosis debido a la división desigual de los comprimidos y las dificultades para tragar en algunos pacientes.

Las formas de dosificación líquidas son preferidas para los pacientes pediátricos y los adultos mayores o pacientes de cualquier edad con problemas de deglución, en gran parte debido a una mayor flexibilidad de dosis y la facilidad para tragar en comparación con los productos sólidos²⁸. Sin embargo, en comparación con las formas de dosificación sólidas, las formas de dosificación líquidas tienen más limitaciones, que incluyen problemas de estabilidad, y mayores costos de transporte. Adicionalmente, la palatabilidad de la formulación líquida es un factor clave para la aceptación por parte del paciente. En los últimos años se han llevado adelante investigaciones dirigidas al estudio de vehículos apropiados, que mejorarán la palatabilidad de las formulaciones pediátricas. Entre ellos, la leche se ha explorado con buenos resultados, como potencial vehículo en formulaciones líquidas, haciendo uso de sus propiedades solubilizantes, correctivas de sabor y su capacidad para mantener la estabilidad del vehículo emulsionado²⁹.

Al administrar por vía oral una formulación líquida, el volumen no debe ser excesivamente grande para el paciente pediátrico, se recomienda administrar un volumen menor a 5 mL para niños menores a 5 años y volúmenes menores a 10 mL para mayores a 5 años. Además, no conviene administrar grandes volúmenes a pacientes con restricción hídrica, como los cardiopatas, ni tampoco sobrecargar al paciente con los excipientes de las formulaciones.

1.9 Trabajos previos y selección de IFAs

La Planta Piloto de Producción de Medicamentos (PPPM) de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas trabajó durante los años 2014/2015 con el servicio de neonatología del Hospital Centenario preparando “papeles”, la cual es una forma farmacéutica que se elabora a partir de morterear uno o más comprimidos comerciales y fraccionar por peso el polvo obtenido. De esta experiencia observamos el uso frecuente de

ciertos IFAs para tratar diferentes enfermedades, una patología recurrente eran los pacientes pediátricos con problemas cardíacos y la falta de formas farmacéuticas comerciales que permitan una dosificación segura y controlada³⁰. En base a nuestra experiencia e información disponible en ese momento seleccionamos los IFAs de trabajo, entre ellos se encuentran:

1.9.1 Atenolol

Químicamente conocido como 2-(p-(2-Hydroxy-3-(isopropylamino)propoxy)phenyl)acetamide, número de CAS: 29122-68-7, es un polvo blanco o casi blanco. Soluble en etanol; moderadamente soluble en agua; poco soluble en cloruro de metileno y prácticamente insoluble en éter. Debido a la absorción incompleta del tracto gastrointestinal inferior, tiene una biodisponibilidad oral en el rango del 50 al 60%, mientras que el resto del fármaco se excreta sin cambios en las heces³¹.

Atenolol (ATN), Figura 1.9.1., es un agente bloqueante de los receptores adrenérgicos β_1 que se ha prescrito ampliamente para enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, la angina de pecho y el infarto de miocardio sin actividad simpaticomimética intrínseca o estabilizadora de la membrana³². Además, está recomendado para el tratamiento de la hipertensión y la arritmia en niños menores de 12 años (incluidos los recién nacidos), por lo cual la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) lo incluyó en el inventario de necesidades de medicamentos pediátricos para ayudar a los formuladores de medicamentos a identificar oportunidades³³.

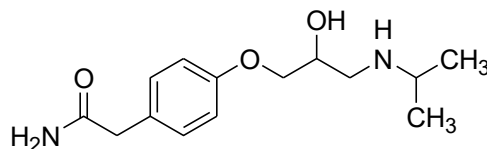


Figura 1.9.1 Estructura química Atenolol

1.9.2 Citrato de Sildenafil

Químicamente conocido como 5-[2-etoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il) sulfonilfenil]-1-metil-3-propil-6*H*-pirazol[4,3-*d*]pirimidin-7-ona;2-hidroxipropano-1,2,3-ácido tricarboxílico, es un polvo blanco, ligeramente cristalino, higroscópico, ligeramente soluble en agua y metanol, parcialmente soluble en hexano. El citrato de sildenafil (SIL), Figura 1.9.2, es un inhibidor de la fosfodiesterasa tipo 5 (PDE-5) aprobado para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar en adultos. Los inhibidores de la PDE-5 tienen efectos vasodilatadores sobre la vasculatura pulmonar a través de un aumento del monofosfato de guanosina cíclico^{34, 35}. La hipertensión arterial pulmonar se caracteriza por un aumento progresivo de la resistencia vascular pulmonar que conduce a insuficiencia ventricular derecha y muerte prematura^{36, 37, 38, 39}.

Actualmente, SIL no está aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos, del inglés *Food and Drug Administration* (FDA) en la población pediátrica; sin embargo, se ha utilizado ampliamente para el tratamiento de la hipertensión pulmonar pediátrica desde 2005, principalmente en base a estudios en adultos, ya que hay datos pediátricos limitados^{40,41,42,43,44}.

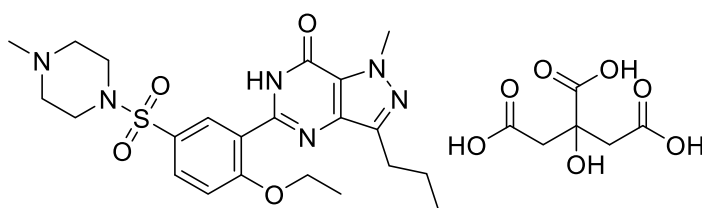


Figura 1.9.2 Estructura química de Citrato de sildenafil

1.9.3 Hidroclorotiazida

Hidroclorotiazida (HCT), químicamente conocida como 6-cloro-3,4-dihidro-2*H*-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida-1,1-dióxido, es un polvo cristalino blanco e inodoro, ligeramente soluble en agua y escasamente soluble en metanol⁴⁵. HCT (Figura 1.9.3), es un fármaco antihipertensivo y diurético tiazídico utilizado en el tratamiento del edema asociado

con insuficiencia cardíaca congestiva y trastornos renales y hepáticos⁴⁶. Además, es un diurético aprobado por la FDA como terapia complementaria para el tratamiento del edema asociado con diversas afecciones, incluida la terapia hormonal, la cirrosis hepática y la insuficiencia cardíaca congestiva^{47,48}. La EMA incluye HCT para el tratamiento del edema y la hipertensión, así como para el tratamiento de las tubulopatías, en niños de todas las edades⁴⁹.

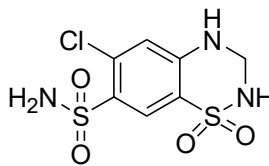


Figura 1.9.3 Estructura química de Hidroclorotiazida

1.9.4 Furosemida

Furosemida (FURO), ácido 5- (aminosulfonil) -4-cloro-2 - ((2-furanilmetil) amino) benzoico, es un polvo cristalino blanco o casi blanco. Funde aproximadamente a 210°C, con descomposición. Se disuelve en soluciones diluidas de hidróxidos alcalinos. Soluble en acetona; moderadamente soluble en alcohol; prácticamente insoluble en agua y cloruro de metileno. FURO (Figura 1.9.4), es un diurético de asa que se usa por vía oral en el tratamiento de estados edematosos asociados con enfermedades cardíacas, renales y hepáticas y para el tratamiento de la hipertensión⁵⁰. Dado que FURO es un ácido débil (pKa ácido reportado 3,48) con un grupo funcional ácido carboxílico, su solubilidad acuosa aumenta en función del pH del medio de 0,18 mg mL⁻¹ (pH 2,3) a 13,36 mg mL⁻¹ (pH 10,0)⁵¹. El principal problema asociado con la formulación y la eficacia de este IFA es su absorción oral variable, que da lugar a una biodisponibilidad fluctuante entre el 10% y el 90%. Este hecho se debe a una baja solubilidad en agua y adicionalmente, a la reducida permeabilidad de membrana que presenta este fármaco^{52,53,54}. FURO se administra por vía oral o parenteral y se incluye en la lista de medicamentos esenciales de la OMS⁵⁵.

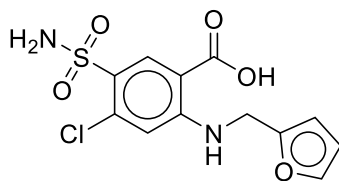


Figura 1.9.4 Estructura química de la furosemida

1.9.5 Maleato de Enalapril

El maleato de enalapril (ENA) es químicamente (2S) -1 - [(2S) -2 - [[(1S) -1 (etoxicarbonil) -3-fenilpropil] amino] propanoil] pirrolidina-2 ácido (Z) -butenodioato carboxílico. Es un polvo cristalino e inodoro de color blanco a blanquecino que se funde en el rango de 143–144°C⁵⁶.

ENA (Figura 1.9.5), es un éster etílico de un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina de acción prolongada. ENA es básicamente un profármaco, que después de la administración oral se hidroliza produciendo enalaprilat. Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina constituyen una de las principales clases de compuestos utilizados para el tratamiento de la hipertensión esencial y renovascular, y la insuficiencia cardíaca congestiva. Se encuentra dentro de la lista de medicamentos esenciales de la OMS⁵⁵.

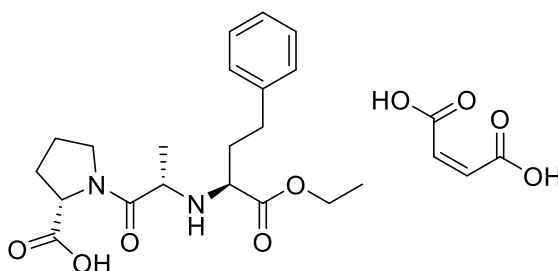


Figura 1.9.5 Estructura química del Maleato de enalapril

La Reunión del Grupo de Expertos de la Agencia Europea de Medicamentos sobre Insuficiencia Cardíaca Pediátrica, consideró a ENA como un tratamiento de primera línea para la insuficiencia cardíaca crónica en niños. Sin embargo, no existe una formulación estable y apropiada para la edad en Europa. Los datos de seguridad, eficacia, farmacocinética y farmacodinámica para cualquier formulación son insuficientes.

1.10 Diferencias entre los tratamientos para adultos y pediátricos

Como se ha mencionado, las dosis necesarias para tratar a pacientes pediátricos y neonatos difieren significativamente de las dosis para adultos. En la Tabla 1.10.1 se presentan las dosis recomendadas en pediatría y para adultos. Como puede observarse, la dosis para pacientes pediátricos de ATN y SIL son de aproximadamente 100 veces menor a la dosis para adultos, por otra parte, para HCT la dosis pediátrica es alrededor de 6 veces menor que para adultos, mientras que la de FURO es entre 20 y 40 veces menor que la de adultos, y la de ENA es aproximadamente 30 veces menor. En base a esta comparación, queda en evidencia que la adaptación por molienda de comprimidos diseñados para pacientes adultos no asegurará la dosis buscada en pacientes pediátricos.

Tabla 1.10.1 Dosis recomendadas en pediatría y adultos

| Fármaco | Dosis recomendadas | |
|-----------------------|-----------------------|------------------|
| | Pediatría (mg/Kg/día) | Adultos (mg/día) |
| Atenolol | 0,5 a 2 | 50 a 100 |
| Citrato de Sildenafil | 0,5 a 4 | 50 a 100 |
| Hidroclorotiazida | 2 a 4 | 12,5 o 25 |
| Furosemida | 1 a 2 | 20 a 80 |
| Maleato de enalapril | 0,08 a 0,6 | 2,5 a 20 |

1.11 Formas farmacéuticas

Se denomina forma farmacéutica al estado final bajo el cual se presenta el medicamento para ser administrado al paciente⁵⁷. Ésta debe contener el o los IFA/s en las cantidades adecuadas, mantenerlos inalterados durante su conservación en las condiciones especificadas, y garantizar que va a producir una respuesta terapéutica satisfactoria. Los objetivos que se persiguen con la transformación de un IFA en una forma de dosificación son numerosos; cabe señalar, como más habituales, los siguientes⁵⁸:

- Posibilitar la administración de IFAs utilizados en dosis muy reducidas.
- Proteger a los IFAs de los agentes atmosféricos.
- Proteger a los IFAs de los efectos destructivos del medio gástrico.
- Mejorar las características organolépticas de los IFAs.
- Proporcionar formas líquidas a partir de IFAs sólidos.
- Posibilitar la administración de IFAs a través de una determinada vía.
- Controlar la absorción de los IFAs.
- Dirigir selectivamente a los IFAs a determinados órganos o tejidos.

1.11.1 Tecnología del desarrollo

Las formulaciones farmacéuticas no sólo contienen uno o más IFAs, sino también excipientes acordes a las necesidades de la formulación. El desarrollo de una forma farmacéutica conlleva a la selección y evaluación de estos últimos, tanto en concentración como en tipo, buscando garantizar el escalado a costos razonables, manteniendo la calidad y estabilidad de dicha forma farmacéutica para el período de uso establecido.

Entre los excipientes se pueden mencionar: conservantes, antioxidantes, agentes dispersantes, viscosizantes, emulsionantes, soluciones reguladoras, humectantes, solubilizantes, estabilizantes, aromatizantes, edulcorantes y colorantes autorizados por la autoridad competente, entre otros⁵⁹.

Cuando se realiza la formulación de un medicamento se debe procurar el empleo del menor número de componentes posibles y permitir la obtención de la mejor relación costo/efectividad del fármaco, porque entre mayor sea el número de componentes, mayor es la probabilidad de incompatibilidades o manifestaciones de inestabilidad y mayor el costo por la adición de posibles etapas innecesarias al proceso de fabricación⁶⁰.

1.11.2 Formas farmacéuticas líquidas orales

Los líquidos de administración oral son disoluciones, suspensiones o emulsiones que contienen uno o más IFAs en un vehículo apropiado y que están destinadas a ser ingeridas

sin diluir o previa dilución⁶⁰. Dentro de las formas farmacéuticas líquidas destinadas a ser ingeridas las principales son los jarabes y las gotas. Las formas líquidas orales suelen presentar algunas ventajas sobre las formas sólidas, como una mayor biodisponibilidad, un menor efecto irritante sobre la mucosa gástrica y son las formas farmacéuticas de elección para tratar pacientes pediátricos, geriátricos o aquellos que presenten trastornos en la deglución (disfagia)^{61,62}. Entre los inconvenientes, cabe destacar la posible inestabilidad de los fármacos en solución y que estas formulaciones son más propensas al crecimiento microbiano en comparación con las formas sólidas⁶³.

Jarabes: Son preparaciones acuosas, límpidas y de elevada viscosidad, que contienen un azúcar (generalmente sacarosa) en concentración similar a la de saturación⁶⁴. El azúcar ejerce una acción conservante, edulcorante y viscosizante. La alta concentración de azúcar le confiere al jarabe una elevada presión osmótica que impide el desarrollo fúngico y bacteriano. Estas preparaciones pueden llevar diferentes polioles, como glicerina o sorbitol, que retrasan la cristalización del azúcar e incrementan la solubilidad de los diferentes componentes del jarabe. Cuando el IFA es inestable en presencia de sacarosa, o los jarabes van a ser destinados a pacientes diabéticos o a personas con dietas hipocalóricas, se hace necesario eliminar el azúcar de la fórmula e incorporar en su lugar polioles (sorbitol, glicerina o propilenglicol) y edulcorantes sintéticos (sacarina o ciclamato sódicos)⁵⁹. Cabe mencionar que, aunque estas últimas formulaciones que no contienen azúcar, son comúnmente conocidas como “jarabes para diabéticos”, en realidad deberían ser definidas como bebidas, ya que Farmacopea Argentina define a los jarabes como “una solución de sacarosa en agua cercana al punto de saturación”⁶⁴.

Por tratarse de preparaciones acuosas, los jarabes son apropiados para la administración de fármacos hidrosolubles. Asimismo, por no contener alcohol y por su sabor agradable, son formas líquidas orales de amplia difusión en pediatría y geriatría⁵⁸.

Gotas: Son formas líquidas de administración oral, en las cuales él o los IFAs que se administran ejercen su efecto terapéutico a una dosis que se alcanza sin administrar grandes volúmenes. Además del/los IFA/s, las gotas pueden requerir el uso de diferentes tipos de excipientes como ser reguladores de pH, saborizantes, cosolventes, viscosizantes, antioxidantes, y conservadores, entre otros⁵⁷. Por su bajo volumen de dosis y por no contener alcohol, son formas líquidas orales de amplia difusión en pediatría y en geriatría.

1.12 Control de calidad

La calidad es un parámetro importante para todos los sectores industriales, pero adquiere aún mayor relevancia en la industria farmacéutica. La exigencia de calidad en los productos de interés farmacéutico es indiscutible, por la propia naturaleza de los productos farmacéuticos, potencialmente capaces de producir efectos perjudiciales para la salud, en contraposición con su finalidad intrínseca de prevención de enfermedad y restauración de la salud.

Los medicamentos deben ser regulados porque éstos no son productos de consumo ordinario. El empleo de productos ineficaces, inseguros o sin calidad, puede causar el fracaso terapéutico, la exacerbación de la enfermedad, y en algunas ocasiones hasta la muerte del paciente, minando la confianza pública en los sistemas de salud y sus profesionales. El tiempo y dinero gastados en medicamentos no aptos, son de los pacientes y de los estados, que subvencionan los sistemas de salud.

La necesidad de adherir a los requisitos de las Buenas Prácticas de Fabricación y Control es actualmente incuestionable y lo que en un principio fueron guías de trabajo se han convertido en normas aplicables con fuerza de ley. Los fabricantes europeos de medicamentos deben cumplir con las Normas para la Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Medicamentos Veterinarios de la UE⁶⁵ y existen normas equivalentes en Estados Unidos⁶⁶, Japón⁶⁷ y en el resto de los países, que alojan a los mayores productores mundiales de medicamentos. La OMS también se ha pronunciado al respecto, emitiendo su propio texto ordenado de Buenas Prácticas de Fabricación y

Control⁶⁸. En Argentina, las normas actualmente vigentes están contenidas en la Farmacopea Argentina⁶⁴, radicando el poder de policía para garantizar su cumplimiento en la Administración nacional de medicamentos, alimentos y tecnología médica (ANMAT).

Por lo tanto, el objetivo fundamental del control de calidad de medicamentos es proveer la confianza que cuando un medicamento sea dispensado al paciente, el mismo cumpla con todas las especificaciones de identidad, pureza, dosis, potencia, eficacia terapéutica e inocuidad, como así también en lo referido a sus propiedades organolépticas y características farmacotécnicas, documentando la adquisición de toda la información relevante y su interpretación. Para ello se requiere del uso conjunto de una variedad de metodologías analíticas y pasos de verificación y control.

El control de calidad es un paso fundamental en el desarrollo de los medicamentos, e involucra no solo a los IFAs sino también a los excipientes, productos en proceso y producto terminado. El desarrollo de métodos analíticos adecuados juega un importante papel en el descubrimiento, optimización y fabricación de productos farmacéuticos. Los métodos de control que resultan de estos procesos pueden ser usados luego por los laboratorios de control de calidad para asegurar la producción de un medicamento seguro y eficaz, y para garantizar en general la calidad del producto.

Los métodos y actividades propias de la industria farmacéutica que pueden tener impacto sobre la seguridad y la eficacia de los productos que ésta fabrica o utiliza, requieren de una demostración previa de su aptitud para el uso propuesto. De ese modo, la calidad de los productos no se verá afectada por la calidad de los métodos empleados para producirlos y controlarlos. La demostración de aptitud para el uso pretendido es lo que en el ámbito de la industria farmacéutica se conoce como “validación”⁶⁹.

Los resultados de la validación del método pueden usarse para juzgar la calidad, confiabilidad y consistencia del resultado analítico, por lo que la validación debe ser parte integral de cualquier buena práctica analítica.

En las distintas etapas, métodos validados aptos para el control de calidad son aplicados a los fines de determinar no sólo el contenido del IFA, sino también la presencia de productos de degradación o posibles interferentes⁷⁰.

1.13 Estudios de estabilidad

1.13.1 Estudios de estabilidad químico

Los estudios de estabilidad para los productos farmacéuticos son una parte fundamental de todo el proceso de investigación y desarrollo. Los mismos deben hacerse previamente a que un producto farmacéutico sea puesto a disposición de la población. Tales estudios tienen como finalidad determinar el tiempo durante el cual los productos analizados mantienen sus especificaciones de calidad.

Los ensayos deben cubrir todos los atributos que puedan modificarse durante el almacenamiento y aquéllos que tengan influencia sobre la calidad, seguridad y eficacia del medicamento. Los ensayos por realizar durante el estudio deben cubrir no solamente la estabilidad química sino también los cambios en las propiedades físicas y microbiológicas. Deben determinarse, además, el mantenimiento de la concentración y eficacia de los conservantes mediante ensayos y valoraciones apropiadas⁶⁴. En la Tabla 1.13.1 se indican las condiciones y tiempos mínimos (establecidos por Farmacopea Argentina) de los estudios de estabilidad de larga duración y acelerados.

Tabla 1.13.1 Condiciones de los estudios de larga duración y acelerados.

| Tipo de estudio | Temperatura | Humedad | Tiempos mínimos |
|----------------------------|-------------|----------|-----------------|
| Estudios de larga duración | 25 ± 2 °C | 60 ± 5 % | 12 meses |
| Estudios acelerados | 40 ± 2 °C | 75 ± 5% | 6 meses |

Los estudios de larga duración son obligatorios y deben tener un mínimo de doce meses para su presentación para el registro del producto, aunque deben continuarse hasta cubrir el periodo de vida útil propuesto, y quedar a disposición de la Autoridad Sanitaria. El

estudio de estabilidad acelerado es optativo, pero puede emplearse para iniciar los trámites de presentación del producto, y para evaluar el efecto de las condiciones de almacenamiento fijadas en periodos cortos, sin embargo, los resultados de estudios acelerados no siempre predicen los cambios físicos⁶⁴.

1.13.2 Estudios de estabilidad microbiológica

Los productos farmacéuticos pueden ser vehículos de microorganismos que pueden producir enfermedades, alteraciones fisicoquímicas, disminución de la actividad terapéutica, o ser indicadores de calidad higiénica deficiente. Deben, por lo tanto, fijarse límites de aceptabilidad con el fin de garantizar la inocuidad y estabilidad del producto desde el punto de vista microbiológico durante el tiempo de vida útil del producto. Los límites microbianos fijados para productos orales no estériles son: 1) Recuento de microorganismos aerobios totales menor a 10^3 unidades formadoras de colonias (UFC) por mL, 2) Recuento combinado de hongos filamentosos y levaduras menor a 10^2 UFC mL⁻¹, 3) Ausencia de *Escherichia coli*.^{64,71} Por lo tanto, una formulación farmacéutica de administración oral puede contener microorganismos, pero en un número limitado, sin embargo, es una exigencia la ausencia de *E. coli*.

1.14 Diseño de experimentos

Un enfoque clásico de la experimentación es investigar los efectos de una variable experimental manteniendo todas las otras constantes. En muchas situaciones, este acercamiento puede no reflejar la situación real del sistema estudiado. Además, es posible que las variables interactúen unas con otras. De esta manera, la magnitud del efecto causado por la alteración de uno de los factores dependerá de la magnitud de uno o más de los otros factores. Un enfoque experimental que investigue el efecto de un factor manteniendo los otros factores a un nivel constante es poco probable que revele la presencia de tales interacciones⁷². La mayoría de los experimentos involucrados en el desarrollo de métodos analíticos para el control de dosis es aún efectuada modificando

separadamente (y de una forma no sistemática) los niveles de cada variable o factor. Esta metodología requiere de un gran número de experimentos y es frecuentemente dependiente de la experiencia del analista. El tradicional cambio de un factor a la vez no es una estrategia económica ni eficiente, porque no suministra suficiente información acerca del punto óptimo. La optimización de una variable a la vez también ignora las interacciones entre factores y requiere de numerosos experimentos innecesarios. Debido al incremento en los costos de los experimentos, es muy importante que el desarrollo y optimización de cualquier método analítico pueda resolverse con pocos ensayos y al menor costo posible.

Una forma de acelerar el desarrollo y validación de un proceso consiste en el uso de diseños experimentales, con el fin de seleccionar experimentos de manera eficiente y sistemática, y así obtener información confiable y coherente⁷³. El diseño de experimentos es una técnica estadística introducida por Fisher en 1926 que apunta a resolver tales dificultades⁷⁴. La misma suministra los medios para establecer los factores que pueden tener influencia sobre un proceso, evaluarlos simultáneamente, dilucidar si éstos interactúan y determinar su importancia relativa. Es decir, se investigan todas las posibles interacciones entre los factores, a todos los niveles, y se evalúa el significado tanto de los efectos principales como de las interacciones. Ello permite separar los factores que son importantes de aquéllos que no lo son. Esta técnica puede aplicarse a muchos problemas farmacéuticos y aporta las bases para analizar cualquier situación en la que se trate de encontrar la solución óptima. Para su implementación, deben tenerse en cuenta los factores a ser estudiados, sus niveles y las respuestas del sistema:

1) *Los factores a ser estudiados*: Los mismos pueden ser cuali o cuantitativos y deben seleccionarse de acuerdo con los objetivos del experimento; 2) *Los niveles de los factores*: la determinación de los niveles es a menudo una decisión difícil, en la cual la experiencia del investigador juega un rol importante. Muchas veces las guías disponibles son solamente la literatura y/o ensayos de prueba y error; 3) *La/s respuesta/s a ser medida/s*: Las respuestas de interés usualmente se definen en los objetivos experimentales. Las mismas deben ser

capaces de ser expresadas numéricamente, ya que no se permiten descripciones adjetivales o numerales ordinales.

En la Tabla 1.14.1 se listan los diseños experimentales más usados. En esta Tesis, se empleó el diseño Plackett-Burman para la etapa de *screening* y los diseños factorial completo (*full factorial*) y central compuesto, para la etapa de optimización.

1.14.1 Diseño Plackett-Burman

Son un grupo de diseños experimentales introducidos en 1946 por Robin L. Plackett y J. P. Burman⁷⁵, donde el número de experimentos es múltiplo de 4 pero no potencia de 2 (12, 20, 24, etc.).

Tabla 1.14.1 Diseños experimentales más empleados y su aplicación general

| Diseños Experimentales | | Aplicación General |
|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> • Factoriales | <ul style="list-style-type: none"> • Factorial completo | Optimización / Cuantificación |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Factorial Fraccionario | Optimización / Exploración |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Plackett-Burman | Exploración |
| | <ul style="list-style-type: none"> • D-óptimo | Optimización / Exploración |
| <ul style="list-style-type: none"> • Central compuesto | | Optimización / Cuantificación |
| <ul style="list-style-type: none"> • Box-Behnken | | Optimización / Cuantificación |
| <ul style="list-style-type: none"> • D-Óptimo | | Optimización / Cuantificación |

Las interacciones entre factores se consideran inexistentes y cada factor se estudia a 2 niveles, por lo que resultan útiles para determinar efectos principales. Estos diseños presentan las desventajas que cuando las interacciones son importantes, éstas se confunden con los efectos principales, pero son muy útiles para evaluar la importancia de diferentes factores previo a su selección, en la etapa de optimización.

1.14.2 Diseños factoriales completos

En un diseño factorial completo se evalúan todos los niveles de cada factor para todas las combinaciones de los niveles de los otros factores. Si cada uno de los n factores tiene 2 niveles, entonces el número de experimentos requeridos es de 2^n y, en general, si todos los factores tienen el mismo número de niveles, la cantidad total de experimentos necesarios será de k^n , donde k es el número de niveles y n el número de factores. Este tipo de diseños se vuelve poco práctico y hasta impracticable para k o n superior a 4-5.

1.14.3 Diseño Central Compuesto (DCC)

Son una progresión de los diseños factoriales introducidos por Box y Wilson⁷⁶, ampliamente usados en el modelado de superficies de respuesta y en problemas de optimización (Figura 1.14.1). Estos diseños constan de 3 partes:

1) Un diseño factorial a tres niveles (-1, 0 y 1); 2) Un diseño estrella, con puntos situados a una distancia α del punto central ($\alpha = 2^{N/4}$, donde N es el número de factores); 3) Un punto central (0, 0, 0), del cual se hacen replicados con el objeto de adquirir información acerca de la variabilidad de la respuesta. Una de las ventajas de este diseño es que cada factor se evalúa a cinco niveles ($-\alpha, -1, 0, +1$ y $+\alpha$) con un reducido número de experimentos.

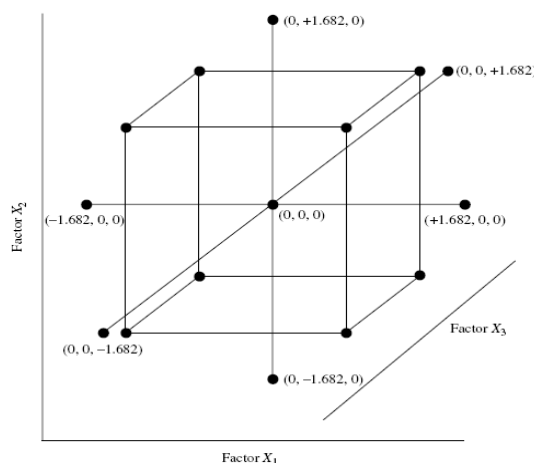


Figura 1.14.1 Esquema del Diseño Central Compuesto

1.15 Objetivo

1.15.1 Objetivo General

Esta Tesis propone como objetivo general el desarrollo y optimización de formas farmacéuticas líquidas de uso oral para el tratamiento de cardiopatías en pacientes pediátricos.

1.15.2 Objetivos Particulares

El objetivo planteado será alcanzado a través de los siguientes objetivos particulares:

- 1) Realizar una búsqueda bibliográfica de las formas farmacéuticas líquidas de administración oral, ausentes y presentes en el mercado farmacéutico argentino, y desarrolladas previamente en publicaciones científicas.
- 2) Determinar qué tipo de excipientes serán los más adecuados para la preparación de las gotas y jarabes de acuerdo con la dosis requerida, las características organolépticas y compatibilidad con los IFAs.
- 3) Evaluar las interacciones físicas y químicas entre los IFAs y los distintos excipientes que pueden ser utilizados en la formulación de las distintas formas farmacéuticas.
- 4) Desarrollar y optimizar haciendo uso de diseño de experimentos formulaciones líquidas, en forma de gotas o jarabes, de HCT, ATN, ENA, FURO y SIL
- 5) Desarrollar métodos indicadores de estabilidad
- 6) Validar los métodos analíticos necesarios para la realización de los controles de calidad de las formulaciones.
- 7) Realizar los estudios de estabilidad de las nuevas formulaciones.

CAPÍTULO 2
MATERIALES Y
MÉTODOS

2. Materiales y métodos

2.1 Equipamiento, Instrumental analítico y de apoyo

2.1.1 Espectroscopia de absorción electrónica

Los espectros de absorción electrónica se adquirieron en un espectrofotómetro UV-Vis marca Shimadzu modelo 1800 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japón), utilizando cubetas de cuarzo de 1,00 cm de paso óptico, frente a blanco del solvente. Los barridos se hicieron a una velocidad de 1200 nm min⁻¹. Los espectros fueron obtenidos con una resolución nominal de 1 nm para todos los casos.

2.1.2 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE)

Los análisis se llevaron a cabo isocráticamente, empleando un cromatógrafo de líquidos marca Agilent Technologies 1200 Series (Santa Clara, USA), equipado con cuatro bombas, un inyector automático y un detector de arreglo de diodos. Columnas de las líneas Luna C8 y CN, de 4,6 mm × 25 cm (Phenomenex, Inc., Torrance, Estados Unidos (EEUU)), o Silia Chrom XDB1 C18 de 25 o 15 cm × 4,6 mm, según el caso, rellenas con partículas de 5 µm de diámetro promedio y termostalizadas a 30,0 o 50,0 ± 0,1 °C, fueron empleadas para realizar las determinaciones correspondientes en cada caso.

2.1.3 Separaciones cromatográficas

2.1.3.1 Determinación de Atenolol

El contenido de ATN fue determinado empleando una columna SiliaChrom C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm), termostalizada a 30°C. La fase móvil consistió en una mezcla de buffer citrato (10 mM, pH 4): metanol (70:30) con un flujo de 0,5 mL min⁻¹ y un volumen de inyección de 20 µL. La longitud de onda de detección fue 226 nm⁷⁷.

2.1.3.2 Determinación de Citrato de Sildenafil

Cada una de las muestras fue analizada a 240 nm para determinar el contenido de SIL. Se empleó una columna SiliaChrom C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), termostalizada a 30°C.

La fase móvil consistió en una mezcla de buffer acetato de amonio (50 mM, pH 7): acetonitrilo (50:50) con un flujo de 1 mL min⁻¹ y un volumen de inyección de 20 µL⁷⁸.

2.1.3.3 Determinación de Hidroclorotiazida

Los análisis de cada una de las muestras se llevaron a cabo empleando una columna SiliaChrom XDB1 C18 (250 × 4,6 mm d.i., 5 µm tamaño de partícula), termostaticada a 30°C, la fase móvil compuesta por una solución buffer de fosfatos (50 mM, pH 2,5): acetonitrilo (70:30), a una velocidad de flujo de 1,0 mL min⁻¹, con detección UV a 225 nm y un volumen de inyección de 20 µL⁷⁹.

2.1.3.4 Determinación de Furosemida

Las cuantificaciones de FURO en cada uno de los experimentos se llevaron a cabo siguiendo los lineamientos de la monografía oficial de la Farmacopea de los Estados Unidos del inglés *United States Pharmacopeia* (USP 38)⁶⁶ para soluciones orales.

Las condiciones fueron: fase móvil: agua, acetonitrilo y ácido acético glacial (165:35:2) velocidad de flujo de 2 mL min⁻¹, columna Luna CN, de 4,6 mm × 25 cm (Phenomenex, Inc., Torrance, EEUU) termostaticada a 30°C, detección a 254 nm y un volumen de inyección de 20 µL.

2.1.3.5 Determinación de Maleato de Enalapril

Para determinar ENA en los estudios de estabilidad química iniciales y para las muestras conteniendo propionato de calcio como conservante, se empleó el método publicado en la monografía oficial de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 38)⁶⁶ para la valoración de comprimidos. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: fase móvil: solución buffer de fosfato monobásico de sodio (10 mM, pH 2,2): acetonitrilo, en una proporción 75:25, la columna, Luna C8, de 4,6 mm × 25 cm (Phenomenex, Inc., Torrance, EEUU), termostaticada a 50°C, volumen de inyección 50 µL, flujo de 2 mL min⁻¹. La detección se llevó a cabo a 215 nm.

Para la determinación de ENA en las muestras conteniendo benzoato de sodio y metil y propilparabeno, las condiciones cromatográficas fueron: fase móvil: solución buffer de fosfato monobásico de sodio (10 mM, pH 2,2): acetonitrilo, en una proporción 80:20, la

columna, Luna C8, de 4,6 mm × 25 cm (Phenomenex, Inc., Torrance, EEUU), termostaticada a 50°C, volumen de inyección 50 µL, flujo de 1,5 mL min⁻¹. La detección se llevó a cabo a 215 nm.

2.1.4 Propiedades de apariencia física y medición de pH

Se utilizó un método de examen sensorial (apreciando modificaciones de color, aroma o tendencia a la formación de precipitados) para analizar el aspecto físico de las muestras almacenadas a cada temperatura. Las mediciones de pH de todas las soluciones utilizadas se llevaron a cabo con un pH-metro marca Thermo Scientific Orion 3 Star B35874 capaz de apreciar ± 0,01 unidades de pH, equipado con un electrodo Orion 8157 BNUMD.

2.1.5 Pesadas

Las pesadas analíticas se realizaron en una balanza analítica marca OHAUS® Pioneer™. La calibración de la balanza se controló mediante una pesa de referencia antes de comenzar cada operación o serie de pesadas.

2.1.6 Agitación y sonicación

Acorde a las determinaciones a realizar, se empleó un agitador magnético marca Precytec® y un agitador de paleta marca Boeco Germany OSD-20. Las sonicaciones se llevaron a cabo empleando un baño ultrasónico Ultrasonic parts-cleaning Branson 1200 (Branson Ultrasonic Corp., Dambury, EEUU).

2.2 Adquisición y procesamiento computacional de los datos cromatográficos y espectroscópicos

2.2.1 Espectros y cromatogramas

Los espectros en el UV se adquirieron y procesaron empleando el aplicativo UV-Probe v. 2.00 (Shimadzu). Los cromatogramas fueron adquiridos y procesados empleando el programa EZchrome Elite Chromatography Data System Version 3.3.2 sp1, Agilent Technologies, Inc.

2.2.2 Gráficos

Las estructuras químicas fueron dibujadas empleando el programa ChemDraw Ultra v. 7.0 (Cambridge Scientific™, Cambridge, MA, EEUU). Otros gráficos se confeccionaron empleando la aplicación Origin v. 8.0 (OriginLab, Co. Northampton, MA, EEUU) y Design-Expert versión 7.

2.3 Ingredientes farmacéuticos activos y excipientes

2.3.1 Ingredientes farmacéuticos activos

Todos los IFAs empleados para llevar a cabo este trabajo fueron de grado farmacopeico y se conservaron en un desecador, protegidos de la acción de la luz y la humedad durante el desarrollo de los experimentos.

- *Atenolol*. Fue provisto por el Laboratorio de Especialidades Medicinales (LEM), Rosario. Lote N° 1409129, pureza: 99,48%.
- *Citrato de Sildenafil*. Fue provisto por el Laboratorio Industrial Farmacéutico (LIF), Santa Fe. Lote M-004221, pureza: 99.54%.
- *Hidroclorotiazida*: Fue provisto por el LEM, Rosario. Lote N° 20141103, pureza: 99.55%.
- *Furosemida*: Fue provisto por el LIF, Santa Fe. Lote: M-004474, pureza: 99.45%.
- *Maleato de Enalapril* Fue provisto por el LIF, Santa Fe. Lote: M-003987, pureza: 99.66%.

2.3.2 Excipientes

Los excipientes empleados en este trabajo de Tesis fueron los siguientes:

Glicerina (Gli) Farmacopea (Novalquim S.R.L. Lote: N° 130610. Origen: Argentina), sorbitol (Sor) USP (Novalquim S.R.L. Lote N°E597M. Origen Francia), propilenglicol (PPG) (Novalquim S.R.L. Lote N° F019145. Origen: Alemania), polietilenglicol 400 (PEG 400), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), metilparabeno (Prest S.A. Lote N° 60MS0812. Origen: India), propilparabeno (Unifarma. Lote N° 20130719. Origen: China), benzoato de sodio, propionato de calcio, citrato de sodio, fosfato monobásico de sodio, hidróxido de sodio, D(+)-

Sacarosa (USP-NF, BP, Ph. Eur., JP) pura, grado farmacéutico, y ácido fosfórico (Laboratorio Cicarelli (Santa Fe, Argentina).

2.4 Reactivos y soluciones buffer para cromatografía

Los solventes metanol (Sintorgan) y acetonitrilo (Panreac) empleados en las separaciones cromatográficas fueron grado HPLC. Para preparar las soluciones y fases móviles se empleó agua Millie Q (Millipore Direct-Q UV3, Maryland, USA). Todos los demás reactivos (HCl, NaOH, K₂HPO₄, NaH₂PO₄, H₃PO₄, etc.) fueron de grado analítico, adquiridos a Merck KGaA (Darmstadt, Alemania), Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EEUU) y Ciccarelli (San Lorenzo, Argentina). Las soluciones buffer fueron preparadas de acuerdo con las indicaciones de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 38)⁶⁶. Todas las fases móviles fueron filtradas a través de filtros de nylon de 0,45 µm de diámetro de poro.

2.5 Soluciones madre y de trabajo para CLAE

La preparación de todas las soluciones madre y de trabajo para llevar a cabo la validación de cada uno de los métodos cromatográficos empleados en la cuantificación de los ingredientes activos y sus resultados, se detallan en el Anexo.

2.6 Reactivos, soluciones y diluciones de las formulaciones desarrolladas

En este apartado se describe la preparación de las soluciones a partir de las formulaciones desarrolladas a ser analizadas por los distintos métodos para su cuantificación.

2.6.1 Gotas de Atenolol

2.6.1.1 Preparación de las muestras del diseño Plackett-Burman

Las diferentes soluciones buffer (citrato o fosfato) fueron preparadas usando agua estéril conteniendo 0,07 % p/v de metilparabeno y 0,03 % p/v de propilparabeno. Las concentraciones de estos conservantes fueron seleccionadas basadas en los valores máximos fijados por la EMA⁸⁰. El jarabe fue preparado siguiendo el método de la farmacopea británica⁸¹.

Se llevaron a cabo un total de 12 experimentos que comprenden cinco parámetros independientes, tres factores numéricos y dos factores categóricos. Los factores numéricos evaluados fueron la concentración de ATN (ATN%(p/v)), la concentración de agente viscosizante (AV%(v/v)) y pH de la solución buffer empleada en cada caso (BpH). Los factores categóricos corresponden al tipo de solución buffer, citrato o fosfato y el tipo de agente viscosizante (AV), Gli o jarabe (Jar). Las cantidades de ATN, AV y soluciones buffers se detallan en la Tabla 2.6.1

Tabla 2.6.1 Diseño Plackett-Burman para la selección de factores gotas de ATN

| F | ATN%(p/v) | BpH | Tipo buffer | AV%(v/v) | AV |
|----|-----------|-----|-------------|----------|-----|
| 1 | 4 | 2 | Fosfato | 0 | Jar |
| 2 | 4 | 7 | Citrato | 20 | Jar |
| 3 | 1 | 7 | Fosfato | 0 | Gli |
| 4 | 4 | 2 | Fosfato | 20 | Jar |
| 5 | 4 | 7 | Citrato | 20 | Gli |
| 6 | 4 | 7 | Fosfato | 0 | Gli |
| 7 | 1 | 7 | Fosfato | 20 | Jar |
| 8 | 1 | 2 | Fosfato | 20 | Gli |
| 9 | 1 | 2 | Citrato | 20 | Gli |
| 10 | 4 | 2 | Citrato | 0 | Gli |
| 11 | 1 | 7 | Citrato | 0 | Jar |
| 12 | 1 | 2 | Citrato | 0 | Jar |

F: Formulación, ATN%(p/v): concentración de atenolol, BpH: pH de la solución buffer, AV%(v/v): concentración de agente viscosizante, AV: tipo de agente viscosizante.

Diferentes cantidades exactamente pesadas de ATN fueron transferidas a un frasco de vidrio de boca ancha con tapa de 200 mL. Posteriormente, se incorporó como agente viscosizante Gli, Sor o una mezcla de ambos, según corresponda. Luego, una porción de solución buffer (70 mL) fue incorporada a cada frasco, se tapó y se sometió a sonicación durante 20 min. A continuación, las muestras fueron agitadas durante 72 h (220 rpm y

37°C). Finalmente, el contenido de cada frasco fue trasvasado cuantitativamente a un matraz de 100 mL, se completó a volumen con la solución buffer correspondiente a cada experimento y se filtró con papel de filtro⁸². Cada una de las muestras fue fraccionada en tres envases de vidrio tipo III color ámbar y conservadas a 4, 25 y 40°C/ 75%HR, para realizar los estudios de estabilidad.

2.6.2 Gotas de Citrato de Sildenafil

2.6.2.1 Preparación de las muestras del diseño Plackett-Burman

Se llevaron a cabo un total de 12 experimentos que comprenden seis parámetros independientes, cinco factores numéricos y un factor categórico. Los factores numéricos evaluados fueron el contenido de Sor, PPG, PEG 400, Gli y pH. El factor categórico corresponde al tipo de solución buffer, citrato o fosfato. La Tabla 2.6.2 resume el contenido de los excipientes en cada uno de los experimentos.

Tabla 2.6.2 Diseño Plackett-Burman para la selección de factores gotas de SIL

| F | Sor (%) | PPG (%) | PEG 400(%) | Gli (%) | pH | Tipo buffer |
|----|---------|---------|------------|---------|----|-------------|
| 1 | 0 | 10 | 0 | 10 | 7 | Citrato |
| 2 | 10 | 0 | 10 | 10 | 3 | Fosfato |
| 3 | 10 | 10 | 10 | 0 | 3 | Citrato |
| 4 | 0 | 10 | 10 | 0 | 7 | Fosfato |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | Citrato |
| 6 | 10 | 0 | 0 | 0 | 7 | Citrato |
| 7 | 0 | 0 | 10 | 0 | 7 | Fosfato |
| 8 | 10 | 10 | 0 | 0 | 3 | Fosfato |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 10 | 3 | Fosfato |
| 10 | 0 | 10 | 10 | 10 | 3 | Citrato |
| 11 | 10 | 10 | 0 | 10 | 7 | Fosfato |
| 12 | 10 | 0 | 10 | 10 | 7 | Citrato |

F: Formulación; Sor: Sorbitol; PPG: Propilenglicol; PEG 400: polietilenglicol 400; Gli: Glicerina

En la preparación de las soluciones buffers (citrato o fosfato) se empleó agua estéril conteniendo metilparabeno (0,07%p/v) y propilparabeno (0,03%p/v) como conservantes. Primero, se pesaron exactamente alrededor de 500 mg de SIL y se colocaron en un frasco de vidrio de boca ancha de 200 mL, con tapa. Posteriormente, Sor, PPG, PEG 400, Gli o una mezcla de ellos, fue agregado. Luego se incorporaron 60 mL de solución buffer 10 mM de citrato o fosfato, según corresponda, se tapó el frasco y se sonicó durante 20 min. A continuación, las muestras fueron agitadas a 220 rpm durante 72 h a 37°C. Finalmente, el contenido de cada frasco fue trasvasado cuantitativamente a un matraz de 100 mL, se completó a volumen con el buffer correspondiente y se filtró.

2.6.2.2 Análisis de enmascaramiento del sabor

Se realizó el ensayo de palatabilidad de las formulaciones en base a la percepción de diez voluntarios sanos de entre 30 y 50 años. Se diluyeron diferentes volúmenes de formulaciones de SIL de 2 y 4 mg mL⁻¹ en 1 mL de leche, y se incluyó una muestra de leche como referencia. Los participantes se enjuagaron la boca primero con agua y luego con 1 mL de leche antes de analizar las diferentes muestras. Cada participante tomó una muestra equivalente a 2 o 4 mg mL⁻¹ del fármaco (diluido en diferentes volúmenes de leche) en la boca durante 20 segundos y luego se la desechó⁸³. Cabe mencionar que el estudio fue llevado a cabo de manera “ciega”, es decir que los voluntarios desconocían la muestra que testeaban ya que las mismas sólo se encontraban rotuladas con códigos. Los participantes registraron la puntuación de amargura mediante una escala numérica entre 1 y 5 (1: no amargo, 2: ligeramente amargo, 3: moderadamente amargo, 4: amargo y 5: muy amargo). La media del valor medido para cada muestra permitió obtener una puntuación final de amargor⁸⁴.

2.6.3 Gotas de Hidroclorotiazida

Las diferentes soluciones buffers fueron preparadas usando agua estéril conservada conteniendo 0,03 % p/v y 0,07% p/v de metil y propilparabeno, respectivamente.

Las formulaciones fueron elaboradas de acuerdo con el siguiente procedimiento operativo: 1) Se pesó alrededor de 200 mg de HCT en un frasco de vidrio de boca ancha con tapa de 200 mL. 2) Agregamos las cantidades correspondiente la cantidad correspondiente de Gli, Sor o PPG en cada caso hasta formar una mezcla homogénea; 3) Se incorporó con agitación, la solución buffer hasta obtener un volumen final de 80 mL aproximadamente; 4) Las sonicamos durante 20 minutos; 5) Las agitamos durante 72 h (220 rpm y 37°C); 6) Se transfirió el contenido de cada frasco a un matraz aforado de 100 mL, se enraso con el correspondiente buffer, finalmente se mezcló y filtró con papel de filtro.

2.6.4 Gotas de Furosemida

Considerando la posibilidad de pacientes con tratamiento crónico, se plantearon tres formulaciones conteniendo 2, 5 y 14,7 mg mL⁻¹ de FURO-B, para garantizar la mejor dosificación acorde al peso corporal, siendo la última, apta para pacientes adultos. A su vez, se elaboraron dos procedimientos operativos evaluando diferentes excipientes y envases.

Procedimiento 1: 1) Se pesó la cantidad de FURO-B correspondiente en cada caso considerando un volumen final de 100 mL; 2) Se agregó 50 mL de NaOH 0,1 N, preparado con agua conservada; 3) Se incorporó 10 mL de glicerina y 10 mL de sorbitol; 4) Se agitó hasta homogeneizar; 5) Se ajustó a pH 7 con ácido fosfórico (10%v/v), preparado con agua conservada; 6) Se transfirió a un matraz de 100 mL y se enraso a volumen con agua conservada; 7) Finalmente, se filtró con papel de filtro.

Procedimiento 2: 1) Se pesó la cantidad de FURO-B correspondiente en cada caso considerando un volumen final de 100 mL; 2) Se agregó 50 mL de NaOH (0,1 N), preparado con agua conservada; 3) Se ajustó a pH 7 con ácido fosfórico (10%v/v), preparado con agua conservada; 4) Se incorporó HPMC, concentración final 0,5 %p/v; 5) Se agitó hasta disolución completa; 6) Se transfirió a un matraz de 100 mL y se enraso a volumen con agua conservada; 7) Finalmente, se filtró con papel de filtro.

2.6.5 Gotas de Maleato de enalapril

Este IFA, a diferencia de los mencionados anteriormente, no presenta problemas de solubilidad, pero sí de estabilidad, la cual es dependiente del pH y la temperatura. La estabilidad del ENA fue estudiada en agua y en soluciones buffer de citrato o fosfato, cubriendo un rango de pH entre 2 y 10. Posteriormente, se evaluaron diferentes conservadores, como metil (0,03 %p/v) y propilparabeno (0,07 %p/v), benzoato de sodio (0,1%p/v) y propionato de calcio (0,28 % p/v), en la estabilidad microbiológica y su influencia en la estabilidad química de la formulación.

Todas las formulaciones se prepararon del siguiente modo: 1) Se pesó la cantidad necesaria de ENA para obtener una concentración final de 2 mg mL⁻¹; 2) Se humectó con Gli (10%v/v); 3) Se incorporó agua o solución buffer, según corresponda, agitando hasta disolución completa; 4) Se trasvasó a un matraz aforado de 100 mL, se llevó a volumen y, finalmente, se filtró con papel de filtro.

Cuando se prepararon las formulaciones para evaluar los diferentes conservantes, éstos fueron incorporados a la fase acuosa.

CAPÍTULO 3
RESULTADOS Y
DISCUSIÓN

Gotas de Atenolol

3.1 Gotas de Atenolol

La EMA ha desarrollado un inventario de las necesidades de medicamentos pediátricos para ayudar a los desarrolladores de medicamentos a identificar oportunidades³³. El ATN, un agente bloqueante de los receptores adrenérgicos $\beta^{85,86}$ recomendado para el tratamiento de la hipertensión y la arritmia en niños menores de 12 años (incluidos los recién nacidos), se incluye en el mencionado inventario.

Aunque varias formulaciones de ATN, como tabletas flotantes, tabletas mucoadhesivas, parches bucales, tabletas de desintegración rápida y matrices a base de ciclodextrinas, entre otras, se han desarrollado y analizado hace varios años^{87,88,89,90,91,92} estas formulaciones están destinadas a pacientes adultos. En los últimos años se han desarrollado un número reducido de formulaciones pediátricas, entre las que se encuentran una suspensión extemporánea de ATN⁹³, cápsulas de atenolol obtenidas a partir de comprimidos triturados⁹⁴ y un jarabe (que demostró ser estable durante 9 días a 4°C)⁹⁵. Debe tenerse en cuenta que existe una preparación líquida con licencia para adultos (jarabe de ATN) en el Reino Unido, pero su uso no está autorizado en niños⁹⁶. Por último, cabe destacar que no se encontró en la bibliografía el desarrollo de soluciones para ser administradas en forma de gotas aptas para ser usadas en pediatría.

Además, en una formulación líquida destinada a ser utilizada en niños, se deben tener en cuenta los valores máximos de concentración de algunos componentes⁹⁷. En el caso de polioles como la glicerina, la ingesta diaria aceptable no ha sido especificada por el Comité Mixto de Expertos en Aditivos Alimentarios, aunque pueden causar síntomas gastrointestinales como distensión abdominal y laxación⁹⁸. Santoveña y colaboradores han remarcado que las nuevas formas de dosificación deben ser seguras y eficaces mediante el uso del fármaco puro y con las limitaciones de los excipientes que ha recomendado la EMA⁹⁹.

3.1.1. Etapa de screening

Como ya se detalló en la introducción, los diseños Plackett-Burman y factorial fraccionario son los enfoques más adecuados para encontrar factores que contribuyan significativamente a una respuesta, realizando el número mínimo de experimentos sobre un número máximo de factores¹⁰⁰. Entre ambos diseños, en este caso se seleccionó el diseño Plackett-Burman (Tabla 3.1.1) para evaluar aquellos factores que pudieran afectar significativamente la solubilidad del ATN.

Tabla 3.1.1 Diseño Plackett-Burman para la selección de factores

| Factores | | | | | Respuestas | | |
|------------|-----|-------------|----------|-----|------------|--------|------|
| ATN %(p/v) | BpH | Tipo buffer | AV%(v/v) | AV | ATN-R (%) | T (%) | FpH |
| 4 | 2 | Fosfato | 0 | Jar | 93,73 | 100,00 | 2,13 |
| 4 | 7 | Citrato | 20 | Jar | 104,65 | 97,57 | 9,61 |
| 1 | 7 | Fosfato | 0 | Gli | 101,65 | 100,00 | 7,53 |
| 4 | 2 | Fosfato | 20 | Jar | 96,68 | 97,55 | 2,15 |
| 4 | 7 | Citrato | 20 | Gli | 100,17 | 99,62 | 9,64 |
| 4 | 7 | Fosfato | 0 | Gli | 99,95 | 100,00 | 9,16 |
| 1 | 7 | Fosfato | 20 | Jar | 102,47 | 97,21 | 7,46 |
| 1 | 2 | Fosfato | 20 | Gli | 95,31 | 99,70 | 1,95 |
| 1 | 2 | Citrato | 20 | Gli | 93,12 | 99,87 | 2,16 |
| 4 | 2 | Citrato | 0 | Gli | 97,03 | 100,00 | 2,14 |
| 1 | 7 | Citrato | 0 | Jar | 97,99 | 100,00 | 6,64 |
| 1 | 2 | Citrato | 0 | Jar | 94,52 | 100,00 | 2,03 |

ATN %(p/v): concentración de atenolol, BpH: pH de la solución buffer, AV %(v/v): concentración de agente viscosizante, AV: tipo de agente viscosizante, ATN-R (%): recuperación de atenolol, T (%): transmitancia, FpH: valor final de pH de la formulación.

Los factores analizados en el diseño Plackett-Burman fueron: concentración de ATN (mg mL⁻¹), valor de BpH, tipo y concentración de agentes viscosizantes (AV, Jar o Gli) y tipo de solución buffer (fosfato o citrato). Los rangos de factores se seleccionaron con base en el conocimiento previo sobre el sistema en estudio, como rango de dosis de ATN¹⁰¹, limitaciones de los excipientes recomendados por la EMA⁹⁸ y una formulación previa de jarabe de ATN⁹⁵.

Las respuestas analizadas fueron la recuperación de ATN (ATN-R), la transmitancia de cada sistema (T) y el valor final de pH de las formulaciones después de una semana de desarrollo (FpH). La Tabla 3.1.1 resume los resultados de las respuestas analizadas en todas las condiciones citadas.

Se aplicó una prueba de análisis de varianza, *del inglés análisis of variance*, (ANOVA) a los datos experimentales correspondientes al diseño, para obtener una estimación de los errores estándar en los coeficientes. Se concluyó que el valor de pH, BpH, el tipo de AV y la concentración de AV eran los factores más importantes (valores con $p < 0,05$, como se indica en negrita en la Tabla 3.1.2). Como era esperado, el valor de pH final de la formulación se vio afectado por el valor de BpH. Los resultados también revelaron una relación directa entre el factor AV y la respuesta T, que podría estar relacionada con una disminución de la solubilidad de ATN o con el crecimiento microbiano.

Como la recuperación de ATN no se vio afectada ni por el tipo de AV ni por la concentración de AV (Tabla 3.1.2), y teniendo en cuenta que el “jarabe” y su concentración podrían promover el crecimiento microbiano en la formulación durante el almacenamiento, estos factores deben optimizarse. Dado que el factor “concentración de ATN” no afectó ninguna respuesta, para el procedimiento de optimización se fijó su concentración en 2 mg mL⁻¹ que cubre la concentración terapéutica diaria en pediatría (0,8 a 2 mg/kg/día)^{101,102}. Asimismo, el factor (tipo de solución buffer) no afectó ninguna respuesta (Tabla 3.1.2). Sin embargo, teniendo en cuenta lo reportado por Hatem y colaboradores, quienes informaron que la máxima estabilidad del ATN se produce a pH 4¹⁰³, se seleccionó el ácido cítrico para

continuar el desarrollo. La elección se basó en los valores de pKa del ácido fosfórico (2,1; 7,2 y 12,3) y del ácido cítrico (3,4; 4,8 y 5,4). Dado que el rango útil para la mayoría de las soluciones reguladoras es 1 unidad de pH por encima o por debajo del valor de pKa¹⁰⁴, el ácido fosfórico no podría cumplir su función reguladora en este valor de pH.

Tabla 3.1.2 Valores de *p* obtenidos para los diferentes factores en las tres respuestas.

| | ATN-R (%) | T (%) | FpH |
|-------------|------------------|-------------------|-------------------|
| Modelo | 0,0372 | 0,0001 | <0,0001 |
| ATN %(p/v) | 0,3821 | 0,5790 | 0,1842 |
| BpH | 0,0031 | 0,9109 | <0,0001 |
| Tipo buffer | 0,7724 | 0,2782 | 0,4350 |
| AV %(v/v) | 0,3601 | <0,0001 | 0,1798 |
| AV | 0,7237 | <0,0001 | 0,2887 |

ATN %(p/v): concentración de atenolol, BpH: pH de la solución buffer, AV %(v/v): concentración de agente viscosizante, AV: tipo de agente viscosizante, ATN-R (%): recuperación de atenolol, T (%): transmitancia, FpH: valor final de pH de la formulación.

3.1.2. Etapa de optimización. Diseño empleado para la superficie de respuesta.

Para aplicar la metodología de superficie de respuesta se utilizó un DCC, que consistió en 17 experimentos, combinando los factores seleccionados en los siguientes rangos: BpH: 3,00-5,00, concentración de Gli: 0-20%v/v, y concentración de Jar: 0-20%v/v (Tabla 3.1.3). Todos los experimentos se realizaron en orden aleatorio para minimizar los efectos de factores no controlados que pueden introducir un sesgo en las mediciones. Como se puede observar en la Tabla 3.1.3, algunos valores de los factores están fuera de rango: BpH (2,32 y 5,68), Jar y Gli (27%v/v). Estos valores fuera de rango se deben al hecho de que hay cinco niveles de cada factor en un DCC (dos puntos factoriales, dos puntos axiales y un punto central). Los valores fuera de rango de BpH, Jar y Gli corresponden a los puntos axiales¹⁰⁵. Particularmente, en el caso de los factores de Gli y Jar, un punto axial generado por el software fue 27%v/v mientras que el otro fue un valor negativo. Los valores negativos

(uno para cada factor) se establecieron en cero para obtener las formulaciones. La Tabla 3.1.3 también muestra los resultados de las respuestas: ATN-R (%), T (%) y FpH después de una semana a temperatura ambiente (FpH-TA) y después de 6 meses almacenados en diferentes condiciones (FpH-4°C, FpH 25°C y FpH-40°C).

Tabla 3.1.3 Diseño central compuesto usado para la optimización de las respuestas

| Factores | | | Respuestas | | | | | | | |
|----------|----------|----------|------------|---------|----------|----------|--------|-------------|--------------|--------------|
| BpH | Jar %v/v | Gli %v/v | FpH-TA | FpH-4°C | FpH-25°C | FpH-40°C | T (%) | ATN-R % 4°C | ATN-R % 25°C | ATN-R % 40°C |
| 5,00 | 0 | 20 | 5,86 | 5,83 | 5,88 | 5,87 | 98,42 | 99,39 | 100,86 | 91,68 |
| 5,68 | 10 | 10 | 7,60 | 7,59 | 7,39 | 7,59 | 99,87 | 99,02 | 97,98 | 89,51 |
| 3,00 | 0 | 0 | 3,24 | 3,27 | 3,28 | 3,29 | 100,53 | 98,46 | 96,59 | 74,82 |
| 4,00 | 0 | 10 | 4,47 | 4,44 | 4,49 | 4,45 | 98,99 | 99,23 | 98,84 | 90,53 |
| 3,00 | 20 | 20 | 3,48 | 3,48 | 3,54 | 3,52 | 99,50 | 99,15 | 97,53 | 80,59 |
| 4,00 | 10 | 10 | 4,55 | 4,56 | 4,50 | 4,58 | 99,51 | 100,60 | 99,20 | 89,42 |
| 5,00 | 20 | 20 | 6,23 | 6,26 | 6,17 | 6,14 | 99,14 | 102,83 | 102,89 | 91,22 |
| 5,00 | 20 | 0 | 5,92 | 5,97 | 5,98 | 6,09 | 100,57 | 97,52 | 98,03 | 88,09 |
| 3,00 | 20 | 0 | 3,37 | 3,34 | 3,43 | 3,44 | 100,99 | 97,33 | 96,22 | 76,55 |
| 4,00 | 10 | 27 | 4,69 | 4,67 | 4,72 | 4,62 | 98,71 | 98,60 | 96,01 | 89,81 |
| 4,00 | 10 | 10 | 4,51 | 4,57 | 4,62 | 4,61 | 99,82 | 99,00 | 97,12 | 90,01 |
| 4,00 | 27 | 10 | 4,76 | 4,81 | 4,82 | 4,85 | 100,18 | 98,87 | 98,44 | 89,25 |
| 3,00 | 0 | 20 | 3,28 | 3,30 | 3,31 | 3,26 | 97,87 | 97,58 | 93,82 | 74,35 |
| 5,00 | 0 | 0 | 5,67 | 5,73 | 5,78 | 5,81 | 100,74 | 98,03 | 99,98 | 94,08 |
| 2,32 | 10 | 10 | 2,55 | 2,58 | 2,63 | 2,64 | 99,44 | 96,39 | 81,94 | 33,06 |
| 4,00 | 10 | 0 | 4,50 | 4,50 | 4,50 | 4,56 | 100,42 | 97,88 | 99,67 | 92,86 |
| 4,00 | 10 | 10 | 4,56 | 4,57 | 4,59 | 4,59 | 99,93 | 98,18 | 99,55 | 94,51 |

BpH: pH de la solución buffer, Jar %v/v: concentración de jarabe, Gli %v/v: concentración de glicerina, FpH: valor final de pH de la formulación, T (%): transmitancia, ATN-R (%): recuperación de atenolol.

Las respuestas en los 17 experimentos se ajustaron a modelos polinomiales para estimar los mejores modelos. Se obtuvo que un modelo cuadrático explica mejor los

comportamientos de las respuestas FpH (FpH-TA, FpH-4°C, FpH-25°C y FpH-40°C) y recuperación de ATN (ATN-R (%) - 25°C y ATN R (%) -40°C), mientras que un modelo 2FI es apropiado tanto para T (%) como para ATN-R (%) - 4°C. Los resultados de ANOVA parciales para este diseño mostraron buenos indicadores estadísticos (es decir, falta de ajuste no significativa ($p > 0,05$) y adecuados R^2 (0,84-0,97), modelo ($p < 0,03$) y coeficiente de variación (3,05-5,41).

Como puede apreciarse en la Tabla 3.1.3, no se observan marcadas diferencias entre FpH-TA, FpH-4°C, FpH-25°C y FpH-40°C, lo que puede mostrar la estabilidad de todas las formulaciones ensayadas. Además, las recuperaciones de ATN fueron excelentes después de 6 meses cuando se almacenaron a 4 y 25°C y solo disminuyeron en algunas formulaciones almacenadas a 40°C. Por ello, se decidió optimizar la formulación en las peores condiciones de almacenamiento (40°C y 75% HR). Debido a que era necesario optimizar varias respuestas simultáneamente, se empleó la función de deseabilidad que es una función de más de una respuesta. El procedimiento implica crear una función para cada respuesta individual (d_i) y finalmente obtener una función global D que debe maximizarse eligiendo las mejores condiciones de las variables diseñadas. Los valores de la función D van de 0 (totalmente indeseable) a 1 (todas las respuestas están simultáneamente en un rango deseable) y está definida por la Ecuación 3.1.1:

$$D = \left[\prod_{n=1}^N (d_n)^{w_n} \right]^{1/\sum_{n=1}^N w_n}$$

Ecuación 3.1.1

Donde d_1, d_2, \dots, d_n corresponden a la función de deseabilidad individual para cada respuesta que se optimiza y W_n es un peso que controla la importancia relativa de cada uno de los factores analizados.

Se optimizaron simultáneamente dos respuestas: ATN-R (%) - 40°C y T (%), y sus pesos en la Ecuación 3.1.1 se ajustaron a la unidad. Una vez realizado el procedimiento de optimización y encontrados modelos adecuados para cada una de estas respuestas, se construyó una superficie de respuesta para la función de deseabilidad global, ATN-R (%) - 40°C y T (%) en función de los factores de influencia (Figura 3.1.1).

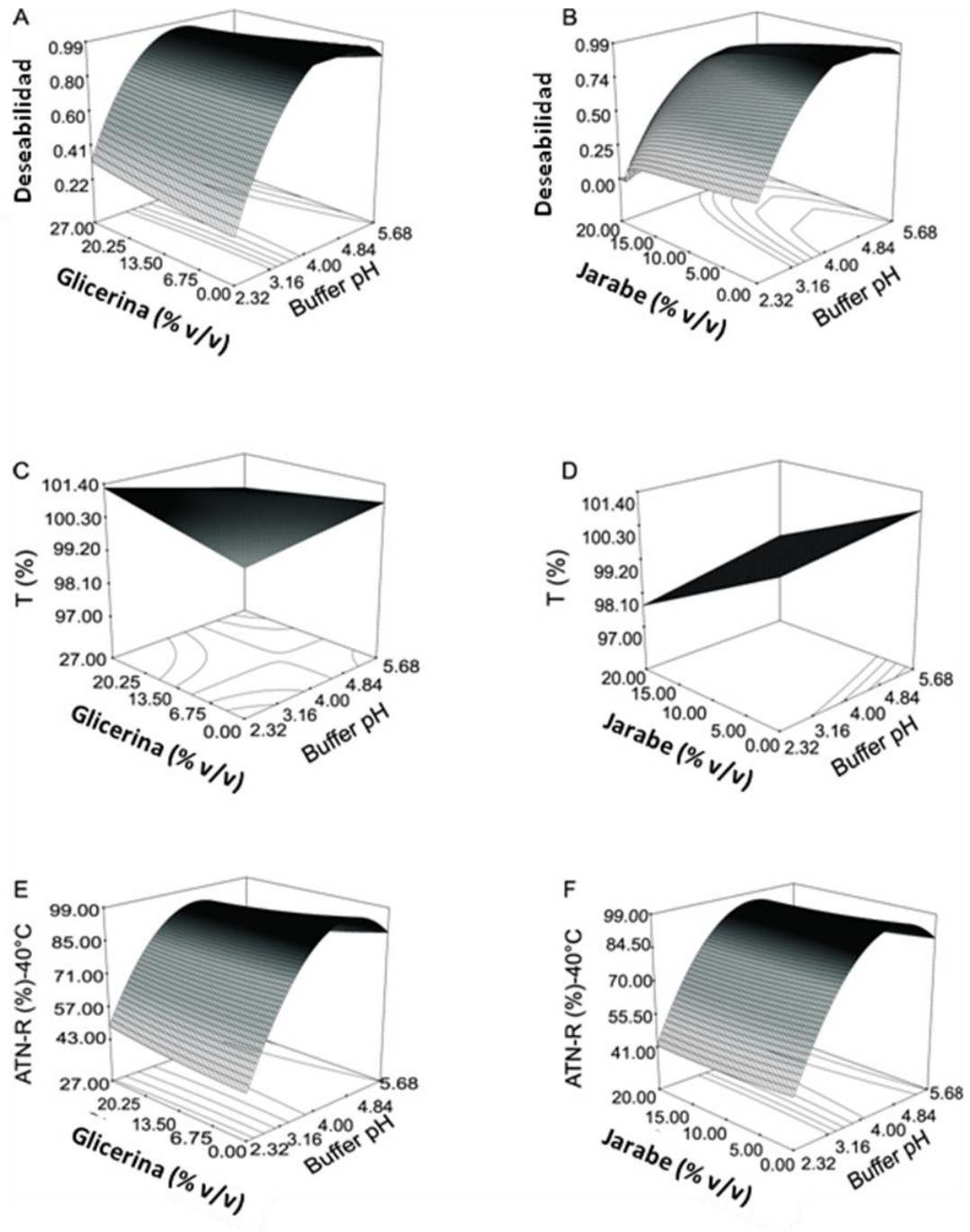


Figura 3.1.1 Gráficos de superficie de respuesta para la función de deseabilidad global, ATN-R (%) - 40°C y T (%) en función de los factores de influencia

Así, se seleccionaron como mejores condiciones las correspondientes al punto de diseño más cercano a la región sugerida por la deseabilidad. La función de deseabilidad en este punto arrojó un valor de $D = 0,982$, que consideramos adecuado para nuestros propósitos (Figura 3.1.1 A y B). Como se puede ver en la Figura 3.1.1 C, Gli no afectó a T (%), mientras que un mayor contenido de jarabe (Figura 3.1.1 D) produjo una disminución en T (%). Probablemente este resultado esté asociado con el crecimiento microbiano en la formulación. Como se observa en la Figura 3.1.1 E y F, el factor principal en la recuperación de ATN es el valor del pH de la solución reguladora, siendo la recuperación máxima a un pH de alrededor de 4,5. Ni Gli ni Jar generaron modificaciones significativas en la recuperación del fármaco.

La zona de máxima deseabilidad incluye concentraciones de Gli entre 0 a 10%v/v y valores de pH entre 4,3 a 5,0. Con base en estos resultados, se seleccionaron tres formulaciones, dos de las cuales se encuentran dentro de la región sugerida por la función de deseabilidad. La primera formulación contiene Gli como agente viscosizante a una concentración del 10%v/v y pH = 4,61 ($D = 0,982$), la segunda, basada en una mezcla de Gli y Jar al 8,28 y 9,7%v/v respectivamente y pH = 4,67 ($D = 0,951$); y la tercera formulación basada en Jar al 20%v/v y pH = 4,47 ($D = 0,819$) fuera de la zona de máxima deseabilidad (Figura 3.1.1).

En la primera formulación, la concentración de Gli se estableció en 10%v/v debido a que esta concentración se encuentra en la zona de máxima deseabilidad y también permite obtener una solución con una viscosidad adecuada. Como se mencionó anteriormente, se debe considerar aumentar la viscosidad de las soluciones que se administren en forma de gotas para reducir los errores en la dosificación¹⁰⁶. Por otro lado, la tercera formulación no fue seleccionada por el diseño ya que T (%) disminuyó cuando aumentó la concentración de Jar. Sin embargo, luego de seis meses a 40°C, esta disminución en el valor de T (%) fue menor al 2,5% (Figura 3.1.1 D); por lo tanto, decidimos incluir esta formulación para la

verificación experimental y analizar si la disminución de T (%) se debió al crecimiento microbiano.

3.1.3. Verificación experimental

Las condiciones seleccionadas para la preparación de la solución de ATN se verificaron mediante un experimento independiente adicional. Las combinaciones ensayadas, según lo indicado por el estudio de optimización, proporcionaron resultados experimentales que estaban de acuerdo con los valores predichos, mostrando diferencias que estaban en el orden del error de la medición analítica (Tabla 3.1.4) Además, no se observaron cambios detectables de color o aroma en ninguna muestra durante el almacenamiento. Estos hallazgos sugieren que el procedimiento de optimización aplicado condujo a valores confiables de los factores que influyen en la formulación estudiada.

Tabla 3.1.4 Verificación experimental

| Respuesta | F1 | | F2 | | F3 | |
|----------------|----------------|------------|----------------|------------|----------------|------------|
| | Valor predicho | Valor real | Valor predicho | Valor real | Valor predicho | Valor real |
| ATN-R (%) 40°C | 95,7% | 99,9% | 94,3% | 98,2% | 95,1% | 97,2% |
| T (%) | 100,6% | 100,2% | 99,7% | 98,6% | 98,4% | 96,6% |
| FpH-40°C | 5,38 | 5,26 | 5,48 | 5,32 | 5,12 | 5,03 |

F1: glicerina al 10% v / v pH = 4,61; F2: glicerina al 8,28% v / v, jarabe al 9,7% v / v, pH = 4,67; F3: jarabe 20% v / v, pH = 4,47.

F: Formulación, ATN-R (%): recuperación de atenolol, T (%): transmitancia, FpH: valor final de pH de la formulación.

3.1.4. Estudios de estabilidad microbiológica

El ensayo microbiológico se llevó a cabo analizando las tres formulaciones seleccionadas después de 3 y 6 meses según la monografía de productos no estériles de la Farmacopea Argentina, como se mencionó anteriormente, las formulaciones cumplen con los requisitos si el recuento microbiano aeróbico total es inferior a 10^3 UFC mL⁻¹, el recuento

total combinado de levadura / hongos es inferior a 10^2 UFC mL⁻¹ y presenta ausencia de *Escherichia coli*. A. Como se ve en la Tabla 3.1.5, se observó crecimiento microbiano en formulaciones que contenían Jar almacenado a temperatura ambiente.

Tabla 3.1.5 Estudios microbiológicos durante el almacenamiento de las preparaciones en diferentes las condiciones

| | CA | F | CMAT | CTHyL | Ec | Resultado |
|---------|--------------------|----|---------------------------|---------------------------|----------|------------------|
| 3 meses | 4±2°C | F1 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F2 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F3 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | 25±2°C | F1 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F2 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F3 | 120 | 94 | Ausencia | Cumple |
| | 40±2°C (75% RH) | F1 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F2 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F3 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| 6 meses | 4±2°C | F1 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F2 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F3 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | 25±2°C | F1 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F2 | 96 | 78 | Ausencia | Cumple |
| | | F3 | >10³ | >10² | Ausencia | No cumple |
| | 40±2°C (75% RH) | F1 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F2 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F3 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |

F1: glicerina al 10%v/v pH = 4,61; F2: glicerina al 8,28%v/v, jarabe al 9,7%v/v, pH = 4,67; F3: jarabe 20%v/v, pH = 4,47.

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación, CMAT: Conteo de microbios aerobios totales (UFC/mL) – Cumple si es <1.000, CTHyL: Conteo total de hongos y levaduras (UFC/mL) - Cumple si es <100, Ec: *Escherichia coli* – Cumple si hay ausencia

A los 3 meses de almacenamiento todas las muestras cumplieron los requisitos de la Farmacopea Argentina, sin embargo, se observó crecimiento microbiano en la formulación 3 almacenada a temperatura ambiente. Después de 6 meses de almacenamiento, ninguna formulación mostró contaminación por *E. coli*. El recuento total de bacterias fue inferior a 10^3 UFC mL⁻¹ y la contaminación por hongos también fue inferior a 10^2 UFC mL⁻¹ cuando se almacenó a 4° o 40°C. Por otro lado, cuando las muestras se almacenaron a 25°C, aquellas formulaciones que contenían Jar mostraron contaminación bacteriana y fúngica. Entre ellas, la formulación 3 basada únicamente en Jar, no pasó la prueba. Las formulaciones que contuvieron Jar no presentaron contaminación cuando se almacenaron a 4 y 40°C,

probablemente porque estas temperaturas no son adecuadas para el crecimiento microbiano. Las temperaturas inferiores a 10°C pueden inhibir el crecimiento en lugar de perder la viabilidad celular, mientras que las temperaturas superiores a 45°C pueden afectar la viabilidad de los microorganismos (excepto las esporas termofílicas)⁸², siendo el rango de temperatura óptimo para el crecimiento del microorganismo ensayado entre 25°C y 35°C¹⁰⁷. En este trabajo, el desarrollo de las formulaciones no se realizó en condiciones estériles, ya que la formulación multidosis estará expuesta a contaminación ambiental una vez abierta. Las tres formulaciones seleccionadas cumplieron con las especificaciones de la Farmacopea Argentina sobre el examen microbiano de productos no estériles durante los 90 días de ensayo. La solución líquida oral a base de Jar probablemente mostró contaminación microbiológica debido al hecho de que la concentración de sacarosa es mucho menor que en una formulación de Jar (85%p/v). Por lo tanto, la solución tiene una presión osmótica baja que resulta incapaz de controlar el crecimiento microbiano. Además, la sacarosa actúa como nutriente en algunos medios de cultivo de microorganismos. Ambas razones podrían ser la causa de la contaminación de las formulaciones líquidas orales que contienen Jar al 20%v/v. Por otro lado, la glicerina ha mostrado actividad antimicrobiana cuando se usa en concentraciones inferiores al 20%v/v⁵⁹. En este trabajo, la concentración de Gli en las formulaciones 1 y 2 fue inferior al 10%v/v, lo que podría explicar los resultados obtenidos en la Tabla 3.1.5. Los resultados indicaron que las formulaciones a base de Gli y Gli/Jar cumplieron con las especificaciones de la Farmacopea Argentina incluso después de ser almacenado durante 6 meses.

3.1.5. Estudios de estabilidad química

Como se ha mencionado, los estudios de estabilidad se efectúan para determinar el periodo de tiempo y las condiciones de almacenamiento en las cuales las materias primas y las preparaciones oficiales se mantienen dentro de las especificaciones sobre identidad, potencia y pureza. En este caso, se evaluaron las recuperaciones de las tres formulaciones a los 0, 3, 6 y 12 meses en las tres condiciones de almacenamiento en envases gotero de

30 mL de vidrio tipo III color ámbar. Dado que la formulación 3 no superó el control microbiológico, fue desestimada para su control de estabilidad química a los 12 meses.

Las formulaciones 1 y 2 conservadas a temperatura ambiente y en heladera, resultaron ser estables químicamente al menos 12 meses desde su elaboración (Tabla 3.1.6)

Tabla 3.1.6 Estudios de estabilidad acelerados y a largo plazo.

| CA | F | 0 mes | 3 meses | 6 meses | 12 meses |
|-------------------|----|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 4±2°C | F1 | 99,8 ± 0,7 | 101,3 ± 0,9 | 100,5 ± 1,1 | 99,8 ± 0,6 |
| | F2 | 100,1 ± 1,1 | 99,9 ± 0,3 | 100,1 ± 0,8 | 99,7 ± 0,5 |
| | F3 | 99,2 ± 0,5 | 101,1 ± 0,4 | 99,7 ± 0,5 | - |
| 25±2°C | F1 | 99,8 ± 0,3 | 100,8 ± 0,9 | 100,3 ± 0,8 | 98,8 ± 0,6 |
| | F2 | 100,1 ± 0,5 | 99,7 ± 0,6 | 100,9 ± 0,7 | 100,7 ± 0,4 |
| | F3 | 99,2 ± 0,2 | 101,2 ± 1,1 | 100,4 ± 0,5 | - |
| 40±2°C (75%HR) | F1 | 99,8 ± 0,5 | 100,7 ± 0,6 | 100,1 ± 0,6 | |
| | F2 | 100,1 ± 0,7 | 102,5 ± 1,3 | 98,2 ± 0,2 | |
| | F3 | 99,2 ± 0,2 | 98,9 ± 0,5 | 97,2 ± 0,3 | |

F1: glicerina al 10%v/v pH = 4,61; F2: glicerina al 8,28%v/v, jarabe al 9,7%v/v, pH = 4,67; F3: jarabe 20%v/v, pH = 4,47.

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación.

La Figura 3.1.2 muestra los cromatogramas correspondientes a las tres formulaciones desarrolladas, a los seis meses de su elaboración. El pico principal, con tiempo de retención de 10,5 minutos, corresponde a ATN. El segundo pico, con un tiempo de retención de 9,4 minutos, corresponde a la solución reguladora de citrato y no se observa la aparición de picos extras, que podrían asociarse a la matriz o productos de degradación.

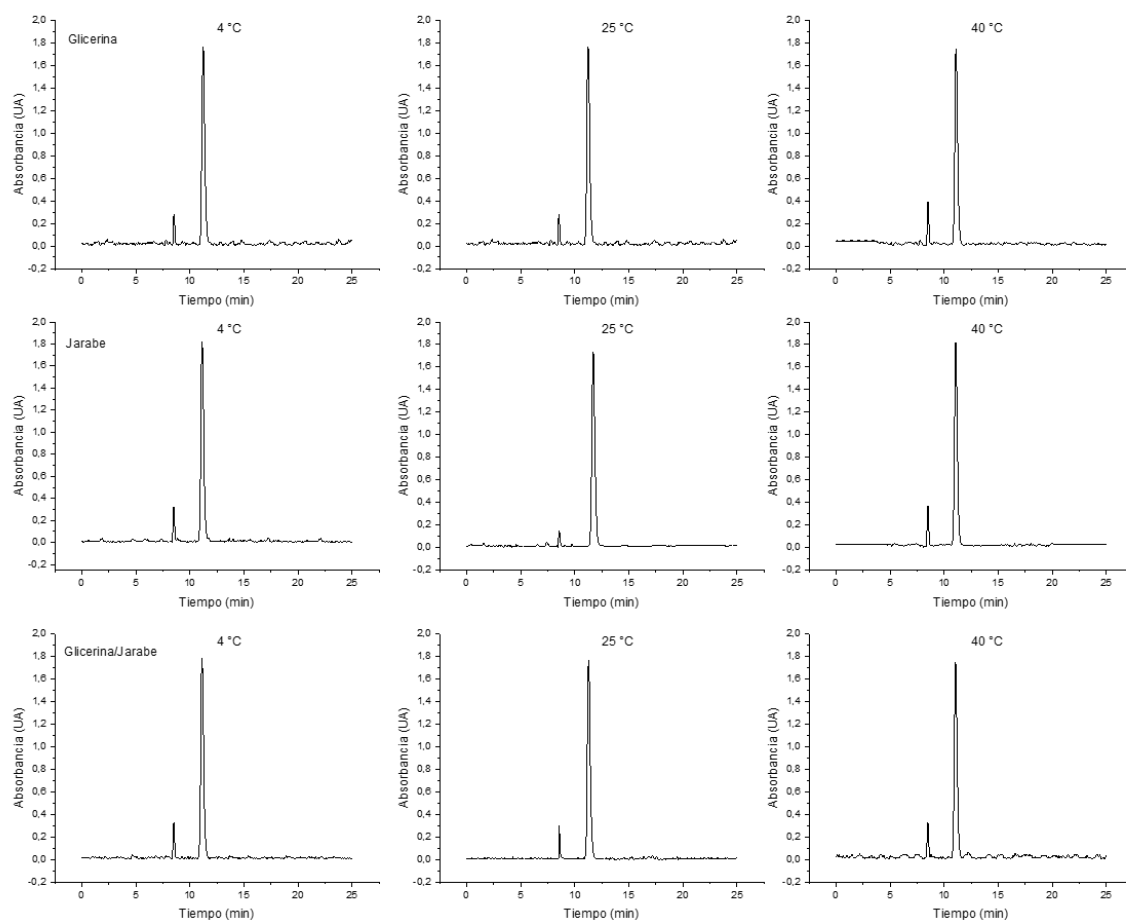


Figura 3.1.2 Cromatogramas correspondientes a las tres formulaciones desarrolladas, a los seis meses de su elaboración.

A los fines de evaluar la influencia del envase en la estabilidad química de ATN, la formulación 1 fue almacenada en envases de 30 mL de polietileno de media densidad, con inserto de polietileno de baja densidad y tapa de polipropileno en las mismas condiciones de almacenamiento. Esta formulación fue seleccionada considerando los resultados microbiológicos obtenidos con anterioridad. La Tabla 3.1.7 resume los datos obtenidos de recuperación de ATN mensuales.

Tabla 3.1.7 Recuperaciones ATN en envase de polietileno de media densidad de F1

| CA | 0 mes | 1 mes | 2 meses | 3 meses | 4 meses | 5 meses | 6 meses |
|-------------------|----------|-----------|----------|-----------|----------|----------|----------|
| 4±2°C | 99,6±0,8 | 99,15±0,3 | 99,2±0,3 | 100,9±0,1 | 97,4±0,5 | 97,1±0,2 | 96,9±0,4 |
| 25±2°C | 99,6±0,8 | 99,87±0,9 | 98,7±0,3 | 101,1±0,3 | 97,9±0,4 | 96,9±1,3 | 96,5±0,4 |
| 40±2°C (75%HR) | 99,6±0,8 | 101,3±0,3 | 98,9±0,2 | 100,7±0,2 | 98,3±0,4 | 96,4±0,4 | 96,5±0,3 |

CA: Condición de almacenamiento

Para determinar si el tipo de envase empleado influía significativamente en la recuperación de ATN, se aplicó un test “t” (Ecuación 3.1.2) a las muestras almacenadas en ambos envases a cada temperatura. Bajo el supuesto de la hipótesis nula, la diferencia de medias es igual a cero, con lo que el valor de t será también igual a cero. Cuanto más se aleje t de ese valor, menos probable será que la diferencia observada se deba al azar.

$$t = \frac{[\bar{x}_1 - \bar{x}_2]}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$$

Ecuación 3.1.2

Donde

\bar{x}_1 : media de la primera muestra

\bar{x}_2 : media de la segunda muestra

S_1^2 : varianza de la primera muestra

S_2^2 : varianza de la segunda muestra

n_1 : tamaño de muestra de la primera muestra

n_2 : tamaño de muestra de la segunda muestra

Los resultados de las recuperaciones de ATN a tiempo 0, 3 y 6 meses y el valor del test t calculado para cada temperatura, se muestran en la Tabla 3.1.8

Tabla 3.1.8 Resultados de las recuperaciones obtenidas de ATN en ambos envases

| CA | | 0 mes | 3 meses | 6 meses | Promedio | Varianzas | t _{calculado} |
|-------------------|--------|-------|---------|---------|----------|-----------|------------------------|
| 4±2°C | Vidrio | 99,8 | 101,3 | 101,5 | 100,86 | 0,865 | 2,23 |
| | EP | 99,6 | 100,9 | 96,9 | 99,13 | 4,16 | |
| 25±2°C | Vidrio | 99,8 | 100,8 | 100,3 | 100,3 | 0,25 | 0,645 |
| | EP | 99,6 | 101,1 | 96,5 | 99,06 | 5,52 | |
| 40±2°C (75%HR) | Vidrio | 99,8 | 100,7 | 100,1 | 100,2 | 0,212 | 1,63 |
| | EP | 99,6 | 100,7 | 96,5 | 98,93 | 4,75 | |

CA: Condición de almacenamiento, EP: Envase de polietileno de media densidad, $t_{\text{tabla}(0,05;4)} = 2,78$

Dado que los t calculados son menores al valor de t_{tabla} , no se puede rechazar la hipótesis de medias iguales, por lo que las recuperaciones encontradas para ambos envases son iguales. Los resultados obtenidos en ambos casos se encuentran dentro de las especificaciones farmacopeicas (90-110%), sin observarse una influencia significativa del envase seleccionado, en las recuperaciones de ATN.

3.1.6. Conclusiones

En este capítulo se desarrolló una formulación líquida de ATN mediante el análisis racional de la influencia de los diferentes excipientes utilizados. El procedimiento involucró las siguientes cuatro fases: (1) selección de los factores influyentes, (2) construcción de un modelo de superficie de respuesta, (3) búsqueda de las formulaciones óptimas incluso en las peores condiciones de almacenamiento y (4) realización de la verificación experimental. Se seleccionaron tres formulaciones, todas las cuales cumplieron con los criterios de estabilidad química luego de seis meses en cámara a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ ($75 \pm 5\%$ RH). La prueba microbiológica mostró que las formulaciones a base de Gli y Gli/Jar cumplieron con los requisitos. Estas formulaciones, empleando excipientes en un rango recomendado por la

EMA, mostraron estabilidad química y microbiológica durante al menos 6 meses incluso en las peores condiciones de almacenamiento. Finalmente, se evaluó la influencia de dos tipos de envases, vidrio color ámbar tipo III y envases de polietileno de media densidad, con inserto de polietileno de baja densidad y tapa de polipropileno, en la estabilidad la formulación conteniendo Gli (10%v/v). Los resultados obtenidos luego de aplicar un test “t”, demostraron que no existe diferencia significativa en la recuperación de ATN cuando se emplearon los envases estudiados. Teniendo en cuenta estos resultados, estas formulaciones de ATN podrían considerarse adecuadas para su potencial uso en pacientes pediátricos.

Gotas de Citrato de Sildenafil

3.2 Gotas de citrato de sildenafil

Se ha informado que la dosis diaria efectiva de SIL en pacientes pediátricos (peso corporal de 8 a 20 kg) con hipertensión arterial pulmonar es de 10 (media) a 20 mg (alta), tres veces al día¹⁰⁸. En los últimos años, se ha desarrollado una pequeña cantidad de formulaciones para pacientes pediátricos. Entre ellos, Provenza y colaboradores diseñaron dos formulaciones orales pediátricas de SIL que contienen buffer citrato, (una suspensión y una solución, ambas con una concentración de 2 mg mL⁻¹), siendo la solución apta para pacientes diabéticos. Desde el punto de vista fisicoquímico y microbiológico, la suspensión se mantuvo estable durante 3 meses (a 4 y 25 °C), mientras que a 40 °C el contenido de fármaco se mantuvo constante durante 2 meses. Por otra parte, la solución fue estable durante 1 mes (almacenada a 25 y 40 °C); sin embargo, almacenada a 4 °C, a partir del día 15 se registraron concentraciones de SIL por debajo del 90%. Los autores concluyeron que esta reducción en la concentración del fármaco estuvo relacionada con la aparición de sedimentos no redispersables, lo que sugiere una disminución de la solubilidad de SIL a baja temperatura¹⁰⁹. Por otro lado, Bellir y colaboradores desarrollaron una solución de SIL partiendo de comprimidos del fármaco molidos, a los cuales se los solubilizó en jarabe simple (1,25 mg mL⁻¹), esta solución se almacenó a 5 °C, pero solo se mantuvo estable durante 4 semanas¹¹⁰.

Teniendo en cuenta la falta de soluciones líquidas estables como gotas de SIL aptas para su uso en pediatría, el propósito de este capítulo fue desarrollar una formulación líquida estable (química y microbiológicamente) de gotas del mencionado IFA. Esta formulación deberá ser adecuada para pacientes pediátricos (incluidos los diabéticos), desarrollada con un número mínimo de excipientes, que garanticen la seguridad durante la preparación y el almacenamiento, y con una palatabilidad adecuada cuando se emplee leche como vehículo para la administración.

3.2.1. Diseño Plackett-Burman

Basadas en el diseño de Plackett-Burman (Tabla 3.2.1) se prepararon doce formulaciones. Las concentraciones y composiciones de las formulaciones se seleccionaron en base al conocimiento previo sobre el sistema en estudio, como el rango de dosis de SIL y las limitaciones de los excipientes recomendados por la EMA¹¹¹. Una primera evaluación consistió en analizar la máxima solubilidad de SIL alcanzada en todas las condiciones citadas en la Tabla 3.2.1.

Tabla 3.2.1 Diseño Plackett-Burman. Composición y recuperación de SIL en las formulaciones

| F | Sor (%) | PPG (%) | PEG 400 (%) | Gli (%) | BpH | Tipo Buffer | Solubilidad de SIL | |
|----|---------|---------|-------------|---------|-----|-------------|--------------------|---------------------|
| | | | | | | | % | mg mL ⁻¹ |
| 1 | 0 | 10 | 0 | 10 | 7 | citrato | 39,2 | 1,92 |
| 2 | 10 | 0 | 10 | 10 | 3 | fosfato | 85,6 | 4,28 |
| 3 | 10 | 10 | 10 | 0 | 3 | citrato | 34,9 | 1,74 |
| 4 | 0 | 10 | 10 | 0 | 7 | fosfato | 84,7 | 4,23 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | citrato | 19,3 | 0,97 |
| 6 | 10 | 0 | 0 | 0 | 7 | citrato | 23,7 | 1,18 |
| 7 | 0 | 0 | 10 | 0 | 7 | fosfato | 87,7 | 4,38 |
| 8 | 10 | 10 | 0 | 0 | 3 | fosfato | 75,3 | 4,06 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 10 | 3 | fosfato | 93,1 | 4,65 |
| 10 | 0 | 10 | 10 | 10 | 3 | citrato | 36,2 | 1,81 |
| 11 | 10 | 10 | 0 | 10 | 7 | fosfato | 90,3 | 4,51 |
| 12 | 10 | 0 | 10 | 10 | 7 | citrato | 47,5 | 2,37 |

F: Formulación, Sor: sorbitol, PPG: propilenglicol, PEG 400: polietilenglicol 400, GLI: glicerina, BpH: pH de la solución buffer

Se aplicó una prueba ANOVA a los datos experimentales y se concluyó que el modelo fue significativo ($p = 0,0004$), y que el tipo de solución buffer utilizado en la formulación fue el factor más importante entre los componentes ($p < 0,0001$), seguido por el codisolvente Gli ($p = 0,0245$), mientras que los restantes factores no influenciaron la solubilidad del SIL ($p > 0,05$) (Tabla 3.2.2). El coeficiente de determinación del modelo (R^2) fue 0,9801. Se encontró que los valores de R^2 ajustados y predichos fueron 0,9561 y 0,8851, respectivamente, lo que indica la bondad del ajuste del modelo.

Tabla 3.2.2 Test ANOVA del diseño Plackett-Burman

| Fuente | Suma de cuadrados | df | Cuadrado medio | F value | p-value | |
|----------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|---------------|
| Modelo | 8853,06 | 6 | 1475,51 | 40,94 | 0,0004 | significativo |
| Sor | 0,69 | 1 | 0,69 | 0,019 | 0,8952 | |
| PPG | 1,18 | 1 | 1,18 | 0,033 | 0,8637 | |
| PEG 400 | 106,34 | 1 | 106,34 | 2,95 | 0,1465 | |
| Gli | 364,21 | 1 | 364,21 | 10,11 | 0,0246 | |
| pH | 69,16 | 1 | 69,16 | 1,92 | 0,2246 | |
| Tipo de buffer | 8311,48 | 1 | 8311,48 | 230,64 | <0,0001 | |
| Residuos | 180,18 | 5 | 36,04 | | | |
| Total | 9033,24 | 11 | | | | |

Sor: sorbitol, PPG: propilenglicol, PEG 400: polietilenglicol 400, Gli: glicerina

Dado que los factores Sor, PPG y PEG 400 no afectaron la solubilidad del fármaco, se seleccionó Gli como codisolvente para el desarrollo de las siguientes formulaciones. Gli no solo promueve la solubilidad del IFA, sino que también puede usarse como agente viscosizante sin la necesidad de incorporar otro excipiente en la formulación. Teniendo en cuenta esto, para estudiar la estabilidad de las formulaciones se analizó la presencia del cosolvente a tres concentraciones (mínima 5%, intermedia 12,5% y máxima 20%v/v).

Por otra parte, dado que el tipo de buffer fue el factor más significativo (Tabla 3.2.2) y teniendo en cuenta que las mejores recuperaciones de SIL fueron obtenidas cuando se empleó buffer fosfato, éste fue seleccionado para el procedimiento de optimización. Cabe mencionar que la solubilidad del fármaco en buffer citrato fue incluso menor a la obtenida en agua (alrededor de 3 mg mL^{-1})¹¹². Este hecho podría deberse a que el buffer citrato probablemente produce una precipitación inducida por efecto del “salting out” ejercido por la presencia del ácido cítrico, reduciendo la solubilidad del SIL¹¹³. Finalmente, aunque el valor de pH de las formulaciones ha demostrado no ser significativo en la solubilidad del fármaco ($p = 0,2246$), ha sido informada la influencia del pH en la recuperación de SIL luego del almacenamiento^{114,115}. Basados en esto, y debido al hecho de que el objetivo de este trabajo es desarrollar gotas de SIL estables en el tiempo, el valor de pH de las formulaciones para análisis posteriores se fijó en 4,5.

3.2.2. Estudios de estabilidad química

En base a los resultados obtenidos de solubilidad y teniendo en cuenta que la estabilidad es un parámetro clave para obtener un producto de calidad, se desarrollaron diferentes formulaciones conteniendo 2 mg mL^{-1} basadas en buffer fosfato (pH 4,5) y Gli (en concentración mínima, media y máxima). Cada formulación realizada por triplicado se almacenó durante 6 meses en diferentes condiciones. Los resultados de recuperación luego del almacenamiento se presentan en la Tabla 3.2.3. Como puede observarse, se obtuvieron recuperaciones superiores al 95% en todas las condiciones de almacenamiento y empleando diferentes contenidos de Gli. La concentración de Gli puede ser variada entre el 5 y 20%v/v para ajustar la viscosidad de la gota sin afectar la estabilidad de SIL.

Tabla 3.2.3 Recuperación de SIL (2 mg mL⁻¹) después de 6 meses de almacenamiento.

| F | Gli (%v/v) | SIL-R (%) 4 °C | SIL-R (%) 25 °C | SIL-R (%) 40 °C |
|---------------------|------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | 5 | 102,7± 0,1 | 99,4± 0,4 | 103,3± 0,3 |
| F1 | 5 | 102,8± 0,3 | 101,4± 0,3 | 102,4± 0,2 |
| | 5 | 99,2± 0,3 | 99,9± 0,3 | 98,7± 0,5 |
| Recuperación global | | 101,5±0,3 | 100,2±0,4 | 101,4±0,2 |
| | 12,5 | 100,9± 0,3 | 101,4± 0,3 | 100,9± 0,2 |
| F2 | 12,5 | 100,2± 0,3 | 97,3± 0,2 | 101,8± 0,3 |
| | 12,5 | 99,3± 0,1 | 102,3± 0,5 | 98,9± 0,3 |
| Recuperación global | | 100,1±0,2 | 100,3±0,5 | 100,5±0,3 |
| | 20 | 97,3± 0,2 | 103,2± 0,2 | 101,7± 0,2 |
| F3 | 20 | 97,7± 0,1 | 102,4± 0,5 | 98,7± 0,5 |
| | 20 | 101,5± 0,2 | 101,6± 0,2 | 102,7± 0,4 |
| Recuperación global | | 99,0±0,2 | 102,4±0,3 | 101,0±0,5 |

F: Formulación, Gli: glicerina; SIL-R: Recuperación de Citrato de Sildenafil

A continuación, se llevó a cabo el mismo procedimiento para las tres formulaciones conteniendo 4 mg mL⁻¹ de SIL, y las recuperaciones obtenidas se presentan en la Tabla 3.2.4. Se encontró que, después de seis meses de almacenamiento, las muestras no presentaron precipitados, cambios de coloración o turbidez independientemente de la condición de almacenamiento. Adicionalmente, las recuperaciones del IFA en las diferentes formulaciones después de 6 meses almacenadas en las distintas condiciones de almacenamiento (4, 25 y 40 °C) fueron muy similares, no mostrando diferencias entre sí ($p > 0,05$). Cabe mencionar que no se observó cristalización en muestras almacenadas a 4°C, lo que indica la idoneidad de la formulación incluso a bajas temperaturas. Este resultado indica que todas las formulaciones son estables al menos durante 6 meses independientemente de la temperatura a la que sean almacenadas.

Tabla 3.2.4 Recuperación de SIL (4 mg mL⁻¹) después de 6 meses de almacenamiento

| F | Gli (%v/v) | SIL-R (%) 4 °C | SIL-R (%) 25 °C | SIL-R (%) 40 °C |
|---------------------|------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | 5 | 101,0± 0,2 | 100,6± 0,5 | 101,2± 0,2 |
| F4 | 5 | 99,1± 0,3 | 101,6± 0,2 | 102,7± 0,3 |
| | 5 | 99,9± 0,2 | 101,7± 0,3 | 102,0± 0,5 |
| Recuperación global | | 100,1±0,3 | 101,3±0,4 | 101,4±0,2 |
| | 12,5 | 101,6± 0,2 | 102,6± 0,2 | 101,6± 0,4 |
| F5 | 12,5 | 101,5± 0,4 | 101,4± 0,5 | 101,8± 0,4 |
| | 12,5 | 100,9± 0,1 | 103,8± 0,2 | 99,8± 0,3 |
| Recuperación global | | 101,3±0,2 | 102,6±0,5 | 101,1±0,3 |
| | 20 | 100,0± 0,4 | 103,7± 0,2 | 101,4± 0,2 |
| F6 | 20 | 101,8± 0,5 | 101,5± 0,3 | 101,1± 0,5 |
| | 20 | 100,5± 0,5 | 102,1± 0,3 | 101,4± 0,3 |
| Recuperación global | | 100,8±0,2 | 102,4±0,3 | 101,3±0,5 |

F: Formulación, Gli: glicerina; SIL-R: Recuperación de Citrato de Sildenafil

Al igual que para las gotas conteniendo 2 mg mL⁻¹, se encontraron recuperaciones superiores al 95%, en todas las condiciones de almacenamiento y contenido de Gli. Es posible variar el contenido de Gli entre 5 y 20%v/v, sin detrimento en la recuperación de SIL.

3.2.3. Estudios de estabilidad microbiológica

El ensayo se llevó a cabo analizando las seis formulaciones seleccionadas. En la Tabla 3.2.5 se presentan los resultados correspondientes a las formulaciones conteniendo 2 mg mL⁻¹ de SIL, mientras que en la Tabla 3.2.6 los correspondiente a aquellas que contienen 4 mg mL⁻¹ del fármaco. El estudio se realizó de acuerdo con la monografía de la Farmacopea Argentina de productos no estériles a los 3 y 6 meses, se evaluó el crecimiento microbiano en las diferentes condiciones de almacenamiento. Como se ha mencionado, las formulaciones orales líquidas cumplen con el ensayo microbiológico si el recuento

microbiano aeróbico total es menor de 10^3 UFC mL⁻¹, el recuento total combinado de levadura / hongos es menor de 10^2 UFC mL⁻¹ y se confirma la ausencia de *Escherichia coli*. En el tiempo 3 y 6 meses, todas las soluciones cumplieron los requisitos de la Farmacopea Argentina independientemente de la condición de almacenamiento. Este hecho podría deberse a la adecuada actividad antimicrobiana obtenida de la combinación metilparabeno (0,07%p/v) y propilparabeno (0,03%p/v) utilizados en los diferentes sistemas y en las soluciones buffer, sumado a que ha sido informado que la glicerina a bajas concentraciones muestra actividad antimicrobiana^{59,116}.

Tabla 3.2.5 Conteo de microorganismos en las diferentes formulaciones de SIL (2 mg mL⁻¹) y condiciones de almacenamiento.

| | CA | F | CMAT | CTHyL | Ec | Resultado |
|---------|--------------------|----|------|-------|----------|-----------|
| 3 meses | 4±2°C | F1 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F2 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F3 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | 25±2°C | F1 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F2 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F3 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | 40±2°C (75% RH) | F1 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F2 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F3 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| 6 meses | 4±2°C | F1 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F2 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F3 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | 25±2°C | F1 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F2 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F3 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | 40±2°C (75% RH) | F1 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F2 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F3 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |

F1: glicerina 5%v/v; F2: glicerina 12.5%v/v; F3: glicerina 20%v/v.

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación, CMAT: Conteo de microbios aerobios totales (UFC/mL) – Cumple si es <1.000, CTHyL: Conteo total de hongos y levaduras (UFC/mL) - Cumple si es <100, Ec: *Escherichia coli* – Cumple si hay ausencia

Tabla 3.2.6 Conteo de microorganismos en las diferentes formulaciones de SIL (4 mg mL⁻¹) y condiciones de almacenamiento

| | CA | F | CMAT | CTHyL | Ec | Resultado |
|---------|--------------------|----|------|-------|----------|-----------|
| 3 meses | 4±2°C | F4 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F5 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F6 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | 25±2°C | F4 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F5 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F6 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | 40±2°C (75% RH) | F4 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F5 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F6 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| 6 meses | 4±2°C | F4 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F5 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F6 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | 25±2°C | F4 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F5 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F6 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | 40±2°C (75% RH) | F4 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F5 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F6 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |

F4: glicerina 5%v/v; F5: glicerina 12.5%v/v; F6: glicerina 20%v/v.

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación, CMAT: Conteo de microbios aerobios totales (UFC/mL) – Cumple si es <1.000, CTHyL: Conteo total de hongos y levaduras (UFC/mL) - Cumple si es <100, Ec: Escherichia coli – Cumple si hay ausencia

3.2.4. Análisis del enmascaramiento del sabor

La EMA incentiva el desarrollo de soluciones orales como gotas y concentrados (de volúmenes de dosis muy pequeños), con recomendaciones de dilución en una bebida, frecuentemente leche o jugo de frutas, para mejorar la palatabilidad^{111,117}. Soulele y colaboradores concluyeron que las formulaciones a base de leche son un enfoque novedoso, simple y fisiológicamente amigable para la administración de medicamentos, aprovechando las propiedades gastroprotectoras y de enmascaramiento del sabor de la leche¹¹⁸. Por otra parte, la leche no solo se ha utilizado para mejorar la palatabilidad de formulaciones líquidas, sino también como excipiente en formulaciones sólidas^{83,119,120}.

En base a esto, las formulaciones conteniendo el fármaco (2 y 4 mg mL⁻¹) y la mínima y máxima concentración de glicerina, se diluyeron en diferentes volúmenes de leche (Figura 3.2.1) lo que puede ser un método fácil para administrar el medicamento a bebés y

niños¹¹¹. Teniendo en cuenta que SIL puede tener un sabor amargo o desagradable, la palatabilidad de las formulaciones se determinó en un estudio aleatorizado realizado por 10 voluntarios humanos sanos^{121,122}. El amargor de las diferentes formulaciones se registró mediante una escala numérica (Figura 3.2.1 A y B).

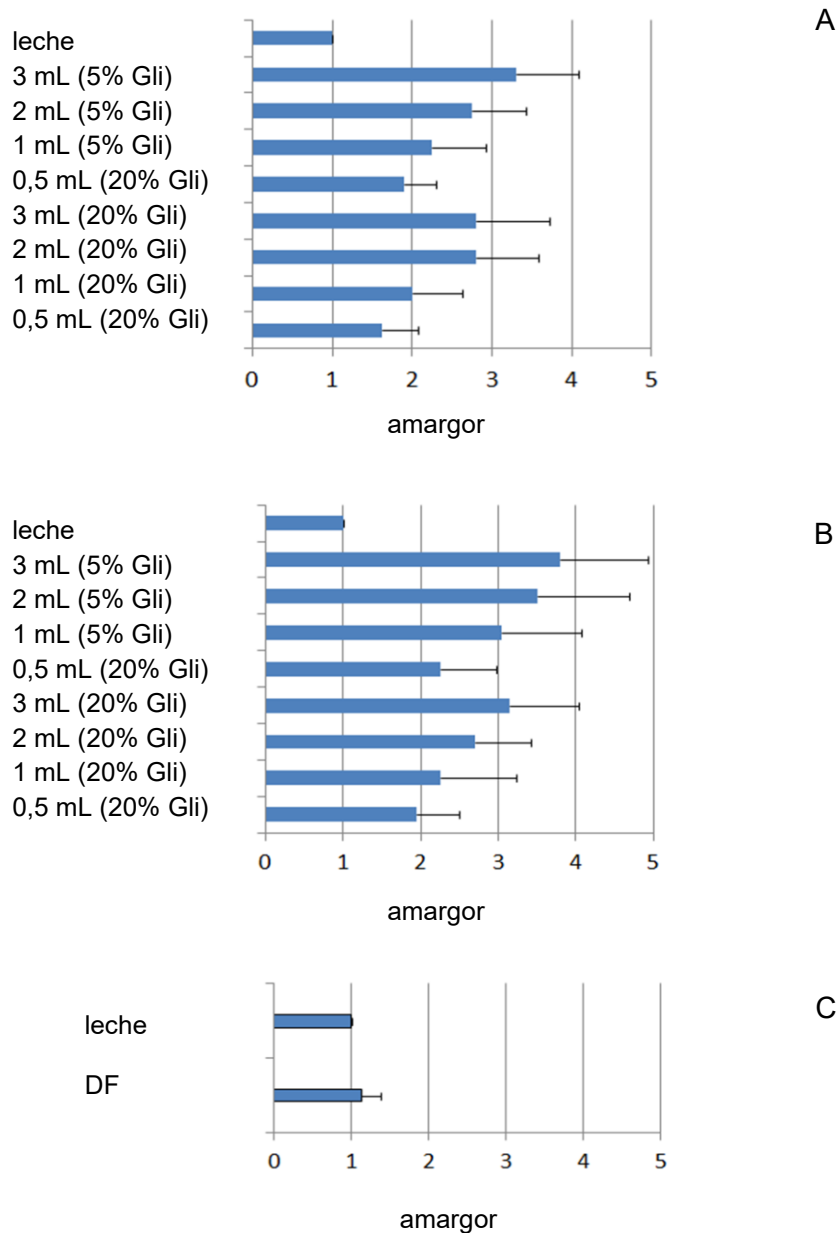


Figura 3.2.1 Amargor del citrato de sildenafil

(A) diferentes volúmenes de solución de 2 mg mL⁻¹ diluida en 1 ml de leche, (B) diferentes volúmenes de solución de 4 mg mL⁻¹ diluida en 1 mL de leche y (C) dilución final (DF): 0,82 mL de citrato de sildenafil (4 mg mL⁻¹) conteniendo 20% de glicerina diluida en 4,18 mL de leche.

Como puede apreciarse en la Figura 3.2.1 A y B, ni la concentración de SIL (2 o 4 mg mL⁻¹) ni la concentración de glicerina (5 o 20%) mostraron diferencias significativas en la palatabilidad ($p > 0.05$). Sin embargo, se puede observar una tendencia, la concentración más baja del fármaco (2 mg mL⁻¹) y los volúmenes más pequeños de la formulación diluida en 1 mL de leche produjeron menos amargor. Debido a que la dosis media recomendada para el tratamiento de pacientes pediátricos (1-8 kg) con hipertensión arterial pulmonar es de 10 mg al día¹⁰⁸, se decidió analizar un volumen de 0,82 mL de SIL 4 mg mL⁻¹ (conteniendo 20% de glicerina) diluido en 4,18 mL de leche. Esta dilución final (DF) con un volumen de 5 mL, se ajusta a la dosis requerida para cada administración. Como se aprecia en la Figura 3.2.1 C, la palatabilidad de la DF fue ligeramente amarga en comparación con la leche (puntuación $1,2 \pm 0,2$), sin mostrar diferencias significativas entre ellas.

La formulación final diluida en leche mostró adecuadas características organolépticas y no se observó la aparición de precipitados, turbidez o desnaturalización de la leche durante 24 horas. Esta formulación es potencialmente segura, ya que contiene únicamente glicerina como excipiente (además del buffer y los conservadores). La glicerina es mencionada por la FDA como un ingrediente inactivo seguro¹²³.

3.2.5. Conclusión

En este capítulo se evaluaron diferentes estrategias en el desarrollo de formulaciones líquidas orales de SIL destinadas a pacientes pediátricos con hipertensión pulmonar. Se prestó especial atención a los excipientes utilizados y a la palatabilidad final del producto, para asegurar la adherencia al tratamiento. El uso del diseño Plackett-Burman permitió determinar los factores que fueron significativos en la solubilidad de SIL, dando lugar a formulaciones con una concentración de fármaco en solución superior a las desarrolladas hasta el momento. Adicionalmente se utilizó el mínimo número de excipientes y una significativa reducción en el volumen de dosificación, de suma importancia en pediatría. Las soluciones conteniendo SIL a 2 mg mL⁻¹ o 4 mg mL⁻¹, Gli como cosolvente, un

regulador de pH y conservantes permitidos, cumplen con las limitaciones de excipientes que la FDA ha recomendado. Todas las formulaciones demostraron ser estables durante 6 meses en las tres condiciones analizadas. Las pruebas microbiológicas se ajustan a los requisitos de la farmacopea en el tiempo 3 y 6 meses. Finalmente, el ensayo de palatabilidad mostró que 0,82 mL de la formulación conteniendo solución reguladora de fosfato, 20% de glicerina y 4 mg mL⁻¹ de SIL, diluida en 4,8 ml de leche (que se ajusta a la dosis pediátrica media), presentó una palatabilidad similar a la de la leche sola y no se observó ningún precipitado, turbidez o desnaturalización de la leche durante un día. Teniendo en cuenta estos resultados, esta formulación debe considerarse adecuada para pacientes pediátricos, incluidos pacientes diabéticos.

Gotas de
Hidroclorotiazida

3.3 Gotas De Hidroclorotiazida

Más del 80% de los fármacos estudiados poseen una autorización comercial en forma oral tanto en la EMA como en la FDA. Sin embargo, alrededor del 50% de estas formulaciones no son apropiadas para la mayoría de los grupos pediátricos, siendo HCT uno de ellos. Adicionalmente HCT está incluida en la séptima lista de medicamentos esenciales para niños de la OMS¹²⁴. Las dosis utilizadas varían según la patología a tratar entre 2 a 4 mg/kg/día en una o dos tomas^{101,125}.

En los últimos años se han realizado numerosas publicaciones con el objetivo de desarrollar formulaciones líquidas estables de HCT. En 2009, Tagliari desarrolló una suspensión floculada de HCT a pH 3,3 conteniendo carboximetilcelulosa sódica al 0,6%, esta suspensión fue redispersable después de una suave agitación, sin embargo, no se aportaron datos respecto a su estabilidad durante el almacenamiento¹²⁶. Santoveña y colaboradores en 2012 diseñaron una formulación pediátrica de administración oral con una baja proporción de HCT, que resultó estable durante sólo tres semanas almacenadas a 5°C⁹⁹. En otro estudio de 2013, Mendes obtuvo suspensiones acuosas extemporáneas de HCT, las cuales mostraron una vida útil máxima de 7 días cuando el pH de las formulaciones se ajustó a 3,3¹²⁷. En 2017 Cirri y colaboradores desarrollaron y evaluaron una suspensión de HCT incluida en ciclodextrinas, y a su vez formando parte de nano partículas lipídicas. Los autores informaron que la suspensión fue estable por 3 meses almacenada en heladera. Sin embargo, en este estudio se empleó un método de espectroscopia UV para la evaluación de la estabilidad de la suspensión (absorbancia total a 272 nm). Cabe destacar que mediante esta metodología no puede evaluarse la influencia de los excipientes de la formulación ni determinarse la presencia de los productos de degradación que pudieran generarse durante el almacenamiento, por lo que no se lo considera un método indicador de estabilidad. Es por esto que si la cuantificación se lleva a cabo por espectroscopia UV, no puede determinarse si la disminución en el contenido de

HCT es debido a su degradación o a un menor contenido del activo en solución debido a su precipitación¹²⁸.

Por otra parte, en 2019 Binson y colaboradores desarrollaron suspensiones dispersando HCT (2 mg mL^{-1}) en un vehículo acuoso Syrspend®SF-PH4 al 6.5% (pH 4.0). Estas suspensiones presentaron una estabilidad de 60 días¹²⁹.

En la actualidad no existe una formulación comercial líquida de HCT de administración oral (solución o suspensión), posiblemente debido a su baja estabilidad en solución acuosa; por lo tanto, el desarrollo de una formulación líquida es un gran desafío y representaría un avance importante en la terapéutica de la hipertensión infantil¹³⁰. Por otro lado, realizar estudios de estabilidad (de manera acelerada y a largo plazo) en diferentes condiciones de almacenamiento de la formulación desarrollada, determinando el producto principal y los posibles productos de degradación, resulta parte integral del desarrollo lo que permitiría obtener una formulación segura para su administración.

En base a lo expuesto, el propósito de este capítulo fue desarrollar y optimizar, aplicando un enfoque inteligente, una formulación líquida de administración oral de HCT basada en una solución 2 mg mL^{-1} para ser utilizada en pacientes pediátricos, y determinar su estabilidad fisicoquímica y microbiológica, además de desarrollar un procedimiento operativo estándar, que pueda ser reproducido de forma sencilla y factible. Esta formulación asegurará la correcta dosificación, eficacia del tratamiento y estabilidad durante su preparación y almacenamiento.

3.3.1 Optimización de la solubilidad mediante Diseño Central Compuesto

Existen diferentes estrategias para aumentar la solubilidad de un IFA, como la utilización de cosolventes, la disminución del tamaño de partículas, cambiar el pH del medio, agregar un agente tensioactivo o la aplicación de ultrasonido pueden listarse como las más utilizadas. La estrategia planteada para obtener una formulación líquida de HCT consideró el control del pH y la incorporación de cosolventes, a fin de encontrar el estado de ionización óptimo y la mejor relación de polaridades que favorezcan la solubilidad del IFA. Para tal fin,

se planteó la realización de un diseño experimental que permita la correlación entre la concentración alcanzada del IFA y las variables que gobiernan su solubilización.

Se realizaron una serie de soluciones siguiendo un DCC, en el cual se consideraron cuatro variables independientes: A: pH de la solución buffer de citrato, B: concentración de Gli, C: concentración de PPG y D: concentración de Sor, y cada factor fue evaluado a 5 niveles (Tabla 3.3.1)

Tabla 3.3.1 Variables experimentales y sus niveles en el Diseño Central Compuesto

| Factores | Niveles | | | | |
|---------------|-----------|------|------|------|-----------|
| | $-\alpha$ | -1 | 0 | +1 | $+\alpha$ |
| A: pH | 1,75 | 2,50 | 3,25 | 4,00 | 4,75 |
| B: Gli (%v/v) | 2,5 | 5,0 | 7,5 | 10,0 | 12,5 |
| C: PPG (%v/v) | 2,5 | 5,0 | 7,5 | 10,0 | 12,5 |
| D: Sor (%v/v) | 2,5 | 5,0 | 7,5 | 10,0 | 12,5 |

Gli: glicerina, PPG: propilenglicol, Sor: sorbitol.

Los rangos de los factores se seleccionaron en base a conocimientos previos sobre el sistema en estudio, como rango de dosis de HCT¹³¹ limitaciones de los excipientes recomendados por la EMA⁹⁸ y un estudio previo de estabilidad de HCT^{132,133}.

Para el ajuste del DCC se utilizó un modelo cuadrático que evalúa las interacciones binarias entre variables y la contribución individual de cada variable en la recuperación porcentual de HCT. La relación matemática entre las variables independientes y su respuesta observada se expresó mediante un modelo polinomial cuadrático. La correlación significativa entre las variables de entrada y la respuesta para HCT se expresó mediante la Ecuación 3.3.1

El ajuste del modelo matemático se llevó a cabo por el método de cuadrados mínimos mientras que el análisis de significación de los términos del modelo se realizó mediante el ANOVA, así como el nivel de significación del modelo total. Un valor de estadística del modelo (F_{modelo}) de 36,81, indicó que el modelo fue significativo con un $\alpha=0,01\%$. Mostrando la relevancia del modelo Y.

$$Y_{\text{Rec. HCT (\%)}} = +89.44 - 0.97A + 3.63B + 5.73C + 1.26D - 3.37BC - 1.21CD - 1.51B^2 - 2.6C^2$$

Ecuación 3.3.1

Donde Y es la recuperación de HCT; A, B, C y D son los coeficientes de pH, Gli (% v/v), PPG (%v/v) y Sor (%v/v), respectivamente.

Tabla 3.3.2 Análisis de la varianza (ANOVA) para la recuperación (%) de HCT

| Fuente | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | F-Value | p-Value |
|-----------------|--------------------|-------------------|----------------|---------|----------|
| Modelo | 9 | 1450,85 | 161,21 | 36,81 | < 0,0001 |
| A: pH | 1 | 21,11 | 21,11 | 4,82 | 0,0432 |
| B: Gli | 1 | 298,12 | 298,12 | 68,07 | < 0,0001 |
| C: PPG | 1 | 741,75 | 741,75 | 169,37 | < 0,0001 |
| D: Sor | 1 | 35,83 | 35,83 | 8,18 | 0,0113 |
| BC | 1 | 165,75 | 165,75 | 37,85 | < 0,0001 |
| CD | 1 | 21,35 | 21,35 | 4,88 | 0,0422 |
| B ² | 1 | 54,65 | 54,65 | 12,48 | 0,0028 |
| C ² | 1 | 162,58 | 162,58 | 37,12 | < 0,0001 |
| Residuo | 16 | 70,07 | 4,38 | | |
| Falta de ajuste | 14 | 68,06 | 4,86 | 4,85 | 0,1839 |
| Error puro | 2 | 2,00 | 1,00 | | |
| Total | 25 | 1520,92 | | | |

Gli: glicerina, PPG: propilenglicol, Sor: sorbitol.

Los valores de probabilidad (p) inferiores a 0,05 indicaron que los términos del modelo fueron significativos. Los términos A, B, C, D, BC, CD, B² y C² resultaron significativos. La falta de ajuste del modelo (*LOF del inglés lack of fit*) evalúa cuánto se desvían los datos estimados por el modelo de las observaciones experimentales, El valor de probabilidad de p=0.1839 para la LOF del modelo implica que la falta de ajuste no fue significativa en relación con el error puro del modelo. El cuadrado del coeficiente de

determinación predicho ($R^2_{\text{pred}}=0,8754$) estuvo en concordancia con el coeficiente de determinación ajustado, $R^2_{\text{Adj.}}$, lo que indica la bondad del ajuste del modelo. En su conjunto, todos los resultados obtenidos, indican que este modelo puede ser utilizado para explorar el espacio de diseño muestreado.

3.3.2 Optimización. Metodología de superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta fue aplicada para la optimización de las variables que mejoran la solubilidad de HCT. Como se ha mencionado en el capítulo de ATN, la escala de la función de deseabilidad varía de 0,0 a 1,0, siendo los mejores resultados aquellos que se acercan al valor de 1,0 en este caso la mayor concentración de HCT en solución

En la Figura 3.3.1 se presenta la evaluación de la deseabilidad en función de la combinación de diferentes factores de dos en dos, con el solo objeto de realizar una exploración visual del espacio de diseño. Como puede observarse, al evaluar la deseabilidad en función de la concentración de Gli y el pH, el valor máximo se obtiene con una concentración media de Gli y un pH cercano a 3 (Figura 3.3.1-A). Por otra parte, la máxima deseabilidad se obtiene con una concentración de PPG entre 10 y 12,5 y un pH cercano a 3,0 (Figura 3.3.1-B), mientras que al evaluar Sor se logra la máxima deseabilidad con la mínima concentración de este cosolvente y observándose un comportamiento similar para el pH que en las otras combinaciones (Figura 3.3.1-C).

Al evaluar la combinación PPG y Gli se obtiene la máxima deseabilidad con un rango amplio de combinaciones en la que aumenta PPG y disminuye Gli (Figura 3.3.1-D), por otro lado al analizar la combinación Sor y Gli se obtiene la máxima deseabilidad en un rango de combinaciones en la que aumenta Gli y disminuye Sor (Figura 3.3.1-E), del mismo modo la deseabilidad es máxima con una concentración de PPG cercana a 12,5 y una concentración de Sor entre 2,5 y 5 (Figura 3.3.1-F), dando cuenta de la marcada interacción entre factores.

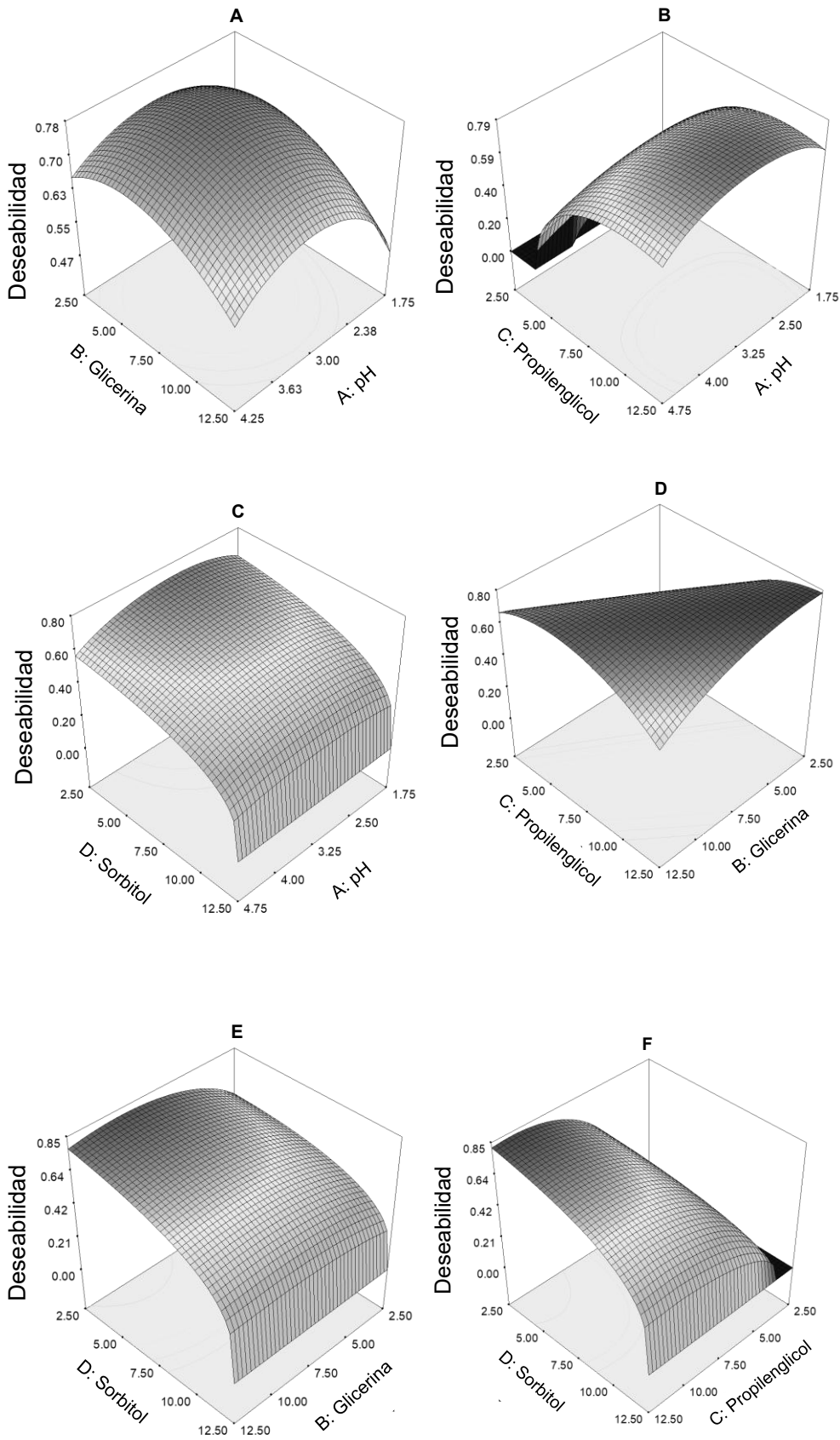


Figura 3.3.1 Deseabilidad en función de los diferentes factores

Del análisis de estas superficies se desprende la complejidad del problema y la necesidad de realizar una optimización, para ello, se recurrió a la función de deseabilidad global y se obtuvieron tres formulaciones óptimas (Tabla 3.3.4).

Tabla 3.3.3 Composición final de las formulaciones optimizadas aplicando metodología de superficie de respuesta

| F | pH buffer citrato | Sor (%v/v) | Gli (%v/v) | PPG (%v/v) |
|----------|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| F1 | 3,11 | 12,5 | 8,4 | 6,4 |
| F2 | 3,13 | 12,5 | 10,7 | 4,0 |
| F3 | 3,18 | 2,5 | 4,7 | 12,5 |

F: Formulación, Sor: sorbitol, Gli: glicerina, PPG: propilenglicol.

Estas tres formulaciones se prepararon según el procedimiento general (Capítulo 2, Materiales y Métodos, Sección 2.6.3), donde se observó la completa disolución de HCT. Las formulaciones fueron almacenadas en heladera ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$), temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) y cámara ($40\pm 2^{\circ}\text{C}$ 75%HR) a fin de verificar su estabilidad. Después de 15 días, en las muestras conservadas en heladera se observó la presencia de un precipitado, mientras que, en las almacenadas a temperatura ambiente, fue apreciada una ligera turbidez. Finalmente, aquellas formulaciones conservadas en la cámara de estabilidad a 40°C se mantuvieron transparentes y sin presencia de precipitados.

Por lo tanto, se concluyó que el pH final de las soluciones como las proporciones de excipientes empleadas solubilizaron HCT, pero no garantizaron la estabilidad de las formulaciones en el tiempo; partir de estos resultados, se decidió incorporar a las tres formulaciones HPMC en concentraciones de 0,5 y 1,0% como agente estabilizador.

A fin de obtener las 6 formulaciones presentadas en la Tabla 3.3.4, el procedimiento operativo se modificó de la siguiente manera: 1) Se pesó 200 mg de HCT en un frasco con base plana de 200 mL; 2) Agregamos las cantidades correspondiente de Gli, Sor y PPG hasta formar una mezcla homogénea; 3) Se incorporó solución buffer de citrato para obtener un volumen de aproximadamente 80 mL; 4) Las sonicamos durante 20 minutos; 5) Las

agitamos durante 72 h (220 rpm y 37°C); 6) Se agregó la HPMC, 0,5 o 1,0% según corresponda; 7) Se transfirió el contenido de cada frasco a un matraz de 100 mL, se enraso con el correspondiente buffer, finalmente se mezcló y filtró con papel de filtro. Estas formulaciones fueron envasadas en envases de vidrio tipo III color ámbar y conservadas en 3 condiciones de almacenamiento, a 4, 25 y 40°C. El contenido de HCT fue determinado cada 30 días durante 6 meses, en cada una de las condiciones de almacenamiento.

Tabla 3.3.4 Composición de las formulaciones optimizadas conteniendo HPMC

| F | pH buffer citrato | Sor (%v/v) | Gli (%v/v) | PPG (%v/v) | HPMC (%) |
|-----|----------------------|------------|------------|------------|----------|
| F1A | 3,11 | 12,5 | 8,4 | 6,4 | 0,5 |
| F1B | 3,11 | 12,5 | 8,4 | 6,4 | 1,0 |
| F2A | 3,13 | 12,5 | 10,7 | 4,0 | 0,5 |
| F2B | 3,13 | 12,5 | 10,7 | 4,0 | 1,0 |
| F3A | 3,18 | 2,5 | 4,7 | 12,5 | 0,5 |
| F3B | 3,18 | 2,5 | 4,7 | 12,5 | 1,0 |

F: Formulación, Sor: sorbitol, Gli: glicerina, PPG: propilenglicol, HPMC: Hidroxipropilmetilcelulosa.

Las formulaciones F1 y F2 presentaron precipitado durante el período de almacenamiento aún con la adición de HPMC al 1% p/v. Por otra parte, las formulaciones F3A y F3B resultaron ser estables, lo que podría relacionarse con la mayor presencia de PPG en dicha formulación. La ecuación. 3.3.1, obtenida a partir del diseño, muestra la solubilidad de HCT en función de los diferentes factores analizados. Como puede apreciarse, el factor “C” (PPG) presenta el mayor coeficiente entre los factores analizados, lo que haría suponer que cuando disminuye su concentración, disminuye en gran medida la capacidad de solubilización del vehículo desarrollado. La estabilidad física y química de las formulaciones F3A y F3B se presenta en la tabla (Tabla 3.3.5)

Tabla 3.3.5 Resultados de los estudios de estabilidad química de HCT

| F | CA | 0 mes | 1 mes | 2 meses | 3 meses | 4 meses | 5 meses | 6 meses |
|-----|-------------------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|
| F3A | 4±2°C | | 99,6±0,4 | 99,8±0,5 | 99,7±0,5 | 99,5±0,5 | 98,9±0,8 | 98,6±0,8 |
| | 25±2°C | 100,6±0,7 | 99,4±0,5 | 99,5±0,3 | 99,4±0,7 | 98,5±0,3 | 96,2±0,7 | 95,0±0,6 |
| | 40±2°C (75%HR) | | 98,7±0,8 | 97,5±0,7 | 97,1±0,6 | 94,3±0,1 | 92,3±0,6 | 90,4±0,3 |
| F3B | 4±2°C | | 99,8±0,1 | 100,1±0,6 | 98,8±0,9 | 99,4±0,6 | 99,8±0,3 | 99,7±0,4 |
| | 25±2°C | 100,4±0,5 | 99,4±0,6 | 99,8±0,1 | 100,4±0,1 | 99,6±0,6 | 98,5±0,5 | 96,9±0,5 |
| | 40±2°C (75%HR) | | 97,1±0,9 | 95,3±0,6 | 93,4±0,6 | 93,5±0,9 | 93,4±0,4 | 90,5±0,9 |

F3A: 0,5 %p/v HPMC, F3B: 1%p/v HPMC.

F: Formulación, CA: Condición de almacenamiento.

Como puede apreciarse en la Tabla 3.3.5, la incorporación de HPMC mejoró la estabilidad de la formulación F3 en las dos concentraciones propuestas y no se observó aparición de precipitados ni cambios organolépticos a los 6 meses. Los requerimientos farmacopeicos indican que el contenido de ingrediente activo debe estar entre el 90-110% de lo rotulado. Como puede observarse, en todos los casos se obtuvieron recuperaciones mayores al 90%. Por otro lado, debe garantizarse el límite de posibles productos de degradación que puedan formarse durante el almacenamiento, por lo tanto, a continuación, se procedió a la detección de la presencia de productos de degradación en estas soluciones.

3.3.3 Determinación de productos de degradación en soluciones de HCT

En soluciones acuosas, HCT se degrada a 4-amino-6-clorobenceno-1,3-disulfonamida (producto de degradación 1, PD-1) y formaldehído, mediante hidrólisis. Mollica y colaboradores estudiaron el mecanismo de la reacción y su dependencia de la temperatura y el pH¹³³. Otra impureza de HCT es clorotiazida (producto de degradación 2, PD-2), que se produce por oxidación del IFA. Por otra parte, PD-1 y PD-2 también constituyen las impurezas de proceso de HCT más conocidas y estudiadas¹³⁴. La Figura 3.3.2 muestra las estructuras químicas de HCT, PD-1 y PD-2, respectivamente.

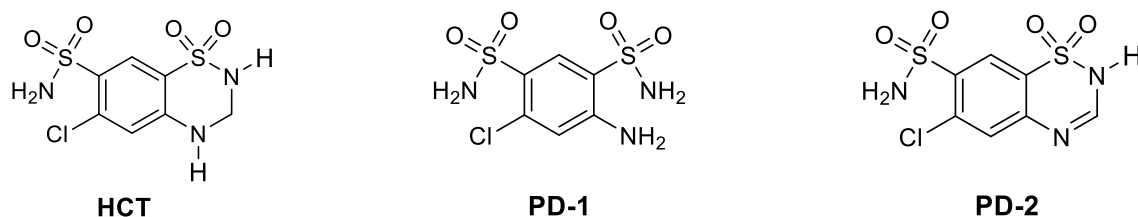


Figura 3.3.2 Estructura química de HCT y sus productos de degradación. PD-1: 4-amino-6-clorobenceno-1,3-disulfonamida; PD-2: clorotiazida

En la Figura 3.3.3 se muestran los cromatogramas obtenidos de la formulación F3B a los 6 meses de almacenamiento a las tres temperaturas analizadas. En las muestras almacenadas a 25°C puede observarse la aparición de un pico a los 4,1 minutos que no es detectable a 4°C, pero el mismo se incrementa con el aumento de la temperatura y la humedad. Este pico fue identificado por Maja y colaboradores como la impureza PD-1, 4-amino-6-clorobenceno-1,3-disulfonamida¹³⁵. Cabe mencionar que esta impureza está limitada como sustancia relacionada en la monografía de comprimidos de la farmacopea argentina y debe ser menor al 1%.

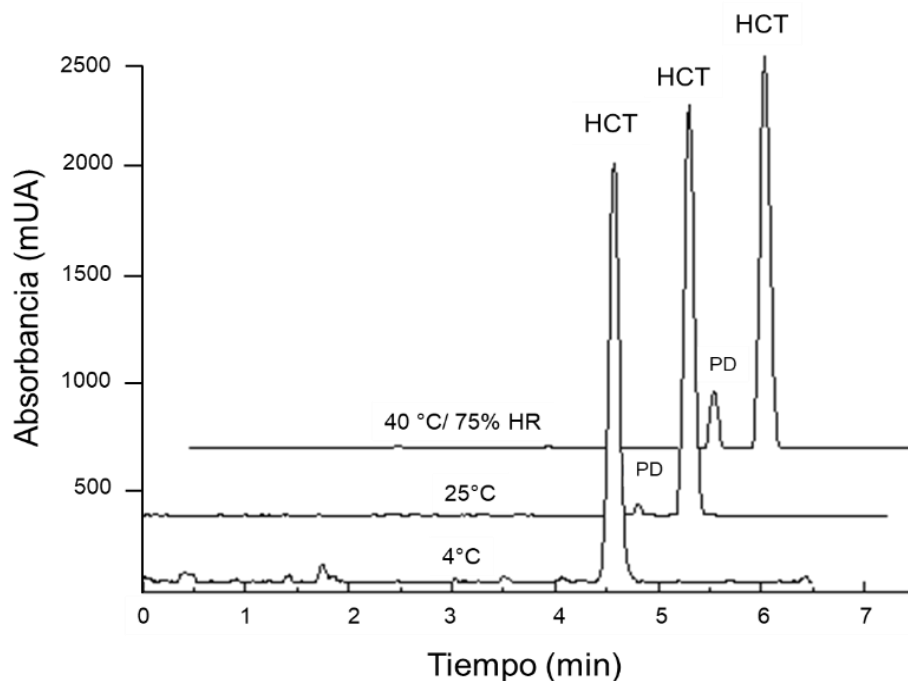


Figura 3.3.3 Cromatogramas a los 6 meses en las 3 condiciones de almacenamiento de la formulación F3B. PD: producto de degradación, 4-amino-6-clorobenceno-1,3-disulfonamida

La Tabla 3.3.6 resume las recuperaciones de HCT y PD-1 para las formulaciones F3A y F3B, respectivamente. A pesar de que la formulación F3A cumpliría con el contenido de HCT, podemos observar que no cumple con el límite de sustancias relacionadas, ya que, a las temperaturas analizadas, el contenido de PD-1 es mayor al 1%. Para la formulación F3B, los resultados obtenidos indican que la formulación desarrollada demostró ser estable fisicoquímicamente durante al menos 6 meses a 4°C, donde la impureza PD-1 se encuentra por debajo del 1% (Tabla 3.3.6).

Tabla 3.3.6 Recuperaciones de HCT y PD-1 a los 6 meses de elaboración en las formulaciones F3A y F3B.

| F | CA | PD-1(Rec. %) | HCT-R (%) |
|-----|----------------|--------------|-----------|
| F3A | 4±2°C | 1,4±0,2 | 98,6±0,8 |
| | 25±2°C | 5,0±0,4 | 95,0±0,6 |
| | 40±2°C (75%HR) | 9,6±0,2 | 90,4±0,3 |
| F3B | 4±2°C | 0,3±0,1 | 99,6±0,5 |
| | 25±2°C | 3,1±0,3 | 96,8±0,4 |
| | 40±2°C (75%HR) | 9,5±0,2 | 90,4±0,3 |

F3A: 0,5 %p/v HPMC, F3B: 1%p/v HPMC

F: Formulación, CA: Condición de almacenamiento, PD-1: 4-amino-6-clorobenceno-1,3-disulfonamida, HCT-R: recuperación de Hidroclorotiazida.

3.3.4 Estudios de estabilidad microbiológica

Como puede apreciarse en la Tabla 3.3.7 ambas formulaciones (F3A y F3B) fueron estables microbiológicamente por los seis meses de ensayo en condiciones aceleradas y por los doce meses de ensayo tanto a temperatura ambiente como almacenados en heladera. A pesar de que la formulación 3A fue estable microbiológicamente durante 12 meses, ésta debió ser desestimada ya que no cumplió con el ensayo de estabilidad química.

Tabla 3.3.7 Resultado de la estabilidad microbiológica de las formulaciones 3A y 3B durante 12 meses de almacenamiento en condiciones normales y 6 en cámara de estabilidad.

| | CA | F | CMAT | CTHyL | Ec | Resultado |
|----------|--------------------|-----|------|-------|----------|-----------|
| 3 meses | 4±2°C | F3A | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F3B | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | 25±2°C | F3A | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F3B | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | 40±2°C (75% RH) | F3A | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F3B | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| 6 meses | 4±2°C | F3A | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F3B | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | 25±2°C | F3A | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F3B | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | 40±2°C (75% RH) | F3A | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F3B | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| 12 meses | 4±2°C | F3A | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F3B | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | 25±2°C | F3A | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F3B | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |

F3A: 0,5 %p/v HPMC, F3B: 1%p/v HPMC.

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación, CMAT: Conteo de microbios aerobios totales (UFC/mL) – Cumple si es <1.000, CTHyL: Conteo total de hongos y levaduras (UFC/mL) - Cumple si es <100, Ec: *Escherichia coli* – Cumple si hay ausencia

3.3.5 Composición final optimizada de gotas de HCT

En base a los resultados obtenidos, la solución óptima deberá contener cada 100 mL: 200 mg de HCT; una solución buffer ácido cítrico/ citrato de sodio pH 3,18; la mezcla de: Sor 2,5 %v/v; Gli 4,7 %v/v; PPG 12,5 %v/v; y finalmente HPMC al 1,0 %p/v a fin de otorgar estabilidad a la formulación. Es importante destacar las mencionadas gotas deberán ser conservadas a 4°C.

3.3.6 Conclusión

En este capítulo, se desarrolló y optimizó, haciendo uso de diseño de experimentos, una formulación oral líquida de HCT de 2 mg mL⁻¹, Sor (2,5%v/v), Gli (4,7%v/v), PPG (12,5%v/v), con un pH final de 3,18, apta para ser administradas en pacientes pediátricos. Para favorecer la estabilidad física, se incorporó HPMC en concentraciones de 0,5 y 1%p/v. Estas formulaciones fueron almacenadas en tres condiciones, 4; 25 y 40°C/75%HR y fueron evaluadas mensualmente con respecto a su contenido de HCT, además de un control organoléptico (olor, color, presencia de turbidez o precipitados) durante 6 meses. Por otro

lado, dado que el método CLAE es indicador de estabilidad, se monitoreó la aparición de los posibles productos de degradación de HCT durante el período evaluado, pudiendo determinarse la presencia del PD-1. Las mejores recuperaciones se encontraron en la formulación conteniendo 1% p/v de HPMC y conservada en heladera, ya que cumple con el límite de impurezas fijado por la correspondiente monografía farmacopeica⁶⁴. Finalmente, ambas formulaciones fueron sometidas al control microbiológico, con resultados óptimos, dado que no se observó la presencia de microbios aerobios totales, hongos, levaduras ni escherichia coli. A partir de estos resultados, la formulación conteniendo HPMC 1%p/v sería la seleccionada para producción. Esta formulación resultó ser estable en heladera al menos 6 meses, tanto química como microbiológicamente.

Gotas de Furosemida

3.4 Gotas De Furosemida

FURO es un diurético de asa que se utiliza por vía oral en el tratamiento de estados edematosos asociados a insuficiencia cardíaca, renal y hepática, y en el tratamiento de la hipertensión. La dosis habitual en pacientes adultos es de 20 a 80 mg/día. Para el tratamiento de casos leves de edema, pueden ser eficaces dosis tan bajas como 20 mg, mientras que para casos graves de edema pueden ser necesarias dosis de hasta 600 mg/día. Aún más elevada puede ser la dosis para el tratamiento de la insuficiencia renal crónica, llegando hasta 1,5 g/día. En niños, la dosis inicial es de 1-2 mg/kg/día, con un valor máximo de 6 mg/kg/día¹³⁶.

FURO inhibe la reabsorción de sodio y cloruro en la rama ascendente del asa de Henle y también en los primeros túbulos distales. Se incrementa la excreción de iones de sodio, potasio, calcio y cloruro, y se potencia la excreción de agua. La mayoría de los efectos adversos de FURO ocurren con dosis altas y/o uso prolongado. Los efectos graves son poco comunes, siendo los más comunes el desequilibrio de líquidos y electrolitos, que incluyen hiponatremia, hipopotasemia y alcalosis hipoclorémica. Los signos de desequilibrio electrolítico incluyen dolor de cabeza, hipotensión, calambres musculares, sequedad de boca, sed, y debilidad, entre otros¹³⁷.

La Guía de la OMS¹³⁸, clasifica a la FURO como Clase IV en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, por su baja solubilidad y baja permeabilidad de membrana, mientras que Martindale informa que FURO es prácticamente insoluble en agua (<0,1 mg mL⁻¹)¹³⁷. Más precisamente, Shin y colaboradores han reportado que la solubilidad acuosa de FURO a temperatura ambiente¹³⁹ es de 0,01825 mg mL⁻¹. Sin embargo, su solubilidad acuosa aumenta en función del pH del medio¹⁴⁰. El perfil de pH-solubilidad de FURO a 30°C mostró un mínimo de 0,010 mg mL⁻¹ a pH=2,0 y un máximo de 21,9 mg mL⁻¹ a pH=8,0, seguido de una disminución hasta alrededor de 18 mg mL⁻¹ por encima de pH 8,0.^{141,142}

Existen pocas publicaciones en donde se desarrollen formas farmacéuticas de FURO destinadas a pacientes pediátricos. Entre ellas, Provenza y colaboradores desarrollaron dos

jarabes de FURO, con una concentración de 2 mg mL^{-1} , uno de ellos apto para pacientes pediátricos. Para ello, utilizaron un buffer de carbonato-bicarbonato $\text{pH}=10$ y las formulaciones no contuvieron conservantes. Las muestras fueron almacenadas en envases de vidrio color ámbar a tres temperaturas (4 , 25 y 40°C) y demostraron ser estables solamente por 60 días desde el momento de su elaboración¹⁴³.

Por otra parte, Lafeber y colaboradores utilizaron una impresora 3D basada en extrusión semisólida para el desarrollo de comprimidos de 2 mg de FURO aptos para pediatría, pero las dosis más bajas solamente son adecuadas para niños a partir de 1 año, sumado a la limitante que conlleva administrar comprimidos a esta población¹⁴⁴.

En nuestro país, FURO se encuentra disponible como comprimidos de 20 y 40 mg , y también como solución inyectable (10 mg mL^{-1}). Hasta el año 2018 el laboratorio Roux Ocefa S.A comercializaba gotas conteniendo $2 \text{ g}/100 \text{ mL}$ de furosemida-dietilaminoetanol (equivalente a $1,47 \text{ g}$ de furosemida base (FURO-B) cada 100 mL), además cada 100 mL contenía como excipientes: etanol $9,7 \text{ g}$; Gli, Sor, fosfato dipotásico, metilparabeno, propilparabeno, hidróxido de sodio, y agua purificada. Cada gota de la formulación contenía 1 mg de Furosemida-dietilaminoetanol (equivalente a $0,74 \text{ mg}$ de FURO-B). Para el tratamiento del edema en niños, se emplea 1 mg de FURO-B por kilogramo de peso como única dosis, lo que correspondería a $1,35$ gotas por kilogramo de peso del producto comercializado, lo que dificulta la dosificación. Esta única presentación hacía difícil el ajuste de dosis por peso del paciente principalmente en pediatría, ya que en caso de ser necesario se debe administrar 1 mg de FURO-B cada 2 horas hasta obtener el efecto deseado, pero nunca se deben pasar los 6 mg/kg . Además del inconveniente en el ajuste de dosis, esta formulación contenía etanol, el cual no es recomendado en pediatría. A partir de diciembre de 2018, se prohibió su elaboración y comercialización (Disposición 1406/18 diciembre 2018) y hasta este momento no existe un producto similar.

El propósito de este capítulo fue desarrollar formulaciones líquidas de FURO conteniendo 2 , 5 y $14,7 \text{ mg mL}^{-1}$ de FURO-B. Las dos primeras, con una potencia tal que

garantice una mejor dosificación en pacientes de bajo peso corporal, y la tercera, con la misma potencia que la formulación comercial discontinuada. En todos los casos, el desarrollo se enfocará a solubilizar FURO-B sin utilizar etanol en su composición, lo que aportaría una mejora sustancial para que este producto pueda ser administrado con seguridad a pacientes pediátricos.

3.4.1 Etapa de desarrollo

Se elaboraron dos procedimientos operativos evaluando diferentes excipientes y envases. A diferencia de la formulación que se comercializaba, se eliminó la presencia de etanol en todas las concentraciones planteadas. Dado que, como se ha mencionado, la solubilidad de FURO-B es pH-dependiente y ésta se ve favorecida con el incremento del pH, el hidróxido de sodio se encuentra como excipiente tanto en la solución inyectable, que se comercializa actualmente, como en las gotas que fueron discontinuadas.

En el procedimiento 1, se adicionó una mezcla de Gli y Sor a los fines incrementar levemente la viscosidad de la formulación y de esa forma garantizar una correcta dosificación en forma de gotas. En el procedimiento 2, estos excipientes fueron reemplazados por HPMC al 0,5%p/v.

Procedimiento 1: 1) Se pesó la cantidad de FURO-B correspondiente en cada caso considerando un volumen final de 100 mL; 2) Se agregó 50 mL de NaOH 0,1 N, preparado con agua conservada; 3) Se incorporó 10 mL de glicerina y 10 mL de sorbitol; 4) Se agitó hasta homogeneizar; 5) Se ajustó a pH 7 con ácido fosfórico (10%v/v), preparado con agua conservada; 6) Se transfirió a un matraz de 100 mL y completar a volumen con agua conservada; 7) Finalmente, se filtró con papel de filtro.

Procedimiento 2: 1) Se pesó la cantidad de FURO-B correspondiente en cada caso considerando un volumen final de 100 mL; 2) Se agregó 50 mL de NaOH (0,1 N), preparado con agua conservada; 3) Se ajustó a pH 7 con ácido fosfórico (10%v/v), preparado con agua conservada; 4) Se incorporó HPMC, concentración final 0,5 %p/v; 5) Se agitó hasta

disolución completa; 6) Se transfirió a un matraz de 100 mL y completar a volumen con agua conservada; 7) Finalmente, se filtró con papel de filtro.

Para evaluar la incidencia del tipo de envase en la estabilidad química de FURO, las formulaciones elaboradas fueron envasadas en envases de vidrio tipo III color ámbar y en envases de polietileno de media densidad (con tapa de polipropileno e inserto de polietileno de baja densidad) y se conservaron a 4, 25 y 40°C durante 6 meses.

Las cuantificaciones de FURO-B en cada uno de los experimentos se llevaron a cabo siguiendo los lineamientos de la monografía oficial de la USP 38 para soluciones orales⁶⁶.

Las gotas elaboradas por el procedimiento 1, tuvieron una densidad promedio de 1,06 g mL⁻¹, mientras que las elaboradas por el procedimiento 2, mostraron una densidad promedio de 1,02 g mL⁻¹, ambas similares a las densidades de las gotas comerciales. La Tabla 3.4.1 resume los datos de recuperación de FURO-B de las formulaciones elaboradas por el procedimiento 1 en las tres condiciones de almacenamiento, empleando envases de vidrio tipo III color ámbar.

Tabla 3.4.1 Resumen de las recuperaciones de FURO-B elaboradas por el procedimiento 1 hasta 6 meses en envases de vidrio color ámbar

| CA | F | 0 mes | 3 meses | 6 meses |
|----------------|------|-----------|-----------|----------|
| 4±2°C | F1EV | 101,7±0,2 | 100,8±0,8 | 96,5±0,5 |
| | F2EV | 102,8±0,7 | 99,6±0,6 | 96,8±0,1 |
| | F3EV | 102,1±0,6 | 101,8±0,7 | 98,4±0,2 |
| 25±2°C | F1EV | 101,7±0,3 | 100,1±0,5 | 96,6±0,8 |
| | F2EV | 102,8±0,5 | 100,1±0,2 | 94,8±0,4 |
| | F3EV | 102,1±0,6 | 102,2±0,4 | 94,0±0,3 |
| 40±2°C (75%HR) | F1EV | 101,7±0,8 | 101,8±0,8 | 90,8±0,6 |
| | F2EV | 102,8±0,5 | 100,3±0,2 | 94,4±0,4 |
| | F3EV | 102,1±0,8 | 96,8±0,5 | 88,7±0,8 |

F1EV: 2,04 mg mL⁻¹, F2EV: 5,07 mg mL⁻¹, F3EV: 14,73 mg mL⁻¹

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación, EV: envase de vidrio tipo III color ámbar.

La Tabla 3.4.2 presenta los datos de recuperación de FURO-B de las formulaciones elaboradas por el procedimiento 1, empleando envases de polietileno de media densidad, en las mismas condiciones de almacenamiento, a los 6 meses de su elaboración.

Tabla 3.4.2 Resumen de las recuperaciones de FURO-B elaboradas por el procedimiento 1 hasta 6 meses en envases de polietileno de media densidad

| CA | F | 0 mes | 3 meses | 6 meses |
|----------------|------|-----------|-----------|-----------|
| 4±2°C | F1EP | 101,2±0,5 | 100,7±0,4 | 100,8±0,5 |
| | F2EP | 99,8±0,6 | 98,8±0,4 | 97,8±0,2 |
| | F3EP | 99,7±0,6 | 98,6±0,5 | 97,5±0,7 |
| 25±2°C | F1EP | 99,8±0,6 | 100,5±0,3 | 100,9±0,8 |
| | F2EP | 100,1±0,7 | 99,9±0,5 | 100,7±0,4 |
| | F3EP | 99,9±0,6 | 101,1±0,4 | 101,5±0,3 |
| 40±2°C (75%HR) | F1EP | 102,1±0,9 | 101,6±0,4 | 101,1±0,9 |
| | F2EP | 100,5±0,8 | 100,7±0,4 | 101,2±0,9 |
| | F3EP | 99,7±0,7 | 99,2±0,3 | 98,4±0,4 |

F1EP: 2,04 mg mL⁻¹, F2EP: 5,07 mg mL⁻¹, F3EP: 14,73 mg mL⁻¹

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación, EP: envases de polietileno de media densidad.

Dada la dependencia de la solubilidad de FURO con el pH, éste fue controlado en todas las muestras conservadas en envases de vidrio y polietileno de media densidad, en todas las condiciones de almacenamiento durante todo el desarrollo. Para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos, se aplicó un test t. Los valores obtenidos son menores al t_{tabla} , con $p=0,05$ y 3 grados de libertad, determinándose que la media calculada es igual al valor especificado, es decir, pH=7. (Tabla 3.4.3 y Tabla 3.4.4)

Tabla 3.4.3 Valores de pH en las diferentes formulaciones elaboradas por el procedimiento 1 y almacenados en envases de vidrio color ámbar

| CA | F | 0 mes | 1 mes | 3 meses | 6 meses | t _{calculado} |
|-------------------|------|------------|------------|------------|------------|------------------------|
| 4±2°C | F1EV | 6,96± 0,01 | 6,98± 0,01 | 6,84± 0,02 | 6,85± 0,02 | 1,27 |
| | F2EV | 7,01± 0,01 | 6,98± 0,01 | 6,87± 0,02 | 6,85± 0,01 | 0,91 |
| | F3EV | 7,02± 0,02 | 6,89± 0,02 | 6,78± 0,03 | 6,85± 0,01 | 1,14 |
| 25±2°C | F1EV | 6,98± 0,01 | 6,89± 0,01 | 6,82± 0,02 | 6,85± 0,01 | 1,65 |
| | F2EV | 6,98± 0,01 | 6,87± 0,02 | 6,89± 0,01 | 6,93± 0,01 | 1,70 |
| | F3EV | 6,88± 0,02 | 6,75± 0,01 | 6,55± 0,01 | 6,65± 0,02 | 2,07 |
| 40±2°C (75%HR) | F1EV | 6,58± 0,01 | 6,81± 0,01 | 6,81± 0,02 | 7,02± 0,01 | 1,08 |
| | F2EV | 6,45± 0,01 | 6,79± 0,02 | 6,79± 0,01 | 6,90± 0,02 | 1,37 |
| | F3EV | 7,03± 0,02 | 6,75± 0,01 | 6,65± 0,03 | 6,81± 0,01 | 1,18 |

F1EV: 2,04 mg mL⁻¹, F2EV: 5,07 mg mL⁻¹, F3EV: 14,73 mg mL⁻¹

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación, EV: envase de vidrio tipo III color ámbar, t_{tabla(0,05,3)} = 2,353

Tabla 3.4.4 Valores de pH en las diferentes formulaciones elaboradas por el procedimiento 1 y almacenadas en envases de polietileno de media densidad

| CA | F | 0 mes | 1 mes | 3 meses | 6 meses | t _{calculado} |
|-------------------|------|------------|------------|------------|------------|------------------------|
| 4±2°C | F1EP | 6,95± 0,01 | 6,97± 0,02 | 6,86± 0,03 | 6,88± 0,02 | 1,35 |
| | F2EP | 7,02± 0,02 | 6,99± 0,01 | 6,86± 0,02 | 6,88± 0,03 | 1,12 |
| | F3EP | 7,00± 0,03 | 6,92± 0,02 | 6,81± 0,02 | 6,84± 0,01 | 1,28 |
| 25±2°C | F1EP | 6,97± 0,03 | 6,92± 0,01 | 6,85± 0,02 | 6,85± 0,02 | 1,71 |
| | F2EP | 6,99± 0,02 | 6,91± 0,01 | 6,88± 0,01 | 6,95± 0,01 | 1,73 |
| | F3EP | 6,85± 0,03 | 6,81± 0,02 | 6,78± 0,03 | 6,75± 0,01 | 2,02 |
| 40±2°C (75%HR) | F1EP | 6,78± 0,03 | 6,82± 0,01 | 6,85± 0,01 | 7,00± 0,03 | 1,18 |
| | F2EP | 6,55± 0,03 | 6,80± 0,01 | 6,78± 0,02 | 6,92± 0,01 | 1,57 |
| | F3EP | 7,01± 0,01 | 6,85± 0,01 | 6,82± 0,01 | 6,81± 0,01 | 1,38 |

F1EP: 2,04 mg mL⁻¹, F2EP: 5,07 mg mL⁻¹, F3EP: 14,73 mg mL⁻¹

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación, EP: envases de polietileno de media densidad. t_{tabla(0,05,3)} = 2,353

Las recuperaciones obtenidas cuando las muestras fueron almacenadas en envases de polietileno de media densidad fueron mayores, en promedio, con respecto a las muestras conservadas en envases de vidrio tipo III color ámbar en el mismo período de tiempo. Por otro lado, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el pH final de las formulaciones durante el período en estudio.

La Tabla 3.4.5 resume los datos de recuperación de FURO-B de las formulaciones elaboradas por el procedimiento 2 en las tres condiciones de almacenamiento, empleando envases de vidrio tipo III color ámbar. Mientras que la Tabla 3.4.6 presenta los datos obtenidos empleando el procedimiento 2, empleando envases de polietileno de media densidad, en las mismas condiciones, a los 6 meses de su elaboración.

Con estas muestras, se realizó el mismo análisis estadístico empleado en el procedimiento 1 con los resultados de pH obtenidos en el procedimiento 2. Para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los resultados, se aplicó un test t como se describió previamente (Tabla 3.4.7 y 3.4.8).

Tabla 3.4.5 Resumen de las recuperaciones de FURO-B elaboradas por el procedimiento 2 hasta 6 meses en envases de vidrio tipo III color ámbar

| CA | F | 0 mes | 3 meses | 6 meses |
|----------------|------|-----------|-----------|-----------|
| 4±2°C | F4EV | 101,7±0,8 | 100,9±0,8 | 97,9±0,6 |
| | F5EV | 102,8±0,2 | 101,9±0,9 | 96,9±0,1 |
| | F6EV | 102,1±0,4 | 101,2±0,3 | 96,5±0,5 |
| 25±2°C | F4EV | 101,7±0,5 | 100,2±0,5 | 99,7±0,7 |
| | F5EV | 102,8±0,2 | 101,6±0,6 | 99,1±0,9 |
| | F6EV | 102,1±0,1 | 101,2±0,4 | 95,9±0,4 |
| 40±2°C (75%HR) | F4EV | 101,7±0,6 | 100,8±0,5 | 98,4±0,2 |
| | F5EV | 102,8±0,5 | 100,2±0,4 | 100,5±0,8 |
| | F6EV | 102,1±0,3 | 102,4±0,6 | 95,7±0,4 |

F4EV: 2,04 mg mL⁻¹, F5EV: 5,07 mg mL⁻¹, F6EV: 14,73 mg mL⁻¹

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación, EV: envase de vidrio tipo III color ámbar.

Tabla 3.4.6 Resumen de las recuperaciones de FURO-B elaboradas por el procedimiento 2 hasta 6 meses en envases de polietileno de media densidad

| CA | F | 0 mes | 3 meses | 6 meses |
|----------------|------|-----------|-----------|-----------|
| 4±2°C | F4EP | 100,2±0,2 | 99,7±0,5 | 99,2±0,3 |
| | F5EP | 100,8±0,5 | 101,2±0,3 | 101,1±0,5 |
| | F6EP | 99,8±0,3 | 98,7±0,5 | 98,8±0,9 |
| 25±2°C | F4EP | 99,9±0,6 | 100,3±0,3 | 101,5±0,7 |
| | F5EP | 101,1±0,7 | 100,1±0,5 | 102,1±0,6 |
| | F6EP | 99,9±0,5 | 101,1±0,7 | 101,3±0,1 |
| 40±2°C (75%HR) | F4EP | 100,1±0,2 | 100,6±0,5 | 101,1±0,5 |
| | F5EP | 100,5±0,5 | 100,7±0,3 | 100,8±0,4 |
| | F6EP | 99,9±0,5 | 99,8±0,4 | 100,5±0,6 |

F4EP: 2,04 mg mL⁻¹, F5EP: 5,07 mg mL⁻¹, F6EP: 14,73 mg mL⁻¹

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación, EP: envases de polietileno de media densidad.

Tabla 3.4.7 Valores de pH en las diferentes formulaciones elaboradas por el procedimiento 2 y almacenadas en vidrio color ámbar

| CA | F | 0 mes | 1 mes | 3 meses | 6 meses | t _{calculado} |
|----------------|------|------------|------------|------------|------------|------------------------|
| 4±2°C | F4EV | 6,95± 0,01 | 6,92± 0,02 | 6,89± 0,03 | 6,83± 0,00 | 2,00 |
| | F5EV | 6,92± 0,03 | 6,87± 0,01 | 6,77± 0,01 | 6,72± 0,01 | 1,97 |
| | F6EV | 6,98± 0,02 | 6,91± 0,01 | 6,84± 0,01 | 6,80± 0,02 | 1,48 |
| 25±2°C | F4EV | 6,95± 0,01 | 6,65± 0,02 | 6,70± 0,02 | 6,69± 0,02 | 1,83 |
| | F5EV | 7,02± 0,03 | 6,92± 0,01 | 6,87± 0,02 | 6,81± 0,01 | 1,07 |
| | F6EV | 6,98± 0,02 | 6,83± 0,02 | 6,87± 0,02 | 6,85± 0,03 | 1,75 |
| 40±2°C (75%HR) | F4EV | 7,01± 0,01 | 6,90± 0,02 | 6,87± 0,00 | 6,85± 0,02 | 1,29 |
| | F5EV | 7,02± 0,03 | 6,90± 0,01 | 6,92± 0,01 | 6,89± 0,01 | 1,13 |
| | F6EV | 6,98± 0,02 | 6,93± 0,01 | 6,95± 0,02 | 6,89± 0,01 | 1,65 |

F4EV: 2,04 mg mL⁻¹, F5EV: 5,07 mg mL⁻¹, F6EV: 14,73 mg mL⁻¹

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación, EV: envase de vidrio tipo III color ámbar, t_{tabla(0,05,3)}= 2,353

Tabla 3.4.8 Valores de pH en las diferentes formulaciones elaboradas por el procedimiento 2 y almacenadas en envases de polietileno de media densidad

| CA | F | 0 mes | 1 mes | 3 meses | 6 meses | t _{calculado} |
|----------------|------|------------|------------|------------|------------|------------------------|
| 4±2°C | F4EP | 6,97± 0,02 | 6,93± 0,01 | 6,91± 0,02 | 6,85± 0,01 | 2,05 |
| | F5EP | 6,93± 0,02 | 6,85± 0,02 | 6,79± 0,02 | 6,75± 0,03 | 1,95 |
| | F6EP | 6,99± 0,01 | 6,94± 0,03 | 6,85± 0,02 | 6,84± 0,02 | 1,55 |
| 25±2°C | F4EP | 6,94± 0,02 | 6,75± 0,02 | 6,75± 0,03 | 6,79± 0,02 | 1,93 |
| | F5EP | 7,01± 0,02 | 6,95± 0,03 | 6,89± 0,02 | 6,85± 0,01 | 1,27 |
| | F6EP | 6,99± 0,01 | 6,85± 0,02 | 6,89± 0,02 | 6,87± 0,03 | 1,78 |
| 40±2°C (75%HR) | F4EP | 7,00± 0,02 | 6,93± 0,01 | 6,89± 0,01 | 6,87± 0,02 | 1,39 |
| | F5EP | 7,03± 0,01 | 6,96± 0,01 | 6,93± 0,02 | 6,91± 0,01 | 1,23 |
| | F6EP | 6,99± 0,03 | 6,95± 0,02 | 6,97± 0,02 | 6,98± 0,01 | 1,75 |

F4EP: 2,04 mg mL⁻¹, F5EP: 5,07 mg mL⁻¹, F6EP: 14,73 mg mL⁻¹

CA: Condición de almacenamiento; F: Formulación; EP: envases de polietileno de media densidad;

t_{tabla (0,05,3)} = 2,353

Como puede observarse, en todos los casos (diferentes envases, condiciones de almacenamiento y procedimientos) las recuperaciones se encontraron dentro del rango 90-110% exigido por las farmacopeas para productos formulados. Por otro lado, cabe destacar que se encontraron recuperaciones cercanas al 100% en las formulaciones preparadas empleando el procedimiento 1 cuando se emplearon envases plásticos. En el caso de las preparadas por el procedimiento 2, las diferencias entre los envases fueron menos notorias, pero con mejores resultados cuando se usaron envases plásticos. Cabe destacar que este tipo de envase era el utilizado en la marca comercial discontinuada. Por otro lado, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el pH final de las formulaciones durante el período en estudio.

3.4.2 Determinación de FURO empleando espectroscopia UV

Con el propósito de determinar FURO con un método alternativo al farmacopeico, se desarrolló un método de espectroscopia UV. Este método permitió cuantificar FURO en menos tiempo y con menor uso de solventes orgánicos, siendo de esta manera, más

amigable con el medio ambiente. Como se discutió previamente, esta técnica no es una técnica separativa, por lo que no sería fácil detectar la presencia de algún producto de degradación si los hubiera. Durante el desarrollo de las formulaciones, los estudios de estabilidad química se llevaron a cabo empleando el método CLAE de la farmacopea americana. No se observó la presencia de productos de degradación ni la aparición de picos adicionales en los cromatogramas obtenidos de las formulaciones en el tiempo que duró el ensayo. Todos los resultados correspondientes al desarrollo y validación de este método espectroscópico se encuentran en el Anexo.

En este caso, debemos considerar varios factores que pueden influir en este método. Hay que tener en cuenta que ésta no es una técnica separativa como lo es CLAE, por lo que debe evaluarse la influencia en la absorción total de todos los componentes de la matriz además del ingrediente activo. Por tal motivo, la solución madre fue preparada con agua conservada.

Se realizaron mediciones de los espectros de absorción de la mezcla Gli (10%v/v)-Sor (10% v/v) de la matriz 1, HPMC 0,5% p/v de la matriz 2, NaOH 0,1 N todas disueltas en agua conservada y una solución de FURO 0,10 mg mL⁻¹ disuelta en NaOH 0,1 N.

La solución de FURO mostró 3 máximos a 228, 270 y 330 nm. Cuando se realizan las mediciones de las matrices y NaOH, se observó que la presencia de metil y propilparabeno interfería en la absorbancia de FURO, sin posibilidades de poder emplear las longitudes de onda de 228 y 270 nm. Por tal motivo, se evaluó la posibilidad de utilizar el tercer máximo de absorción, es decir, 330 nm.

El método espectrofotométrico propuesto permitió una cuantificación rápida y accesible de FURO en gotas sin una preparación de muestras que requiriera mucho tiempo. Además, el método espectrofotométrico implica una instrumentación sencilla en comparación con otras técnicas instrumentales. Los espectros de absorción de FURO mostraron que $\lambda = 330$ nm, era la longitud de onda más conveniente.

En todas las mediciones de las muestras, se empleó como blanco las soluciones correspondientes a cada matriz. Se realizaron las mediciones de cada una de las muestras en todas las condiciones de almacenamiento y las recuperaciones obtenidas fueron comparadas con las obtenidas aplicando el método CLAE farmacopeico. Se aplicó un test t para determinar si las medias eran iguales, es decir, no existían diferencias estadísticamente significativas en los resultados cuando FURO es cuantificada por cualquiera de los dos métodos. La Tabla 3.4.9 resume los datos de recuperación de FURO y los valores de $t_{\text{calculado}}$, a los seis meses de elaboración, en envases de vidrio y plástico, a tres temperaturas y aplicando los dos métodos para las formulaciones que contienen Gli y Sor.

Tabla 3.4.9 Recuperación de furosemida cuantificada por CLAE y UV elaboradas por el procedimiento 1

| CA | F | 6 meses EV | | | 6 meses EP | | |
|-------------------|----|------------|----------|------------------------|------------|-----------|------------------------|
| | | CLAE | UV | $t_{\text{calculado}}$ | CLAE | UV | $t_{\text{calculado}}$ |
| 4±2°C | F1 | 96,6±0,5 | 97,2±0,5 | 1,47 | 100,9±0,7 | 99,7±0,7 | 2,10 |
| | F2 | 94,8±0,2 | 95,3±0,7 | 1,19 | 100,7±0,6 | 99,8±0,6 | 1,83 |
| | F3 | 94,8±0,6 | 95,4±0,9 | 0,96 | 101,5±0,1 | 100,8±0,8 | 1,50 |
| 25±2°C | F1 | 96,5±0,4 | 95,9±0,8 | 1,16 | 100,8±0,4 | 99,8±0,8 | 1,93 |
| | F2 | 96,8±0,3 | 96,1±0,7 | 1,59 | 97,8±0,9 | 96,7±0,4 | 1,93 |
| | F3 | 98,4±0,5 | 97,9±0,6 | 1,11 | 97,5±0,8 | 96,6±0,3 | 1,82 |
| 40±2°C (75%HR) | F1 | 90,8±0,4 | 90,2±0,5 | 1,62 | 102,1±0,6 | 101,1±0,6 | 2,04 |
| | F2 | 94,4±0,8 | 93,8±0,8 | 0,91 | 103,2±0,8 | 102,3±0,8 | 1,38 |
| | F3 | 88,7±0,4 | 89,2±0,6 | 1,20 | 98,4±0,4 | 97,5±0,7 | 1,93 |

CA: Condición de almacenamiento; F: Formulación; EV: envase de vidrio tipo III color ámbar; EP: envases de polietileno de media densidad; $t_{\text{tabla}(0,05,4)} = 2,1318$

La Tabla 3.4.10 resume los datos de recuperación de FURO y los valores de $t_{\text{calculado}}$, a los seis meses de elaboración, en envases de vidrio y plástico, a tres temperaturas y aplicando los dos métodos para las formulaciones elaboradas por el procedimiento 2.

Tabla 3.4.10 Recuperación de furosemida cuantificada por CLAE y UV elaboradas por el procedimiento 2

| CA | F | 6 meses EV | | | 6 meses EP | | |
|-------------------|----|------------|----------|------------------------|------------|-----------|------------------------|
| | | CLAE | UV | t _{calculado} | CLAE | UV | t _{calculado} |
| 4±2°C | F4 | 96,8±0,4 | 97,3±0,6 | 1,51 | 100,5±0,7 | 99,9±0,5 | 2,02 |
| | F5 | 94,9±0,2 | 95,2±0,5 | 1,29 | 100,4±0,6 | 99,8±0,9 | 1,88 |
| | F6 | 94,8±0,8 | 95,2±0,9 | 1,12 | 100,5±0,5 | 100,6±0,8 | 1,59 |
| 25±2°C | F4 | 96,6±0,5 | 96,7±0,6 | 1,26 | 100,6±0,5 | 99,9±0,8 | 1,95 |
| | F5 | 96,7±0,3 | 96,5±0,5 | 1,49 | 97,5±0,8 | 96,9±0,5 | 1,94 |
| | F6 | 98,2±0,4 | 97,9±0,5 | 1,21 | 97,7±0,8 | 97,5±0,5 | 1,92 |
| 40±2°C (75%HR) | F4 | 90,7±0,6 | 90,3±0,7 | 1,72 | 101,1±0,8 | 101,2±0,6 | 2,14 |
| | F5 | 94,1±0,9 | 93,6±0,8 | 1,15 | 102,2±0,8 | 102,3±0,9 | 1,48 |
| | F6 | 88,5±0,4 | 89,1±0,5 | 1,23 | 98,6±0,4 | 97,9±0,8 | 1,97 |

CA: Condición de almacenamiento; F: Formulación; EV: envase de vidrio tipo III color ámbar; EP: envases de polietileno de media densidad; t_{tabla} (0,05, 4)= 2,1318

Los valores de t_{calculado} obtenidos fueron comparados con el t_{tabla} con una p=0,05 y (n₁+n₂)-2 grados de libertad, demostrándose que no existen diferencias en la cuantificación de FURO cuando es determinada tanto por CLAE como por UV.

3.4.3 Estudio de estabilidad microbiológica

A los 3 y 6 meses de almacenamiento todas las formulaciones cumplieron los requisitos de productos no estériles de la Farmacopea Argentina. En la Tabla 3.4.11 se presentan a modo de ejemplo los resultados microbiológicos obtenidos empleando las diferentes metodologías, envases y temperaturas de almacenamiento de las formulaciones F2 (5.07mg ml⁻¹ de FURO-B elaborada por procedimiento 1) y F5 (5.07mg ml⁻¹ de FURO-B elaborada por procedimiento 2).

Tabla 3.4.11 Conteo de microorganismos en las formulaciones de 5,07 mg/ml de FURO-B, en diferentes tipos de envases y condiciones de almacenamiento.

| | CA | F | CMAT | CTHyL | Ec | Resultado |
|---------|--------------------|------|------|-------|----------|-----------|
| 3 meses | 4±2°C | F2EV | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F5EV | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F2EP | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F5EP | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | 25±2°C | F2EV | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F5EV | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F2EP | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F5EP | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | 40±2°C (75% RH) | F2EV | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F5EV | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F2EP | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F5EP | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| 6 meses | 4±2°C | F2EV | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F5EV | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F2EP | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F5EP | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | 25±2°C | F2EV | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F5EV | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F2EP | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F5EP | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | 40±2°C (75% RH) | F2EV | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F5EV | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F2EP | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | | F5EP | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación, CMAT: Conteo de microbios aerobios totales (UFC/mL) – Cumple si es <1.000, CTHyL: Conteo total de hongos y levaduras (UFC/mL) - Cumple si es <100, Ec: *Escherichia coli* – Cumple si hay ausencia

Como puede apreciarse, no se encontró desarrollo de microorganismos. Este resultado nos indica que la técnica aplicada durante la preparación de la formulación fue adecuada, y además que los conservadores empleados cumplieron su función correctamente. En base a los resultados obtenidos podemos asegurar que las formulaciones desarrolladas por ambos métodos y almacenadas tanto en envases de vidrio como de polietileno de media densidad fueron estables química y microbiológicamente por los 6 meses de ensayo en condiciones aceleradas, a temperatura ambiente y en heladera.

3.4.4 Conclusiones

Se desarrollaron formulaciones conteniendo 2, 5 y 14,7 mg mL⁻¹ de FURO-B empleando dos procedimientos. Se evaluó la estabilidad fisicoquímica a tres temperaturas (4, 25 y 40°C), empleando dos tipos de envases, vidrio tipo III color ámbar y polietileno de

densidad media (con tapa de polipropileno e inserto de polietileno de baja densidad. Las formulaciones desarrolladas no contienen etanol, presentan un pH final de 7, y excipientes aprobados para usar en pediatría. La formulación de 2 mg mL⁻¹ facilitará el ajuste de dosificación acorde al peso del paciente, principalmente en recién nacidos. Estas formulaciones podrían ser una alternativa en farmacia hospitalaria o la opción de un medicamento genérico para la industria.

El método propuesto de análisis de FURO-B mediante espectrofotometría UV/VIS ha resultado ser un método simple, rápido y sencillo para valorar las concentraciones de este IFA en disolución, siendo posible realizar su análisis sin necesidad de un tratamiento previo de la muestra. El método propuesto es preciso y exacto por lo que puede ser considerado adecuado para realizar la cuantificación de FURO-B. Esta metodología alternativa ha demostrado ser tan eficaz como la CLAE, utilizado en la actualidad, lo que facilitaría en gran medida las posteriores mediciones de laboratorios, que encontrarían en la espectrofotometría UV/VIS una solución sencilla, rápida y menos costosa para los controles de calidad de las formulaciones líquidas de FURO-B.

El propósito del nuevo método espectrofotométrico no es reemplazar los métodos disponibles para el análisis de FURO-B con CLAE, sino servir como un método alternativo para usar cuando CLAE no esté disponible para un análisis de rutina.

Gotas Maleato de Enalapril

3.5 Gotas de Maleato de Enalapril

ENA se administra en formulaciones farmacéuticas orales en forma de sal (maleato de enalapril) para asegurar su estabilidad fisicoquímica. La fórmula química es (Z) -2-butanodioato (1: 1) de (S) -1- [N- [1- (etoxicarbonil) -3-fenilpropil] -L- alanil] - L-prolina y su fórmula estructural se muestra en la figura 1.9.5. Esta sustancia se presenta como un sólido cristalino muy estable que puede almacenarse durante 4 años a temperatura ambiente sin degradarse y es capaz de soportar temperaturas y humedad elevadas¹⁴⁵. Sin embargo, cuando se combina con excipientes en una formulación, puede volverse muy inestable¹⁴⁶. Los factores que juegan un papel importante en la inestabilidad de este fármaco formando parte de una formulación son la humedad¹⁴⁷ y el pH, ambos factores ampliamente investigados¹⁴⁸. Sin embargo, la degradación de ENA no muestra el mismo perfil en solución que en una mezcla física seca. En solución acuosa, el producto de degradación obtenido como consecuencia de la hidrólisis es la más dominante. ENA contiene un enlace éster que hace que la sustancia sea propensa a la hidrólisis. Solo en soluciones ácidas (pH < 5), se hace evidente otra vía de degradación que da como resultado un producto de ciclación (enalapril dicetopiperazina). En estado sólido, la formación de dicetopiperazina es la vía de degradación predominante y el producto de degradación obtenido por la hidrólisis es despreciable^{146,147}.

ENA es administrado como un profármaco que, tras la administración oral, se bioactiva por hidrólisis del éster etílico generando enalaprilato, que es un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina más potente que el compuesto original¹⁴⁵.

ENA se utiliza en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca sintomática o disfunción ventricular izquierda asintomática. Cuando enalapril se administra en dosis de 2,5 a 20 mg / día en adultos (dosis únicas o múltiples basadas en la sal de maleato) como monoterapia, reduce la presión arterial sistólica y diastólica en aproximadamente un 15 a 25%, con una normalización de la presión diastólica que ocurre en 50 a 75% de los pacientes con hipertensión renovascular.

En pediatría es frecuentemente usado para el tratamiento de la hipertensión y la insuficiencia cardíaca congestiva. La dosis inicial promedio es usualmente 0,1 mg/Kg/día en bebés y niños¹⁴⁹. Sin embargo, no se encuentran comercialmente disponibles formulaciones orales líquidas para pacientes pediátricos.

Según la literatura, ENA se considera poco soluble en agua: 25 mg por mL a temperatura ambiente. La solubilidad aumenta desde aproximadamente 25 mg mL⁻¹ (poco soluble) a pH 3,5 hasta aproximadamente 200 mg mL⁻¹ (libremente soluble) a pH 7,0. El enalaprilato, es menos soluble en agua (5 mg mL⁻¹) que el compuesto original ENA.

La estabilidad de ENA en soluciones reguladoras se ha estudiado en un rango de pH de 2 a 7. La velocidad y el modo de degradación dependen del pH de la solución. La estabilidad máxima en solución se produce a pH 3.

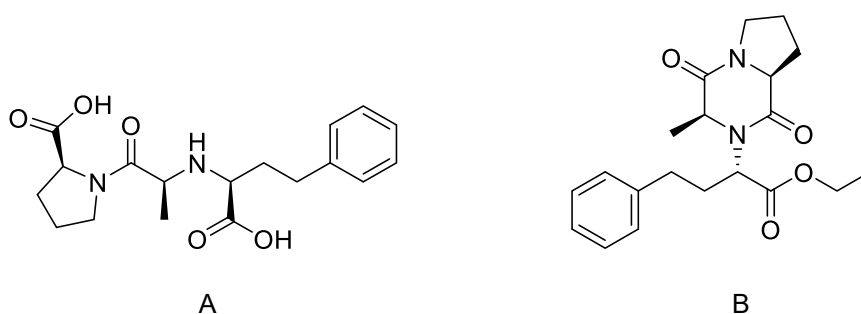


Figura 3.5.1 Estructura química de Enalaprilat (A) y Dicotopiperazina (B)

La estabilidad microbiológica del vehículo acuoso es otro parámetro esencial que investigar. Los conservantes se utilizan con frecuencia para prevenir el crecimiento de microorganismos¹⁵⁰. Sin embargo, cualquier vehículo de suspensión o solución debe cumplir con los requisitos farmacopeicos y pasar una prueba de eficacia conservante si está destinado a ser utilizado en envase multidosis. Por otro lado, la incorporación del agente conservante, un excipiente más en la matriz puede afectar la estabilidad química del IFA dependiendo de sus propiedades químicas.

En este capítulo se analizaron tres agentes antimicrobianos, 1) la combinación de metil y propilparabeno, 2) benzoato de sodio y 3) propionato de calcio¹⁵¹.

Se han desarrollado varias formulaciones líquidas de maleato de enalapril. Entre ellas, Lucero y colaboradores¹⁵² desarrollaron una formulación líquida de enalapril (1 mg mL⁻¹), que fue estable 50 días a 4 y 25 °C, pero no se evaluó su estabilidad microbiológica.

En el año 2014, la FDA aprobó una solución oral lista para usar, EPANED Solución Oral. Cada 1 mL contiene 1 mg de ENA, equivalente a 0,764 mg de enalapril. Los excipientes incluyen ácido cítrico, esencia de frutilla, agua purificada, benzoato de sodio, citrato de sodio y sucralosa. También puede contener ácido clorhídrico o hidróxido de sodio para ajustar el pH. La Solución Oral EPANED es transparente e incolora. Colabuono y colaboradores demostraron la bioequivalencia de la solución oral EPANED con las formulaciones de comprimidos, lo que puede ampliar las opciones terapéuticas para pacientes pediátricos¹⁵³. Sin embargo, este producto no se comercializa en nuestro país.

3.5.1 Estudios de estabilidad química. Influencia del pH final de la formulación

ENA no presenta problemas con respecto a su solubilidad acuosa en las dosis diarias requeridas, pero, como se ha mencionado, su estabilidad química es pH dependiente. Se ha demostrado que la inestabilidad de ENA varía si se encuentra en estado sólido o líquido.

Con el fin de evaluar la influencia del pH en el desarrollo de una formulación líquida de ENA, se prepararon soluciones conteniendo 2 mg mL⁻¹, 10% de Gli y soluciones buffer de fosfato o citrato, a pH 2, 3 y 4. La Gli fue incorporada a los fines de otorgar viscosidad a las formulaciones. Por otro lado, se preparó una formulación disuelta en agua con 10% de glicerina y que presentó un pH final de 2,84.

Las muestras fueron almacenadas en tres condiciones, 4, 25 y 40°C y la concentración del fármaco fue determinado por CLAE (USP 38⁶⁶, a partir de ahora, método 1) a los 6 meses de su elaboración.

Como puede apreciarse en la Tabla 3.5.1, cuando se empleó buffer citrato, sólo se observó la presencia de enalaprilat a pH 4 en las muestras conservadas en heladera, mientras que en las de pH 2 y 3, no se detectó la presencia de ninguna impureza. Por otra parte, a temperatura ambiente, se observaron ambos productos de degradación en todos los pH estudiados.

Tabla 3.5.1 Recuperaciones de enalapril, enalaprilat y dicetopiperazina a los 6 meses y a 3 temperaturas empleado solución reguladora citrato

| Solución reguladora Citrato/ácido cítrico | | | | |
|--------------------------------------------------|-----------|--------------------------|------------------|-------------------------------|
| CA | F | Enalaprilat-R (%) | ENA-R (%) | Dicetopiperazina-R (%) |
| 4±2°C | ENA BCpH2 | 0,0 | 100,6±0,2 | 0,0 |
| | ENA BCpH3 | 0,0 | 99,5±0,5 | 0,0 |
| | ENA BCpH4 | 1,3±0,2 | 98,6±0,4 | 0,0 |
| 25±2°C | ENA BCpH2 | 5,4±0,4 | 94,01±0,3 | 0,54±0,5 |
| | ENA BCpH3 | 6,8±0,3 | 92,69±0,5 | 0,45±0,6 |
| | ENA BCpH4 | 20,58±0,1 | 78,6±0,6 | 0,77±0,1 |
| 40±2°C (75%HR) | ENA BCpH2 | 14,6±0,5 | 70,57±0,4 | 14,75±0,3 |
| | ENA BCpH3 | 21,20±0,1 | 63,25±0,3 | 15,54±0,4 |
| | ENA BCpH4 | 66,2±0,3 | 21,55±0,7 | 12,20±0,6 |

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación, ENA-R (%): recuperación de maleato de enalapril, Enalaprilat-R (%): recuperación de enalaprilat, Dicetopiperazina-R (%): recuperación de dicetopiperazina.

Con respecto al buffer fosfato (Tabla 3.5.2), se observó la presencia de enalaprilat en los 3 pH en las muestras conservadas en heladera. A temperatura ambiente, se observaron los dos productos de degradación en los 3 pHs estudiados, y la degradación ocurrida fue superior a la obtenida empleando buffer citrato.

Tabla 3.5.2 . Recuperaciones de enalapril, enalaprilat y dicetopiperazina a los 6 meses y a 3 temperaturas empleado solución reguladora fosfato

| Solución reguladora Fosfato/ácido fosfórico | | | | |
|----------------------------------------------------|-----------|--------------------------|------------------|-------------------------------|
| CA | F | Enalaprilat-R (%) | ENA-R (%) | Dicetopiperazina-R (%) |
| 4±2°C | ENA BFpH2 | 1,73±0,2 | 98,26±0,5 | 0,0 |
| | ENA BFpH3 | 0,78±0,3 | 99,21±0,7 | 0,0 |
| | ENA BFpH4 | 1,03±0,4 | 98,96±0,3 | 0,0 |
| 25±2°C | ENA BFpH2 | 15,97±0,2 | 82,78±0,6 | 1,23±0,5 |
| | ENA BFpH3 | 10,1±0,6 | 89,24±0,5 | 0,63±0,1 |
| | ENA BFpH4 | 12,98±0,4 | 86,78±0,8 | 0,22±0,4 |
| 40±2°C (75%HR) | ENA BFpH2 | 32,41±0,6 | 36,11±0,9 | 31,47±0,9 |
| | ENA BFpH3 | 26,89±0,2 | 51,75±0,4 | 21,35±0,6 |
| | ENA BFpH4 | 43,05±0,5 | 42,98±0,6 | 13,96±0,4 |

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación, ENA-R (%): recuperación de maleato de enalapril, Enalaprilat-R (%): recuperación de enalaprilat, Dicetopiperazina-R (%): recuperación de dicetopiperazina.

Finalmente, cuando se empleó agua en la solubilización de ENA (Tabla 3.5.3), se observó la presencia de enalaprilat en la muestra conservada en heladera y la formación de ambas impurezas a temperatura ambiente.

Tabla 3.5.3 Recuperaciones de enalapril, enalaprilat y dicetopiperazina a los 6 meses y a 3 temperaturas en agua

| Agua | | | | |
|-------------------|----------|--------------------------|------------------|-------------------------------|
| CA | F | Enalaprilat-R (%) | ENA-R (%) | Dicetopiperazina-R (%) |
| 4±2°C | ENA H2O | 0,15±0,2 | 99,84±0,5 | 0,0 |
| 25±2°C | ENA H2O | 2,17±0,5 | 97,65±0,6 | 0,16±0,3 |
| 40±2°C (75%HR) | ENA H2O | 9,51±0,6 | 84,30±0,8 | 6,18±0,8 |

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación, ENA-R (%): recuperación de maleato de enalapril, Enalaprilat-R (%): recuperación de enalaprilat, Dicetopiperazina-R (%): recuperación de dicetopiperazina

3.5.1.1 Conclusión parcial

Dado que el límite propuesto por la monografía de farmacopea argentina para productos formulados es del 5% para sustancias relacionadas totales, las formulaciones preparadas con solución buffer citrato o fosfato a los pHs 2, 3 y 4, y 10% de Gli, conservadas en heladera, además de la formulación preparada con agua y 10%p/v de Gli conservada en heladera y temperatura ambiente, resultaron ser estables fisicoquímicamente por al menos 6 meses. Esta última opción facilitaría su elaboración de manera ágil y segura en farmacia hospitalaria, para ser usada como una formulación magistral, sin agregado de un agente conservante.

3.5.2 Estudios de estabilidad química. Influencia del tipo de agente antimicrobiano

La estabilidad microbiológica es otro parámetro esencial que investigar. Dado que los agentes antimicrobianos son compuestos químicos con diferentes propiedades fisicoquímicas y forman parte de la matriz de la formulación, pueden afectar la estabilidad química del IFA o viceversa, es decir, que el IFA afecte al agente conservante y afecte, de este modo, su capacidad antimicrobiana.

En esta etapa, se evaluaron tres agentes antimicrobianos, 1) metil (0,03 %p/v) y propilparabeno (0,07 %p/v), 2) benzoato de sodio (0,1%p/v) y 3) propionato de calcio (0,28 % p/v)¹⁵⁴ en todas las formulaciones desarrolladas en la etapa 1. La Figura 3.5.2 muestra las estructuras químicas de los agentes conservantes.

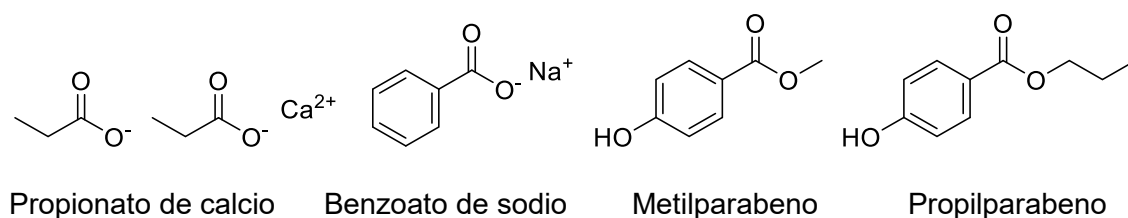


Figura 3.5.2 Estructuras químicas de los agentes antimicrobianos

Cuando se utilizó agua, se disolvió el conservante en la matriz junto con el ENA, mientras que cuando se emplearon las soluciones buffers, se disolvió el conservante en la matriz y se ajustó el pH final de la formulación. Estas formulaciones fueron almacenadas en

heladera, temperatura ambiente y en cámara, y el contenido de maleato de enalapril y sus productos de degradación fueron determinados por CLAE a los 6 meses de su elaboración, adicionalmente el pH final de las formulaciones fue medido. Cuando se empleó metil y propilparabeno o benzoato de sodio, el método farmacopeico (método 1) debió modificarse dado que los agentes conservantes interfirieron en la cuantificación de enalapril. Este método modificado pasó a llamarse “método 2”.

3.5.3 Influencia de diferentes antimicrobianos en la recuperación del ENA

3.5.3.1 Metil y propilparabeno

La Tablas 3.5.4, resumen los datos de recuperación de enalapril, enalaprilat y dicetopiperazina y el pH final de las diferentes formulaciones conteniendo metil y propilparabeno como conservantes y elaboradas con buffer citrato.

Tabla 3.5.4 Recuperaciones de enalapril, enalaprilat y dicetopiperazina a los 6 meses y pH final empleando metil y propilparabeno en solución reguladora citrato

| Solución reguladora Citrato/ácido cítrico | | | | | |
|-------------------------------------------|-----------|-------------------|-----------|------------------------|------|
| CA | F | Enalaprilat-R (%) | ENA-R (%) | Dicetopiperazina-R (%) | pH |
| 4±2°C | ENA BCpH2 | 0,9±0,5 | 99,07±0,5 | 0,0 | 2,33 |
| | ENA BCpH3 | 1,2±0,3 | 98,7±0,4 | 0,0 | 3,35 |
| | ENA BCpH4 | 1,4±0,4 | 98,6±0,6 | 0,0 | 4,07 |
| 25±2°C | ENA BCpH2 | 8,4±0,5 | 91,5±0,8 | 0,2±0,7 | 2,31 |
| | ENA BCpH3 | 8,3±0,7 | 91,6±0,7 | 0,2±0,6 | 3,32 |
| | ENA BCpH4 | 12,7±0,2 | 87,2±0,9 | 0,1±0,2 | 4,03 |
| 40±2°C (75%HR) | ENA BCpH2 | 28,3±0,6 | 66,7±0,8 | 4,9±0,4 | 2,34 |
| | ENA BCpH3 | 26,9± | 68,1±0,9 | 4,9±0,3 | 3,30 |
| | ENA BCpH4 | 41,5± | 54,3±0,3 | 4,2±0,5 | 4,05 |

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación, ENA-R (%): recuperación de maleato de enalapril, Enalaprilat-R (%): recuperación de enalaprilat, Dicetopiperazina-R (%): recuperación de dicetopiperazina

Las formulaciones conservadas en heladera en los 3 pHs estudiados, cumplieron con los requisitos farmacopeicos. La Figura 3.5.3 muestra los cromatogramas correspondientes a estas tres formulaciones, en la misma, pueden observarse los picos correspondientes a maleato, enalaprilat, propilparabeno y enalapril.

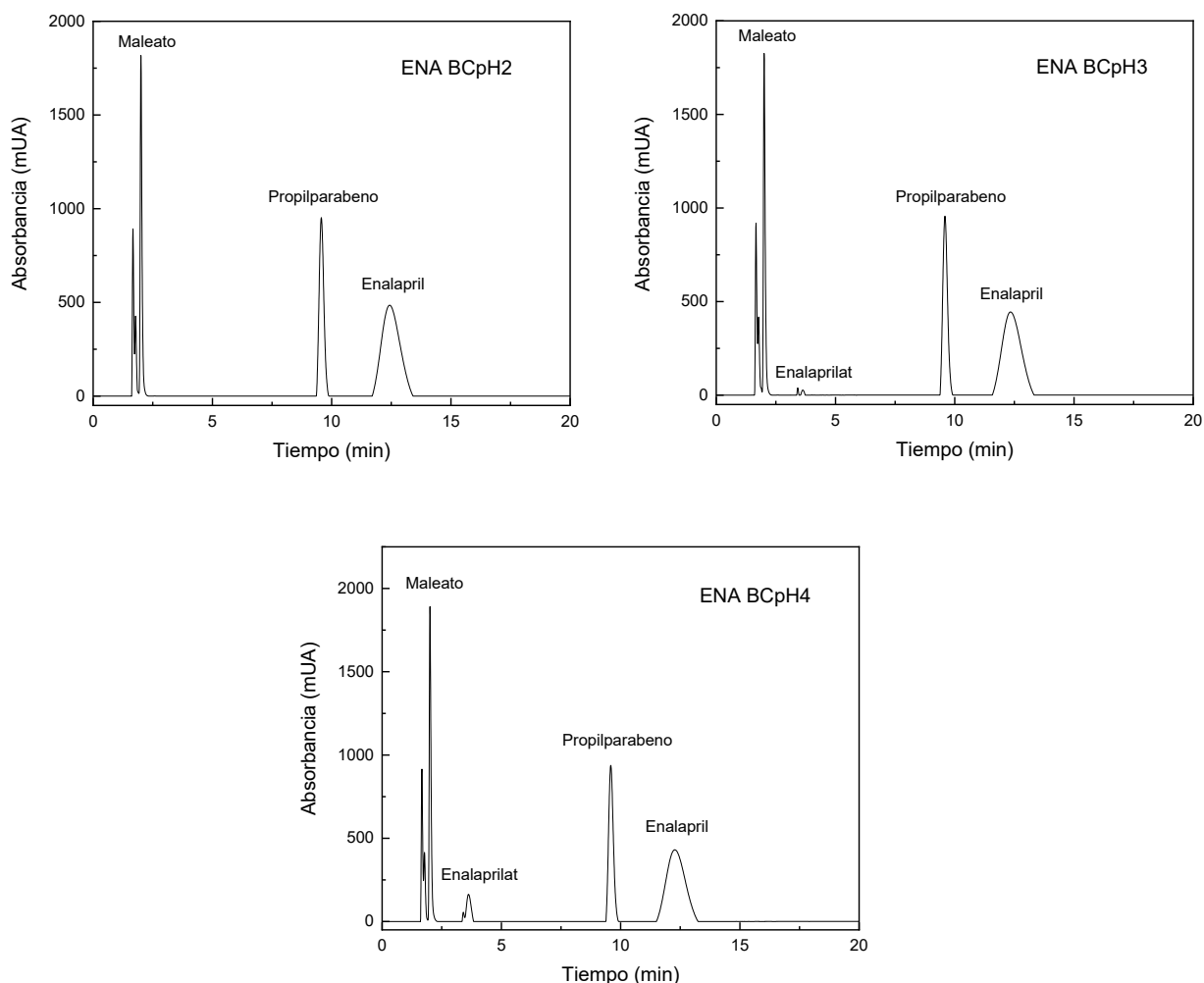


Figura 3.5.3 Cromatogramas correspondientes a las formulaciones disueltas en buffer citrato pHs 2, 3 y 4, con el agregado de metil y propilparabeno como agentes conservantes.

La Tabla 3.5.5 resume las recuperaciones obtenidas para ENA y sus productos de degradación cuando se empleó solución reguladora fosfato/ácido fosfórico a pH 2, 3 y 4.

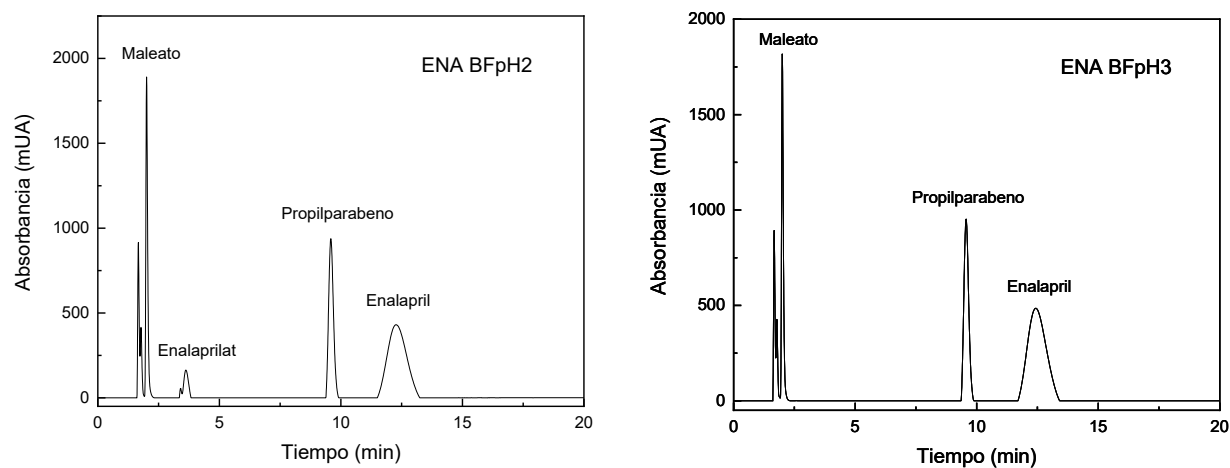
Tabla 3.5.5 Recuperaciones de enalapril, enalaprilat y dicetopiperazina a los 6 meses y pH final empleando metil y propilparabeno en solución reguladora fosfato.

| Solución reguladora Fosfato/ácido fosfórico | | | | | | |
|---------------------------------------------|-----------|-------------------|-----------|------------------------|------|--|
| CA | F | Enalaprilat-R (%) | ENA-R (%) | Dicetopiperazina-R (%) | pH | |
| 4±2°C | ENA BFpH2 | 2,4±0,2 | 97,6±0,7 | 0,0 | 2,06 | |
| | ENA BFpH3 | 1,4±0,4 | 98,6±0,5 | 0,0 | 3,11 | |
| | ENA BFpH4 | 1,6±0,1 | 98,4±0,4 | 0,0 | 4,16 | |
| 25±2°C | ENA BFpH2 | 20,7±0,3 | 79,5±0,6 | 0,7±0,4 | 2,12 | |
| | ENA BFpH3 | 9,6±0,5 | 90,3±0,8 | 0,4±0,2 | 3,07 | |
| | ENA BFpH4 | 13,8±0,4 | 86,2±0,4 | 0,1±0,6 | 4,02 | |
| 40±2°C (75%HR) | ENA BFpH2 | 50,3±0,2 | 38,7±0,2 | 11,0±0,4 | 2,15 | |
| | ENA BFpH3 | 27,1±0,6 | 64,3±0,6 | 8,6±0,5 | 3,09 | |
| | ENA BFpH4 | 40,3±0,4 | 54,4±0,4 | 5,3±0,6 | 4,05 | |

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación, ENA-R (%): recuperación de maleato de enalapril, Enalaprilat-R (%): recuperación de enalaprilat, Dicetopiperazina-R (%): recuperación de dicetopiperazina.

En este caso podemos observar que, a pesar de cumplir con los requerimientos farmacopeicos, las formulaciones conservadas en heladera mostraron mayor degradación cuando se prepararon utilizando buffer fosfato que cuando fueron elaboradas con buffer citrato a los mismos pH.

La Figura 3.5.4 muestra los cromatogramas obtenidos para estas formulaciones



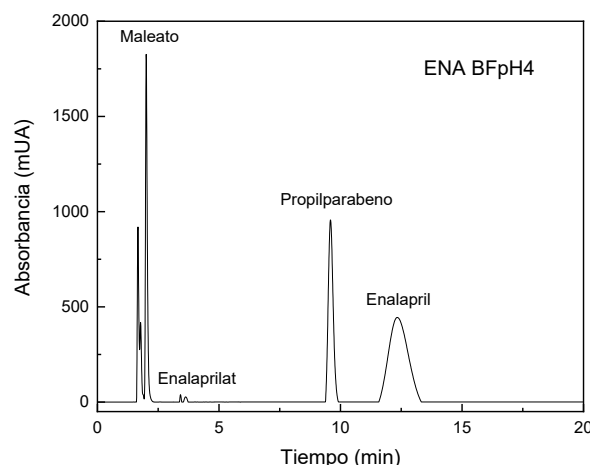


Figura 3.5.4 Cromatogramas correspondientes a las formulaciones disueltas en buffer fosfato pHs 2, 3 y 4, con el agregado de metil y propilparabeno como agentes conservantes

La Tabla 3.5.6 resume las recuperaciones de la formulación preparada con agua y Gli (10%v/v). Cuando fue almacenada tanto en heladera como a temperatura ambiente, cumple con los requerimientos farmacopeicos, siendo menor la degradación en heladera que a temperatura ambiente.

Tabla 3.5.6 Recuperaciones de enalapril, enalaprilat y dicetopiperazina a los 6 meses y pH final empleando metil y propilparabeno en agua como medio

| Agua | | | | | |
|-------------------|----------|--------------------------|------------------|-------------------------------|-----------|
| CA | F | Enalaprilat-R (%) | ENA-R (%) | Dicetopiperazina-R (%) | pH |
| 4±2°C | ENA agua | 0,7±0,5 | 99,3±0,5 | 0,0 | 2,92 |
| 25±2°C | ENA agua | 2,9±0,6 | 97,1±0,1 | 0,0 | 2,89 |
| 40±2°C (75%HR) | ENA agua | 9,6±0,4 | 87,0±0,3 | 3,4±0,4 | 2,90 |

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación, ENA-R (%): recuperación de maleato de enalapril, Enalaprilat-R (%): recuperación de enalaprilat, Dicetopiperazina-R (%): recuperación de dicetopiperazina.

La Figura 3.5.5 muestra los cromatogramas correspondientes a la formulación conservada en heladera y temperatura ambiente.

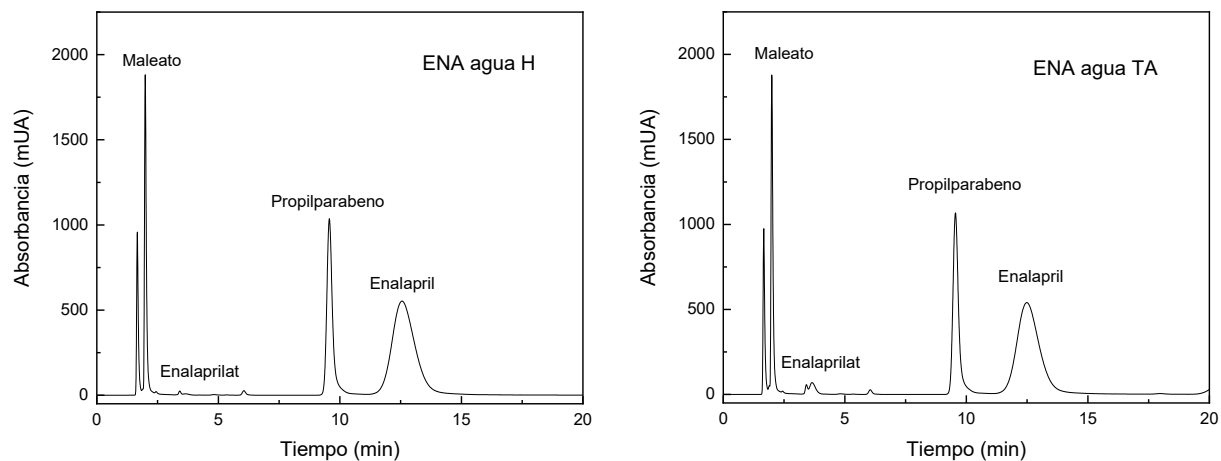


Figura 3.5.5 Cromatogramas de la formulación elaborada con agua a 4 y 25°C.

Como puede observarse en las Tablas 3.5.4, 3.5.5 y 3.5.6, en todas las formulaciones el producto de degradación preponderante fue enalaprilat. Las mejores recuperaciones se obtuvieron en las formulaciones disueltas en agua y conservada en heladera o temperatura ambiente y en ambas soluciones buffers a los pHs 2, 3 y 4 y conservadas en heladera. Por otro lado, cabe destacar que, a igualdad de pH en la formulación final, la degradación fue mayor cuando se utilizó buffer fosfato.

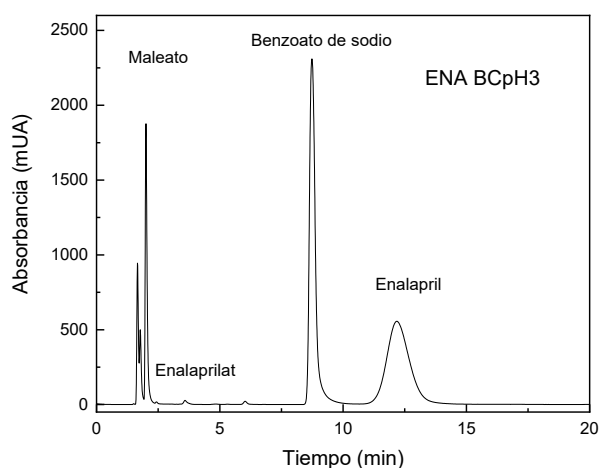
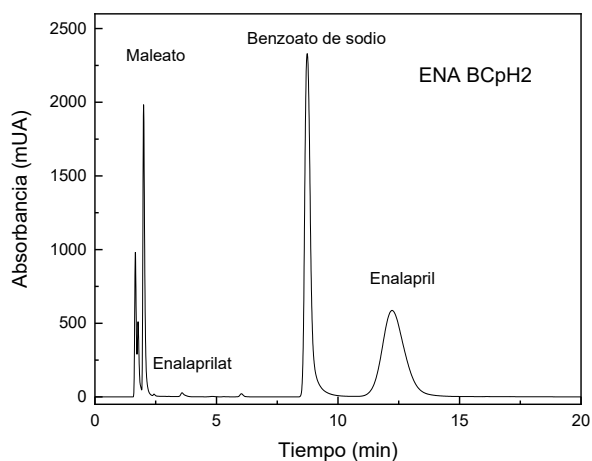
3.5.3.2 Benzoato de sodio

La Tabla 3.5.7 resume los datos de recuperación cuando se empleó la solución reguladora de citrato y benzoato de sodio como agente conservante. Las formulaciones conservadas en heladera a los tres pH analizados cumplieron con los requisitos farmacopeicos a los 6 meses de su elaboración. La Figura 3.5.6 muestra los cromatogramas correspondientes a estas formulaciones.

Tabla 3.5.7 Recuperaciones de enalapril, enalaprilat y dicetopiperazina a los 6 meses y pH final empleando benzoato de sodio y solución reguladora citrato.

| Solución reguladora Citrato/ácido cítrico | | | | | |
|--------------------------------------------------|-----------|--------------------------|------------------|-------------------------------|-----------|
| CA | F | Enalaprilat-R (%) | ENA-R (%) | Dicetopiperazina-R (%) | pH |
| | ENA BCpH2 | 1,0±0,2 | 99,0±0,5 | 0,0 | 2,55 |
| 4±2°C | ENA BCpH3 | 1,0±0,1 | 99,0±0,2 | 0,0 | 3,07 |
| | ENA BCpH4 | 1,1±0,6 | 98,9±0,3 | 0,0 | 3,93 |
| 25±2°C | ENA BCpH2 | 5,0±0,5 | 94,8±0,4 | 0,2±0,1 | 2,59 |
| | ENA BCpH3 | 6,1±0,3 | 93,7±0,2 | 0,2±0,2 | 3,01 |
| | ENA BCpH4 | 11,5±0,4 | 88,4±0,5 | 0,1±0,4 | 3,94 |
| 40±2°C (75%HR) | ENA BCpH2 | 13,9±0,3 | 80,2±0,3 | 5,9±0,3 | 2,52 |
| | ENA BCpH3 | 18,5±0,1 | 75,2±0,4 | 6,3±0,1 | 3,06 |
| | ENA BCpH4 | 38,2±0,2 | 57,4±0,2 | 4,4±0,2 | 3,96 |

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación, ENA-R (%): recuperación de maleato de enalapril, Enalaprilat-R (%): recuperación de enalaprilat, Dicetopiperazina-R (%): recuperación de dicetopiperazina.



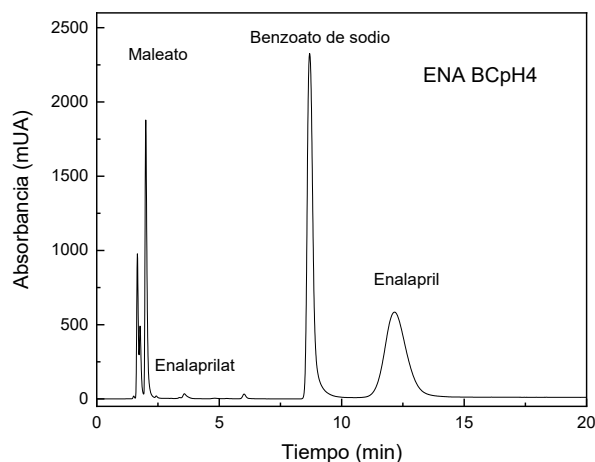


Figura 3.5.6 Cromatogramas de las formulaciones conservadas en heladera preparadas con buffer citrato a pH 2, 3 y 4 y benzoato de sodio como agente conservante.

La Tabla 3.5.8 resume los datos de recuperación cuando se empleó la solución reguladora de fosfato y benzoato de sodio como agente conservante. La Figura 3.5.7 muestra los cromatogramas correspondientes a estas formulaciones conservadas en heladera.

Tabla 3.5.8 Recuperaciones de enalapril, enalaprilat y dicetopiperazina a los 6 meses y pH final empleando benzoato de sodio y solución reguladora fosfato

| Solución reguladora Fosfato/ácido fosfórico | | | | | |
|---------------------------------------------|-----------|-------------------|-----------|------------------------|------|
| CA | F | Enalaprilat-R (%) | ENA-R (%) | Dicetopiperazina-R (%) | pH |
| 4±2°C | ENA BFpH2 | 1,9±0,2 | 99,1±0,5 | 0,0 | 2,0 |
| | ENA BFpH3 | 1,2±0,4 | 98,8±0,2 | 0,0 | 3,14 |
| | ENA BFpH4 | 1,2±0,3 | 98,8±0,4 | 0,0 | 3,95 |
| 25±2°C | ENA BFpH2 | 14,0±0,1 | 85,9±0,3 | 0,7±0,2 | 2,16 |
| | ENA BFpH3 | 9,1±0,2 | 90,6±0,5 | 0,3±0,3 | 3,19 |
| | ENA BFpH4 | 12,4±0,5 | 87,5±0,4 | 0,1±0,5 | 3,95 |
| 40±2°C (75%HR) | ENA BFpH2 | 31,4±0,3 | 53,1±0,2 | 15,5±0,4 | 2,08 |
| | ENA BFpH3 | 3,4±0,1 | 84,7±0,5 | 11,9±0,1 | 3,17 |
| | ENA BFpH4 | 39,3±0,6 | 55,3±0,1 | 5,4±0,6 | 3,94 |

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación, ENA-R (%): recuperación de maleato de enalapril, Enalaprilat-R (%): recuperación de enalaprilat, Dicetopiperazina-R (%): recuperación de dicetopiperazina.

En este caso, las formulaciones conservadas en heladera cumplen con los requerimientos farmacopeicos luego de 6 meses de su elaboración, pero puede verse un incremento en la degradación de enalapril, principalmente a pH 2, con respecto a la formulación preparada con buffer citrato, empleando el mismo agente conservante.

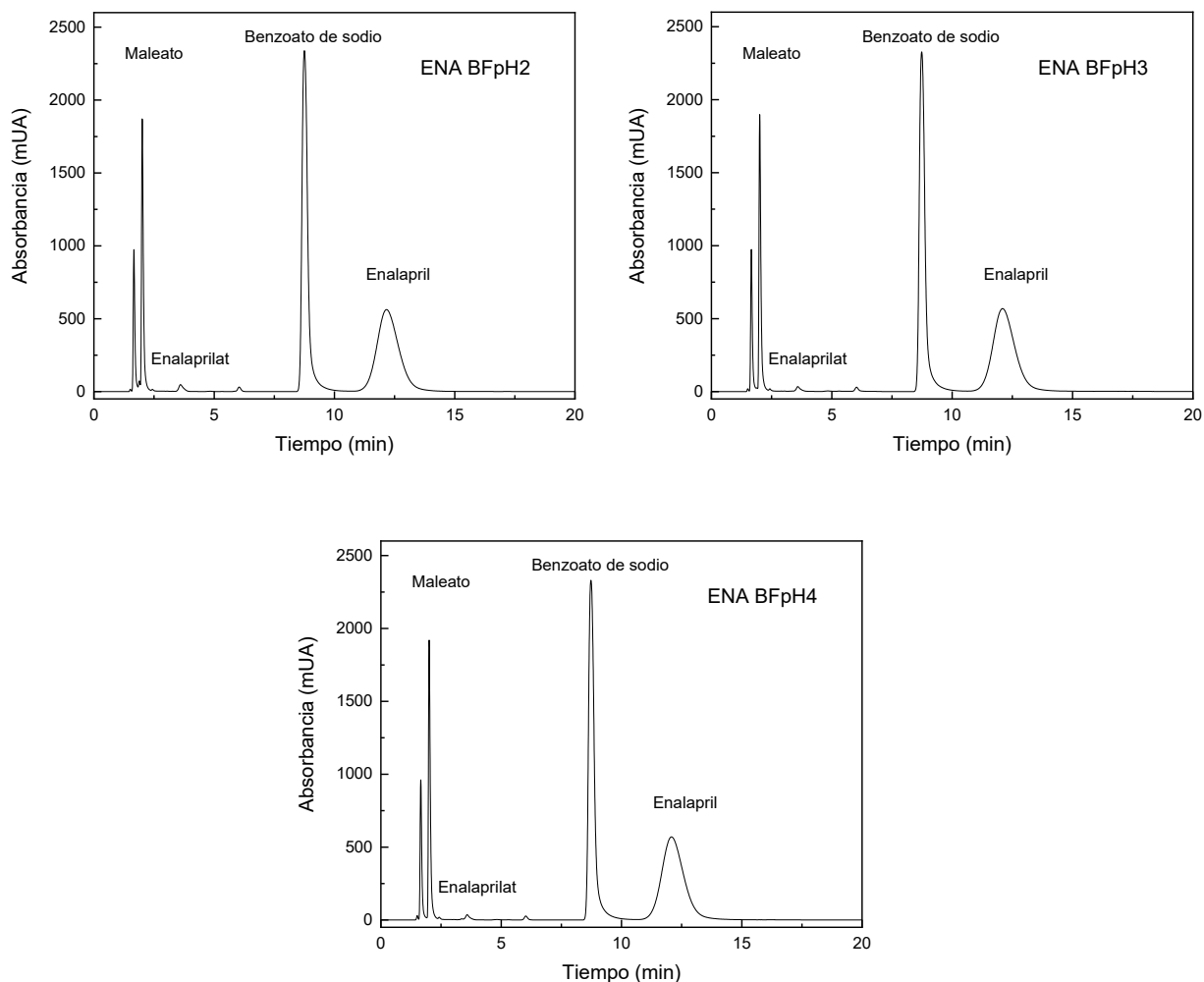


Figura 3.5.7 Cromatogramas correspondientes a las formulaciones elaboradas con buffer fosfato a pH 2, 3 y 4, conservadas en heladera, empleando benzoato de sodio como agente conservante.

Cuando se empleó agua en la preparación de la formulación (Tabla 3.5.9), se observó una degradación significativa usando benzoato de sodio como conservante (cuando la muestra fue almacenada a temperatura ambiente) con respecto a la misma condición, empleando metil y propilparabeno. En heladera, la concentración de enalaprilat pasó de 0,7% a 1,1%, pero a temperatura ambiente, el producto de degradación se incrementó de 2,9% a 10,3%, con aparición de dicetopiperazina. Cabe destacar, que el pH final de la

formulación cuando se empleó benzoato de sodio fue aproximadamente 4, y los resultados obtenidos se asemejan a los valores encontrados cuando se emplearon las diferentes soluciones reguladoras a ese pH, revelando la dependencia de estabilidad química de enalapril con el pH.

Tabla 3.5.9 Recuperación de enalapril, enalaprilat, dicetopiperazina a los 6 meses y pH final empleando benzoato de sodio y preparadas en agua como medio

| Agua | | | | | |
|-------------------|----------|-------------------|-----------|------------------------|------|
| CA | F | Enalaprilat-R (%) | ENA-R (%) | Dicetopiperazina-R (%) | pH |
| 4±2°C | ENA agua | 1,1±0,2 | 98,9±0,5 | 0,0 | 4,03 |
| 25±2°C | ENA agua | 10,3±0,3 | 89,6±0,3 | 0,1±0,1 | 4,09 |
| 40±2°C (75%HR) | ENA agua | 35,1±0,1 | 61,4±0,7 | 3,5±0,2 | 5,10 |

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación, ENA-R (%): recuperación de maleato de enalapril, Enalaprilat-R (%): recuperación de enalaprilat, Dicetopiperazina-R (%): recuperación de dicetopiperazina.

La Figura 3.5.8 muestra el cromatograma correspondiente a la formulación preparada en agua y almacenada en heladera.

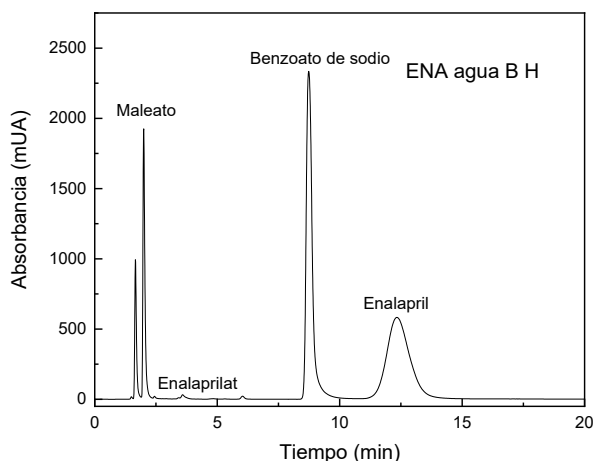


Figura 3.5.8 Cromatograma de la formulación preparada en agua y almacenada en heladera.

En todos los casos (Tablas 3.5.7, 3.5.8 y 3.5.9), únicamente las formulaciones conservadas en heladera resultaron ser estables, con formación de enalaprilat y dicetopiperazina dentro del límite aceptado por farmacopea argentina, resultado esperado debido a la degradación de enalapril en soluciones acuosas.

3.5.3.3 Propionato de Calcio

Las formulaciones elaboradas con buffer citrato o fosfato a todos los pH estudiados, fueron estables solamente cuando se conservaron en heladera (Tablas 3.5.10 y 3.5.11). Cabe destacar que no pudo desarrollarse la formulación conteniendo buffer citrato pH 2, dado que cuando se incorporó el propionato de calcio, se generó una solución turbia, con formación de precipitado.

Tabla 3.5.10 Recuperación de enalapril, enalaprilat, dicetopiperazina a los 6 meses y pH final empleando propionato de calcio y solución reguladora citrato

| Solución reguladora Citrato/ácido cítrico | | | | | |
|-------------------------------------------|-----------|-------------------|-----------|------------------------|------|
| CA | F | Enalaprilat-R (%) | ENA-R (%) | Dicetopiperazina-R (%) | pH |
| | ENA BCpH2 | - | - | - | - |
| 4±2°C | ENA BCpH3 | 2,8±0,2 | 97,2±0,6 | 0,0 | 3,12 |
| | ENA BCpH4 | 3,0±0,4 | 97,0±0,5 | 0,0 | 3,97 |
| | ENA BCpH2 | - | - | - | - |
| 25±2°C | ENA BCpH3 | 8,2±0,3 | 91,6±0,8 | 0,2±0,1 | 3,11 |
| | ENA BCpH4 | 14,1±0,5 | 85,8±0,4 | 0,1±0,3 | 3,96 |
| | ENA BCpH2 | - | - | - | - |
| 40±2°C (75%HR) | ENA BCpH3 | 21,4±0,7 | 72,5±0,6 | 6,1±0,4 | 3,13 |
| | ENA BCpH4 | 42,6±0,9 | 53,0±0,8 | 4,4±0,6 | 3,98 |
| | | | | | |

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación, ENA-R (%): recuperación de maleato de enalapril, Enalaprilat-R (%): recuperación de enalaprilat, Dicetopiperazina-R (%): recuperación de dicetopiperazina.

En este caso, las formulaciones conservadas en heladera cumplieron con los requisitos farmacopeicos, pero es de destacar que se incrementó el producto de degradación enalaprilat usando este agente conservante con respecto a la combinación de metil y propilparabeno y al benzoato de sodio, a los mismos pH finales. La Figura 3.5.9 muestra los cromatogramas de las formulaciones almacenadas en heladera a pH 3 y 4.

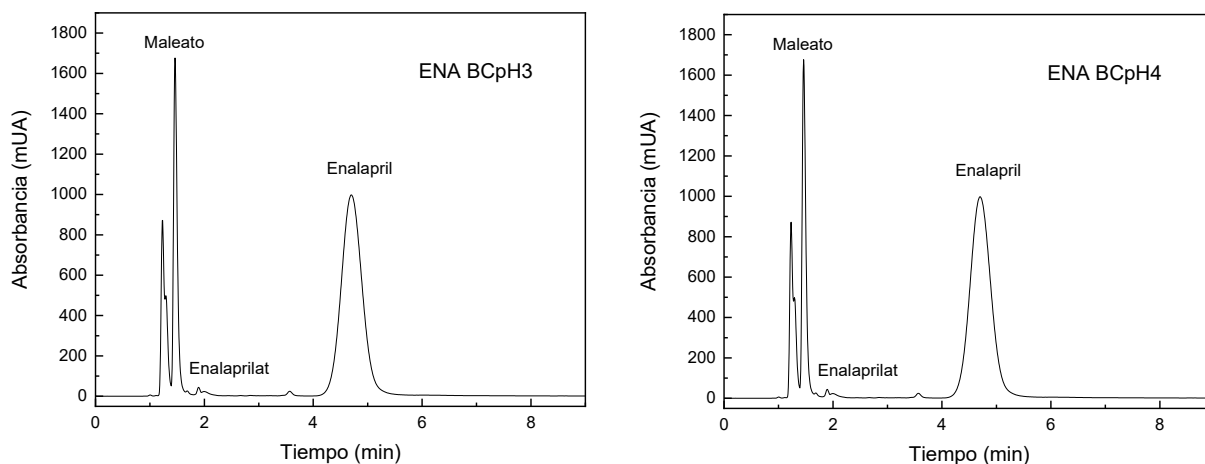


Figura 3.5.9 Cromatogramas de las formulaciones de enalapril elaboradas con buffer citrato y con propionato de calcio, almacenadas en heladera.

La Tabla 3.5.11 resume los datos de las formulaciones elaboradas con buffer fosfato.

Se puede observar que las formulaciones conservadas en heladera cumplen con los requerimientos farmacopeicos, pero se observa un incremento en la degradación de ENA a los 3 pH evaluados con respecto a las soluciones elaboradas con los otros conservantes.

Tabla 3.5.11 Recuperación de enalapril, enalaprilat, dicetopiperazina a los 6 meses y pH final empleando propionato de calcio y buffer fosfato

| Solución reguladora Fosfato/ácido fosfórico | | | | | |
|---------------------------------------------|-----------|-------------------|-----------|------------------------|------|
| CA | F | Enalaprilat-R (%) | ENA-R (%) | Dicetopiperazina-R (%) | pH |
| 4±2°C | ENA BFpH2 | 3,85±0,2 | 96,15±0,2 | 0,00 | 2,10 |
| | ENA BFpH3 | 2,89±0,5 | 97,11±0,4 | 0,00 | 3,02 |
| | ENA BFpH4 | 2,23±0,3 | 97,77±0,3 | 0,00 | 4,12 |
| 25±2°C | ENA BFpH2 | 19,11±0,1 | 79,80±0,6 | 1,09±0,2 | 2,00 |
| | ENA BFpH3 | 13,39±0,4 | 86,25±0,5 | 0,37±0,6 | 3,08 |
| | ENA BFpH4 | 18,04±0,6 | 81,93±0,2 | 0,14±0,5 | 4,03 |
| 40±2°C (75%HR) | ENA BFpH2 | 38,88±0,2 | 42,03±0,7 | 19,09±0,3 | 2,10 |
| | ENA BFpH3 | 32,01±0,5 | 56,84±0,6 | 11,15±0,4 | 3,05 |
| | ENA BFpH4 | 51,91±0,7 | 43,07±0,5 | 5,03±0,5 | 4,07 |

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación, ENA-R (%): recuperación de maleato de enalapril, Enalaprilat-R (%): recuperación de enalaprilat, Dicetopiperazina-R (%): recuperación de dicetopiperazina.

La Figura 3.5.10 muestra los cromatogramas de las formulaciones de enalapril conservadas en heladera, empleando propionato de calcio como agente conservante.

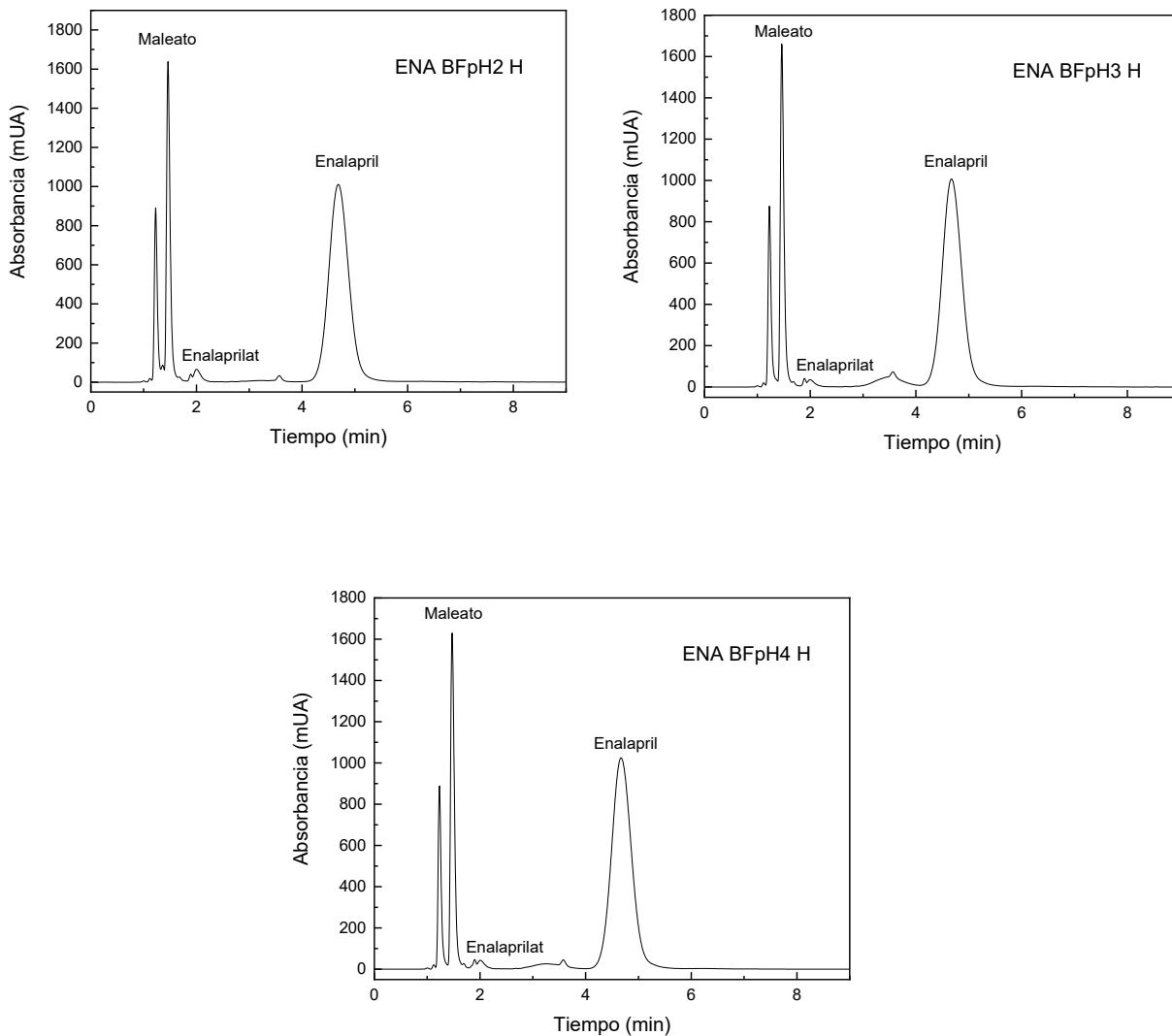


Figura 3.5.10 Cromatogramas de las formulaciones de enalapril, preparadas con buffer fosfato a pH 2, 3 y 4, almacenadas en heladera, empleando propionato de calcio como agente

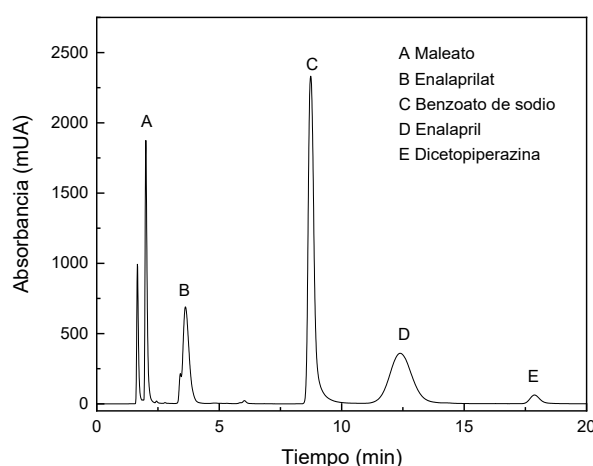
Cuando se utilizó agua como disolvente, se disolvió propionato de calcio en agua y el pH final fue de 8,03. Posteriormente, se incorporó la Gli y el ENA. El pH final de la formulación bajó a 5,3, dadas las características ácidas del IFA. Pero, como en el caso del benzoato de sodio, este pH no favorece la estabilidad del IFA y la degradación fue de mayor magnitud que en el caso anterior, con formación de enalaprilat en un 95% cuando fue conservada en cámara, a 40°C (Tabla 3.5.12).

Tabla 3.5.12 Recuperación de enalapril, enalaprilat, dicetopiperazina a los 6 meses y pH final empleando propionato de calcio y preparadas en agua como medio

| Agua | | | | | |
|-------------------|----------|-------------------|-----------|------------------------|------|
| CA | F | Enalaprilat-R (%) | ENA-R (%) | Dicetopiperazina-R (%) | pH |
| 4±2°C | ENA agua | 7,0±0,2 | 93,0±0,5 | 0,0 | 5,29 |
| 25±2°C | ENA agua | 52,5±0,4 | 47,4±0,3 | 0,1±0,1 | 5,27 |
| 40±2°C (75%HR) | ENA agua | 94,8±0,1 | 4,2±0,4 | 1,0±0,3 | 5,26 |

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación, ENA-R (%): recuperación de maleato de enalapril, Enalaprilat-R (%): recuperación de enalaprilat, Dicetopiperazina-R (%): recuperación de dicetopiperazina.

A modo de ejemplo, se presentan dos cromatogramas de formulaciones conservadas en cámara, donde pueden verse con mayor claridad los productos de degradación de enalapril, enalaprilat y dicetopiperazina. El cromatograma presentado en la Figura 3.5.11 corresponde a la formulación elaborada con agua, empleando benzoato de sodio como agente conservante y conservada en cámara, mientras que el cromatograma presentado en la Figura 3.5.12 corresponde a una formulación elaborada con buffer fosfato y propionato de calcio, conservada en cámara. En el primer caso, se empleó el “método 2”, una modificación del método farmacopeico (método 1). En el segundo caso, cuando se utilizó propionato de calcio, se utilizó el método farmacopeico sin modificaciones.


Figura 3.5.11 Formulación de enalapril en agua, con benzoato almacenada en cámara

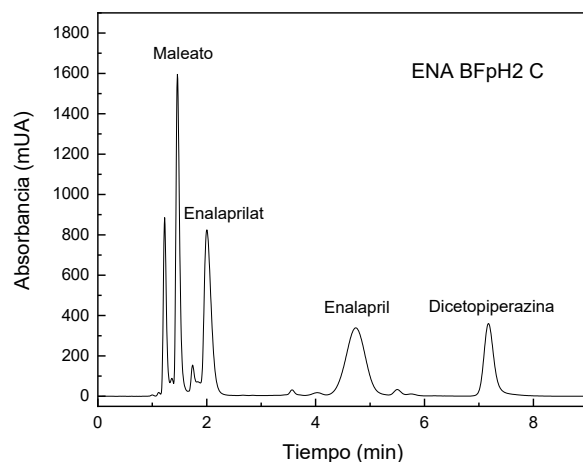


Figura 3.5.12 Formulación de enalapril en buffer fosfato, pH2, empleando propionato de calcio como agente conservante y almacenada en cámara.

El método farmacopeico, empleado para la cuantificación de ENA en comprimidos, debió ser modificado dado que cuando se empleaba la combinación de propil y metilparabeno o benzoato de sodio como agentes conservantes, interferían en la cuantificación de ENA, ya que eluían en el mismo tiempo de retención, no resultando ser un método selectivo para llevar a cabo la cuantificación en la formulación líquida desarrollada. Como puede observarse en la Figura 3.5.11, la resolución entre los picos permitió una correcta cuantificación de ENA, pero el cromatograma tuvo una duración de 20 minutos.

En la Figura 3.5.12, cuando se empleó propionato de calcio, este agente conservante no influyó en la determinación de ENA y pudo usarse sin modificaciones, con una duración final de 8 minutos en cada cromatograma. Es importante destacar la influencia del agente conservante presente en una formulación a la hora de llevar a cabo un método cromatográfico. No existe una monografía oficial para formulaciones orales líquidas de ENA, por lo que el método 2 sería una alternativa para controlarlas.

3.5.4 Estudio de estabilidad microbiológico

Para garantizar la estabilidad microbiológica, tres agentes antimicrobianos (metil y propilparabeno, benzoato de sodio y propionato de calcio) fueron testeados en las formulaciones desarrolladas en la etapa 1. Todos los conservantes evaluados fueron

efectivos generando formulaciones microbiológicamente estables. En la Tabla 3.5.13 se presentan los resultados microbiológicos de las formulaciones que fueron estables químicamente a los seis meses de su elaboración.

Tabla 3.5.13 Resultados de los estudios de estabilidad microbiológica de las formulaciones optimizadas a los 6 meses de su elaboración.

| CA | F | CMAT | CTHyL | Ec | Resultado |
|-------------------------------|-----------|------|-------|----------|-----------|
| Metil y propilparabeno | | | | | |
| 4 ± 2°C | ENA agua | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| 25 ± 2°C | ENA agua | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| 4 ± 2°C | ENA BCpH2 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | ENA BCpH3 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | ENA BCpH4 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | ENA BFpH2 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | ENA BFpH3 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | ENA BFpH4 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| Benzoato de sodio | | | | | |
| 4 ± 2°C | ENA agua | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | ENA BCpH2 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | ENA BCpH3 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | ENA BCpH4 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | ENA BFpH2 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | ENA BFpH3 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | ENA BFpH4 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| Propionato de calcio | | | | | |
| 4 ± 2°C | ENA BCpH3 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | ENA BCpH4 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | ENA BFpH2 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | ENA BFpH3 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |
| | ENA BFpH4 | 0 | 0 | Ausencia | Cumple |

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación, CMAT: Conteo de microbios aerobios totales (UFC/mL) – Cumple si es <1.000, CTHyL: Conteo total de hongos y levaduras (UFC/mL) - Cumple si es <100, Ec: *Escherichia coli* – Cumple si hay ausencia

3.5.5 Conclusión

En este caso, se plantearon dos etapas distintas en el desarrollo de las formulaciones líquidas de ENA. En la Etapa 1, se evaluó la influencia del pH en la estabilidad química del IFA. Las formulaciones preparadas con solución buffer citrato o fosfato a los pHs 2, 3 y 4, y 10% de glicerina, conservadas en heladera, además de la formulación preparada con agua y 10%p/v de glicerina conservada en heladera y temperatura ambiente, resultaron ser estables fisicoquímicamente por al menos 6 meses.

Esta última opción facilitaría su elaboración de manera ágil y segura en farmacia hospitalaria, pero no brinda información con respecto a su estabilidad microbiológica.

En la Etapa 2, se evaluó la influencia de tres agentes antimicrobianos sobre la estabilidad fisicoquímica del IFA. Cuando se empleó metil y propilparabeno, las mejores recuperaciones se obtuvieron en las formulaciones disueltas en agua y conservada en heladera o temperatura ambiente y en ambas soluciones buffers a los pHs 2, 3 y 4 y conservadas en heladera. Por otro lado, cabe destacar que, a igualdad de pH en la formulación final, la degradación fue mayor cuando se utilizó buffer fosfato.

Cuando se empleó benzoato de sodio, se incrementó considerablemente la degradación en agua con respecto a la obtenida usando la combinación de propil y metilparabeno. Pudo observarse que el pH final de la formulación fue de 5, lo que estaría acorde a la dependencia de su estabilidad con el pH. En todos los casos, únicamente las formulaciones conservadas en heladera resultaron ser estables, con formación de enalaprilat y dicetopiperazina dentro del límite aceptado por farmacopea argentina, resultado esperado para la degradación de enalapril en soluciones acuosas.

Cuando se empleó propionato de sodio, las formulaciones elaboradas con buffer citrato o fosfato a todos los pHs estudiados, fueron estables solamente cuando se conservaron en heladera. En este caso, no se obtuvieron resultados satisfactorios en la formulación elaborada con agua debido a las características básicas del propionato (pH final en agua: 7,5-10,5), que, combinadas a las características ácidas de ENA, resultó en un pH final cercano a 5.

CAPITULO 4

CONCLUSIONES

Gotas de atenolol

Se obtuvieron tres formulaciones líquidas de ATN, las cuales cumplieron con los criterios de estabilidad química luego de seis meses en cámara a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ ($75 \pm 5\%$ RH). La prueba microbiológica mostró que solo las formulaciones a base de Gli y Gli/Jar cumplieron con los requisitos. Estas formulaciones, empleando excipientes en un rango recomendado por la EMA, mostraron estabilidad química y microbiológica durante al menos 6 meses incluso en las peores condiciones de almacenamiento. Finalmente, se evaluó la influencia de dos tipos de envases, vidrio color ámbar tipo III y envases de polietileno de media densidad, con inserto de polietileno de baja densidad y tapa de polipropileno, en la estabilidad la formulación conteniendo Gli (10 %v/v). Los resultados obtenidos luego de aplicar un test “t”, demostraron que no existe diferencia significativa en la recuperación de ATN cuando se emplearon los envases estudiados. Teniendo en cuenta estos resultados, estas formulaciones de ATN podrían considerarse adecuadas para su potencial uso en pacientes pediátricos.

Gotas de Citrato de Sildenafil

Se desarrolló soluciones conteniendo SIL con concentraciones de 2 mg mL⁻¹ o 4 mg mL⁻¹, Gli como cosolvente, un regulador de pH y conservantes permitidos. Las formulaciones demostraron ser estables durante 6 meses tanto química como microbiológicamente. Finalmente, se realizó un ensayo de palatabilidad y se demostró que cuando la formulación se diluyó en leche hasta alcanzar la dosis pediátrica media, esta dilución presentó una palatabilidad similar a la de la leche sola y no se observó ningún precipitado, turbidez o desnaturalización de la leche durante un día. Teniendo en cuenta estos resultados, esta formulación debe considerarse adecuada para pacientes pediátricos, incluidos pacientes diabéticos.

Gotas de Hidroclorotiazida

Se desarrolló una formulación oral líquida de HCT con una concentración de 2 mg mL⁻¹, Sor (2,5%v/v), Gli (4,7%v/v), PPG (12,5%v/v), con un pH final de 3,18, apta para ser administradas en pacientes pediátricos. Para favorecer la estabilidad física, se incorporó HPMC en concentraciones de 0,5 y 1%p/v. Estas formulaciones fueron almacenadas en tres condiciones, y fueron evaluadas mensualmente con respecto a su contenido de HCT, además de un control organoléptico (olor, color, presencia de turbidez o precipitados) durante 6 meses. Las mejores recuperaciones se encontraron en la formulación conteniendo 1% p/v de HPMC y conservada en heladera, ya que cumple con el límite de impurezas fijado por la correspondiente monografía farmacopeica. Finalmente, Esta formulación resultó ser estable en heladera al menos 6 meses, tanto química como microbiológicamente.

Gotas de Furosemida

Se desarrollaron formulaciones conteniendo 2, 5 y 14,7 mg mL⁻¹ de FURO-B empleando dos procedimientos. Se evaluó la estabilidad fisicoquímica empleando dos tipos de envases, vidrio tipo III color ámbar y polietileno de densidad media. Las formulaciones desarrolladas no contienen etanol, presentan un pH final de 7, y excipientes aprobados para usar en pediatría. La formulación de 2 mg mL⁻¹ facilitará el ajuste de dosificación acorde al peso del paciente, principalmente en recién nacidos. Estas formulaciones podrían ser una alternativa en farmacia hospitalaria o la opción de un medicamento genérico para la industria.

El método propuesto de análisis de FURO-B mediante espectrofotometría UV/VIS ha resultado ser un método simple, rápido y sencillo para valorar las concentraciones de este IFA en disolución, siendo posible realizar su análisis sin necesidad de un tratamiento previo de la muestra. El método propuesto es preciso y exacto por lo que puede ser considerado adecuado para realizar la cuantificación de FURO-B. Esta metodología alternativa ha demostrado ser tan eficaz como la CLAE, utilizado en la actualidad.

El propósito del nuevo método espectrofotométrico no es reemplazar los métodos disponibles con CLAE, sino servir como un método alternativo para usar cuando CLAE no esté disponible, teniendo siempre presente sus limitaciones.

Gotas de Maleato de Enalapril

Se evaluó la influencia del pH en la estabilidad química del IFA obteniéndose que las formulaciones preparadas con solución buffer citrato o fosfato a los pHs 2, 3 y 4, y 10% de glicerina, conservadas en heladera, además de la formulación preparada con agua y 10%p/v de glicerina conservada en heladera y temperatura ambiente, resultaron ser estables fisicoquímicamente por al menos 6 meses. Esta última opción facilitaría su elaboración de manera ágil y segura en farmacia hospitalaria, pero no brinda información con respecto a su estabilidad microbiológica.

A continuación, se evaluó la influencia de tres agentes antimicrobianos sobre la estabilidad fisicoquímica del IFA. Cuando se empleó metil y propilparabeno, las mejores recuperaciones se obtuvieron en las formulaciones disueltas en agua y conservada en heladera o temperatura ambiente y en ambas soluciones buffers a los pHs 2, 3 y 4 y conservadas en heladera. Por otro lado, cabe destacar que, a igualdad de pH en la formulación final, la degradación fue mayor cuando se utilizó buffer fosfato.

Cuando se empleó benzoato de sodio, se incrementó considerablemente la degradación en agua con respecto a la obtenida usando la combinación de propil y metilparabeno. En todos los casos, únicamente las formulaciones conservadas en heladera resultaron ser estables, con formación de enalaprilat y dicetopiperazina dentro del límite aceptado por farmacopea argentina, Cuando se empleó propionato de sodio, las formulaciones elaboradas con buffer citrato o fosfato a todos los pHs estudiados, fueron estables solamente cuando se conservaron en heladera. En este caso, no se obtuvieron resultados satisfactorios en la formulación elaborada con agua debido a las características básicas del propionato resultó en un pH final cercano a 5.

Conclusión general

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis permiten asegurar que se ha dado respuesta a una necesidad referida al desarrollo de formulaciones farmacéuticas destinadas a una población vulnerable. Particularmente, se han desarrollado y optimizado formas farmacéuticas líquidas de uso oral para el tratamiento de cardiopatías en pacientes pediátricos. Estos desarrollos se han llevado a cabo empleando excipientes aprobados para pacientes pediátricos y en concentraciones seguras para esta población. El empleo de diseños experimentales ha demostrado ser una muy útil herramienta a fin de obtener formulaciones con las características buscadas. Las formulaciones seleccionadas, que han demostrado ser estables tanto química como microbiológicamente, permiten una correcta y segura dosificación en base al peso corporal del paciente. En base a lo mencionado, las formulaciones desarrolladas en este trabajo de Tesis deben ser consideradas para el tratamiento de cardiopatías en pacientes pediátricos.

Referencias bibliográficas

- 1- Woo, T. M. (2021). Pediatric Pharmacology Update. *Advances in Family Practice Nursing*, 3, 169-181.
- 2- Shirkey, H. (1999). Editorial comment: therapeutic orphans. *Pediatrics*, 104(Supplement_3), 583-584.
- 3- Seyberth, H. W., & Kauffman, R. E. (2011). Basics and dynamics of neonatal and pediatric pharmacology. In *Pediatric clinical pharmacology* (pp. 3-49). Springer, Berlin, Heidelberg.
- 4- Valverde Molina, E. (2011). Farmacia pediátrica hospitalaria.
- 5- Venables, R., Batchelor, H., Hodson, J., Stirling, H., & Marriott, J. (2015). Determination of formulation factors that affect oral medicines acceptability in a domiciliary paediatric population. *International journal of pharmaceuticals*, 480(1-2), 55-62.
- 6- Holford, N., Heo, Y. A., & Anderson, B. (2013). A pharmacokinetic standard for babies and adults. *Journal of pharmaceutical sciences*, 102(9), 2941-2952.
- 7- Wollmer, E., Ungell, A. L., Nicolas, J. M., & Klein, S. (2021). Review of paediatric gastrointestinal physiology relevant to the absorption of orally administered medicines. *Advanced drug delivery reviews*, 114084.
- 8- Hirschfeld, S., & Saint-Raymond, A. (2011). Pediatric regulatory initiatives. In *Pediatric Clinical Pharmacology* (pp. 245-268). Springer, Berlin, Heidelberg.
- 9- Richey, R. H., Shah, U. U., Peak, M., Craig, J. V., Ford, J. L., Barker, C. E., ... & Turner, M. A. (2013). Manipulation of drugs to achieve the required dose is intrinsic to paediatric practice but is not supported by guidelines or evidence. *BMC pediatrics*, 13(1), 1-8.
- 10- Turner, M. A., Catapano, M., Hirschfeld, S., & Giaquinto, C. (2014). Paediatric drug development: the impact of evolving regulations. *Advanced drug delivery reviews*, 73, 2-13.
- 11- Bourgeois, F. T., Murthy, S., Pinto, C., Olson, K. L., Ioannidis, J., & Mandl, K. D. (2012). Pediatric versus adult drug trials for conditions with high pediatric disease burden. *Pediatrics*, 130(2), 285-292.
- 12- Joseph, P. D., Craig, J. C., & Caldwell, P. H. (2015). Clinical trials in children. *British journal of clinical pharmacology*, 79(3), 357-369.
- 13- Turner, M. A. (2015). Clinical trials of medicines in neonates: the influence of ethical and practical issues on design and conduct. *British journal of clinical pharmacology*, 79(3), 370-378.
- 14- Germany (Territory under Allied occupation, & 1945-1955: US Zone) Military Tribunals. (1949). Trials of War Criminals Before the Nuernberg Military Tribunals Under Control Council Law No. 10: US v. Brandt. US Government Printing Office.
- 15- van Delden, J. J., & van der Graaf, R. (2017). Revised CIOMS international ethical guidelines for health-related research involving humans. *Jama*, 317(2), 135-136.
- 16- Regulation, E. M. A. (2006). No 1901/2006 of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 on medicinal products for paediatric use and amending Regulation (EEC) No 1768/92. *J Eur Union*, 378, 1-19.

- 17- European Union. (2006). Regulation (EC) no. 1902/2006 of the European Parliament and of the council of 20 December 2006 amending Regulation 1901//2006 on medicinal products for paediatric use.
- 18- Tuleu, C. (2017). Better medicines for children: are we there yet?. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69(4), 349-349.
- 19- Rocchi, F., & Tomasi, P. (2011). The development of medicines for children: part of a series on pediatric pharmacology, guest edited by Gianvincenzo Zuccotti, Emilio Clementi, and Massimo Molteni. *Pharmacological research*, 64(3), 169-175.
- 20- 2003 The Pediatric Research Equity Act (PREA) - a requirement which allows the FDA to require pediatric studies in drugs and biologics for certain applications
- 21- 2002 Best Pharmaceuticals for Children Act (BPCA) – reauthorization of the Pediatric Exclusivity provision
- 22- Mulberg, A. E., & Cripps, T. (2019). Global harmonization of pediatric drug development: critical for progress for developing safe and effective therapeutic agents for children. *Current Therapeutic Research*, 90, 109-112.
- 23- Zaloña, R. G., & Cotanda, F. L. (2019). Monopolios y precios de los medicamentos: un problema ético y de salud pública. Documentos de trabajo (Laboratorio de alternativas), (202), 1.
- 24- Cuzzolin, L., Atzei, A., & Fanos, V. (2006). Off-label and unlicensed prescribing for newborns and children in different settings: a review of the literature and a consideration about drug safety. *Expert opinion on drug safety*, 5(5), 703-718.
- 25- Closing gaps in access to medicine for children: how R&D and delivery efforts can be ramped up. Amsterdam: Access to Medicines Foundation; 2021 (<https://accesstomedicinefoundation.org/publications/closing-gaps-in-access-to-medicinefor-children-how-r-d-and-delivery-efforts-can-beramped-up>, accessed 21 December 2021).
- 26- Kristensen, H. G. (2012). WHO guideline development of paediatric medicines: points to consider in pharmaceutical development. *International journal of pharmaceuticals*, 2(435), 134-135.
- 27- Meltzer, E. O., Welch, M. J., & Ostrom, N. K. (2006). Pill swallowing ability and training in children 6 to 11 years of age. *Clinical pediatrics*, 45(8), 725-733.
- 28- Lopez, F. L., Ernest, T. B., Tuleu, C., & Gul, M. O. (2015). Formulation approaches to pediatric oral drug delivery: benefits and limitations of current platforms. *Expert opinion on drug delivery*, 12(11), 1727-1740.
- 29- Charkoftaki, G., Kytariolos, J., & Macheras, P. (2010). Novel milk-based oral formulations: proof of concept. *International journal of pharmaceuticals*, 390(2), 150-159.
- 30- Vrignaud, S., Briot, T., Launay, A., Kempf, M., & Lagarce, F. (2015). Design and stability study of a paediatric oral solution of methotrexate 2 mg/ml. *International Journal of Pharmaceuticals*, 487(1-2), 270-273.
- 31- Thakur, R., Anwer, M. K., Shams, M. S., Ali, A., Khar, R. K., Shakeel, F., & Taha, E. I. (2009). Proniosomal transdermal therapeutic system of losartan potassium: development and pharmacokinetic evaluation. *Journal of drug targeting*, 17(6), 442-449.

- 32- Praveen, S. H., & Udupa, N. (2000). Formulation and evaluation of nimesulide transdermal drug delivery systems. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62(5), 376.
- 33- (EMA/PDCO/246339/2013. Inventory of paediatric therapeutic needs. Cardiovascular therapeutic area. Hum Med Dev Eval. 2013;1–6. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2013/04/WC500142474.pdf.)
- 34- Barst, R. J., Ertel, S. I., Beghetti, M., & Ivy, D. D. (2011). Pulmonary arterial hypertension: a comparison between children and adults. *European Respiratory Journal*, 37(3), 665-677.
- 35- Cohen, A. H., Hanson, K., Morris, K., Fouty, B., McMurty, I. F., Clarke, W., & Rodman, D. M. (1996). Inhibition of cyclic 3'-5'-guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase selectively vasodilates the pulmonary circulation in chronically hypoxic rats. *The Journal of clinical investigation*, 97(1), 172-179.
- 36- Haworth, S. G., & Hislop, A. A. (2009). Treatment and survival in children with pulmonary arterial hypertension: the UK Pulmonary Hypertension Service for Children 2001–2006. *Heart*, 95(4), 312-317.
- 37- Galiè, N., Ghofrani, H. A., Torbicki, A., Barst, R. J., Rubin, L. J., Badesch, D., ... & Simonneau, G. (2005). Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *New England Journal of Medicine*, 353(20), 2148-2157.
- 38- Barst, R. J., McGoon, M. D., Elliott, C. G., Foreman, A. J., Miller, D. P., & Ivy, D. D. (2012). Survival in childhood pulmonary arterial hypertension: insights from the registry to evaluate early and long-term pulmonary arterial hypertension disease management. *Circulation*, 125(1), 113-122.
- 39- Berger, R. M., Beghetti, M., Humpl, T., Raskob, G. E., Ivy, D. D., Jing, Z. C., ... & Barst, R. J. (2012). Clinical features of paediatric pulmonary hypertension: a registry study. *The Lancet*, 379(9815), 537-546.
- 40- Hanson, K. A., Ziegler, J. W., Rybalkin, S. D., Miller, J. W., Abman, S. H., & Clarke, W. R. (1998). Chronic pulmonary hypertension increases fetal lung cGMP phosphodiesterase activity. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 275(5), L931-L941.
- 41- Humpl, T., Reyes, J. T., Holtby, H., Stephens, D., & Adatia, I. (2005). Beneficial effect of oral sildenafil therapy on childhood pulmonary arterial hypertension: twelve-month clinical trial of a single-drug, open-label, pilot study. *Circulation*, 111(24), 3274-3280.
- 42- Apitz, C., Reyes, J. T., Holtby, H., Humpl, T., & Redington, A. N. (2010). Pharmacokinetic and hemodynamic responses to oral sildenafil during invasive testing in children with pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 55(14), 1456-1462.
- 43- Abrams, D., Schulze-Neick, I., & Magee, A. G. (2000). Sildenafil as a selective pulmonary vasodilator in childhood primary pulmonary hypertension. *Heart*, 84(2), e4-e4.
- 44- Karatza, A. A., Bush, A., & Magee, A. G. (2005). Safety and efficacy of sildenafil therapy in children with pulmonary hypertension. *International journal of cardiology*, 100(2), 267-273.
- 45- Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, B., & Watts, J. (2011). Clarke's analysis of drugs and poisons (Vol. 3). London: Pharmaceutical press.

-
- 46- Carter, B. L., Ernst, M. E., & Cohen, J. D. (2004). Hydrochlorothiazide versus chlorthalidone: evidence supporting their interchangeability. *Hypertension*, 43(1), 4-9.
- 47- Sanphui, P., Devi, V. K., Clara, D., Malviya, N., Ganguly, S., & Desiraju, G. R. (2015). Cocrystals of hydrochlorothiazide: solubility and diffusion/permeability enhancements through drug-coformer interactions. *Molecular pharmaceutics*, 12(5), 1615-1622.
- 48- Musini, V. M., Nazer, M., Bassett, K., & Wright, J. M. (2014). Blood pressure-lowering efficacy of monotherapy with thiazide diuretics for primary hypertension. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (5).
- 49- EMA/PDCO/358806/2013. Inventory of paediatric therapeutic needs. Nephro-urology. 2014 https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/inventory-paediatric-therapeutic-needs-nephro-urology_en.pdf
- 50- Wargo, K. A., & Banta, W. M. (2009). A comprehensive review of the loop diuretics: should furosemide be first line?. *Annals of Pharmacotherapy*, 43(11), 1836-1847.
- 51- Greenhill, J. V., & McLelland, M. A. (1990). 2 Photodecomposition of Drugs. *Progress in medicinal chemistry*, 27, 51-121.
- 52- Hammarlund, M. M., Paalzow, L. K., & Odind, B. (1984). Pharmacokinetics of furosemide in man after intravenous and oral administration. Application of moment analysis. *European journal of clinical pharmacology*, 26(2), 197-207.
- 53- Oh, S. W., & Han, S. Y. (2015). Loop diuretics in clinical practice. *Electrolytes & Blood Pressure*, 13(1), 17-21.
- 54- Coty, J. B., Martin, C., Telo, I., & Spitzer, D. (2020). Use of Spray Flash Evaporation (SFE) technology to improve dissolution of poorly soluble drugs: Case study on furosemide nanocrystals. *International Journal of Pharmaceutics*, 589, 119827.
- 55- World Health Organization. (2019). World Health Organization model list of essential medicines for children: 7th list 2019 (No. WHO/MVP/EMP/IAU/2019.07). World Health Organization.
- 56- Florey, K. (1981). Analytical profiles of drug substances and excipients. *Academic press*. pp. 207–243
- 57- Gennaro, A. R. (2003). *Remington farmacia*. Ed. Médica Panamericana.
- 58- Swarbrick, J. (2013). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology: Volume 6*. CRC press.
- 59- Rowe, R. C., Sheskey, P., & Quinn, M. (2009). *Handbook of pharmaceutical excipients*. Libros Digitales-Pharmaceutical Press.
- 60- Gad, S. C. (Ed.). (2008). *Pharmaceutical manufacturing handbook: production and processes*. John Wiley & Sons.
- 61- Mfoafo, K. A., Omidian, M., Bertol, C. D., Omid, Y., & Omidian, H. (2021). Neonatal and pediatric oral drug delivery: Hopes and hurdles. *International Journal of Pharmaceutics*, 597, 120296.
- 62- Batchelor, H. K., & Marriott, J. F. (2015). Formulations for children: problems and solutions. *British journal of clinical pharmacology*, 79(3), 405-418.
- 63- Niazi, S. K. (2019). *Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations: Liquid Products*. CRC Press.
- 64- Argentina, F. (2003). Ministerio de Salud. ANMAT, Buenos Aires.

-
- 65- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios - Industria - Inspección de Normas de Correcta Fabricación - Guía de NCF (2016) Normas Sobre Medicamentos de la Unión Europea, Volumen 4: Normas de Correcta Fabricación.
- 66- United States Pharmacopeia Convention (2015) The United States Pharmacopeia Convention. (USP) 38th ed. Rockville
- 67- Japanese Pharmacopoeia, 2021. The Japanese Pharmacopoeia, The Ministry of Health, Labour and Welfare, www.pmda.go.jp. Accessed 30 August 2021.
- 68- WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Meeting||World Health Organization (1992) Thirty-second Report p. 134. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/39645>
- 69- Taverniers, I., De Loose, M., & Van Bockstaele, E. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(8), 535-552.
- 70- Hadjicostas, E. (2004). *Quality assurance in analytical chemistry: Training and teaching* (pp. 29-52). B. W. Wenclawiak, M. Koch, & E. Hadjicostas (Eds.). Heidelberg: Springer.
- 71- ANMAT. Vademecum Nacional de Medicamentos, Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). República Argentina. 2013. <http://www.anmat.gov.ar/Medicamentos/basedat.asp>
- 72- Ardila, J. A., de Alvarenga Junior, B. R., Durango, L. C., Soares, F. L. F., Perlatti, B., de Oliveira Cardoso, J., ... & Carneiro, R. L. (2021). Design of experiments applied to stress testing of pharmaceutical products: A case study of Albendazole. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 165, 105939.
- 73- Armstrong, N. A. (2006). *Pharmaceutical experimental design and interpretation*. CRC Press.
- 74- Fisher, R. A. (1937). The design of experiments. *The design of experiments.*, (2nd Ed).
- 75- Plackett, R. L., & Burman, J. P. (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33(4), 305-325.
- 76- Box, G. E. P., & Wilson, K. B. (1951). On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 13(1), 1-45.
- 77- Neelima, M. S., Gandhi, B. M., Raju, V. B., Sumanth, K. S., Srinivas, K., Mounika, P., & Lakshmi, P. J. N. (2016). Development and validation of stability indicating reverse phase high-performance liquid chromatography method for simultaneous estimation of atenolol, hydrochlorothiazide and losartan in bulk and pharmaceutical dosage form. *Development*, 9(2), 118–24.
- 78- Daraghmeh, N., Al-Omari, M., Badwan, A. A., & Jaber, A. M. Y. (2001). Determination of sildenafil citrate and related substances in the commercial products and tablet dosage form using HPLC. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 25(3-4), 483-492.
- 79- Ali, T. A., Mohamed, G. G., Aglan, A. A., & Heikal, F. E. T. (2016). RP-HPLC stability-indicating method for estimation of irbesartan and hydrochlorothiazide in bulk and pharmaceutical dosage form. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 44(1), e1601-e1608.

- 80- EMA/CHMP/SWP/272921/2012. Reflection paper on the use of methyl-and propylparaben as excipients in human medicinal products for oral use (2015). <https://www.ema.europa.eu/en/use-methyl-propylparaben-excipients-human-medicinal-products-oral-use>
- 81- Cartwright, A. C. (2016). *The British pharmacopoeia, 1864 to 2014: medicines, international standards and the state*. Routledge.
- 82- Denyer, S., Hodges, N., & Gorman, S. (2004). Introduction to pharmaceutical microbiology. *Hugo and Russell's*, 3.
- 83- Pinto, J. T., Brachkova, M. I., Fernandes, A. I., & Pinto, J. F. (2016). Evaluation of the ability of powdered milk to produce minitables containing paracetamol for the paediatric population. *Chemical Engineering Research and Design*, 110, 171-182.
- 84- Ph. Eur. 6.0. (2007). European Pharmacopoeia 6.0.
- 85- Poirier, L., & Lacourcière, Y. (2012). The evolving role of β -adrenergic receptor blockers in managing hypertension. *Canadian Journal of Cardiology*, 28(3), 334-340.
- 86- Rousseau, M. F., Pouleur, H., Cocco, G., & Wolff, A. A. (2005). Comparative efficacy of ranolazine versus atenolol for chronic angina pectoris. *The American journal of cardiology*, 95(3), 311-316.
- 87- Havaldar, V. D., Kulkarni, A. S., Dias, R. J., Aloorkar, N. H., & Mali, K. K. (2009). Floating matrix tablets of atenolol: Formulation and in vitro evaluation. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP)*, 3(4).
- 88- Singh, B., Chakkal, S. K., & Ahuja, N. (2006). Formulation and optimization of controlled release mucoadhesive tablets of atenolol using response surface methodology. *Aaps Pharmscitech*, 7(1), E19-E28.
- 89- Srivastava, A. K., Wadhwa, S., Ridhurkar, D., & Mishra, B. (2005). Oral sustained delivery of atenolol from floating matrix tablets—formulation and in vitro evaluation. *Drug development and industrial pharmacy*, 31(4-5), 367-374.
- 90- Adhikari, S. N. R., Nayak, B. S., Nayak, A. K., & Mohanty, B. (2010). Formulation and evaluation of buccal patches for delivery of atenolol. *Aaps Pharmscitech*, 11(3), 1038-1044.
- 91- Jug, M., Bećirević-Laćan, M., & Bengez, S. (2009). Novel cyclodextrin-based film formulation intended for buccal delivery of atenolol. *Drug development and industrial pharmacy*, 35(7), 796-807.
- 92- Shirwaikar, A. A., & Ramesh, A. (2004). Fast disintegrating tablets of atenolol by dry granulation method. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 66(4), 422.
- 93- Ramírez, C. C., di Lauro, S. X. G., Garrido, V. R., Carbajosa, G. R., Fernández-Polo, A., & Bautista, S. C. (2016). Microbiological quality of pediatric oral liquid formulations. *Farmacia Hospitalaria*, 40(5), 427-435.
- 94- Zaid, A. N., Malkieh, N., Kharaof, M., Ghoush, A., & Al-Ramahi, R. (2012). Formulation and stability evaluation of extemporaneously prepared atenolol capsules from crushed atenolol tablets. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 16(4), 342-346.
- 95- Foppa, T., Murakami, F. S., & Silva, M. A. S. (2007). Development, validation and stability study of pediatric atenolol syrup. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62(7), 519-521.

-
- 96- Standing, J. F., & Tuleu, C. (2005). Paediatric formulations—getting to the heart of the problem. *International journal of pharmaceuticals*, 300(1-2), 56-66.
- 97- Fabiano, V., Mameli, C., & Zuccotti, G. V. (2011). Paediatric pharmacology: remember the excipients. *Pharmacological research*, 63(5), 362-365.
- 98- Walsh, J., Cram, A., Woertz, K., Breitzkreutz, J., Winzenburg, G., Turner, R., ... & European Formulation Initiative. (2014). Playing hide and seek with poorly tasting paediatric medicines: do not forget the excipients. *Advanced drug delivery reviews*, 73, 14-33.
- 99- Santoveña, A., Hernández-Paiz, Z., & Fariña, J. B. (2012). Design of a pediatric oral formulation with a low proportion of hydrochlorothiazide. *International journal of pharmaceuticals*, 423(2), 360-364.
- 100- Calvo, N. L., Maggio, R. M., & Kaufman, T. S. (2018). Characterization of pharmaceutically relevant materials at the solid state employing chemometrics methods. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 147, 538-564.
- 101- Banerjee, S. (2013). Hypertension in children. *Clinical Queries: Nephrology*, 2(2), 78-83.
- 102- Thalagahagoda, S., & Shenoy, M. (2013). Physiology and treatment of hypertension. *Paediatrics and Child Health*, 23(2), 53-58.
- 103- Hatem, A., Marton, S., Csóka, G., & Rácz, I. (1996). Preformulation studies of atenolol in oral liquid dosage form. I. Effect of pH and temperature. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 66(4), 177-180.
- 104- Plummer, D. T. (1994). *Introducción a la bioquímica práctica (Vol. 4)*. Edicions Universitat Barcelona.
- 105- Mousavi, S. J., Parvini, M., & Ghorbani, M. (2018). Experimental design data for the zinc ions adsorption based on mesoporous modified chitosan using central composite design method. *Carbohydrate polymers*, 188, 197-212.
- 106- Brown, D., Ford, J. L., Nunn, A. J., & Rowe, P. H. (2004). An assessment of dose-uniformity of samples delivered from paediatric oral droppers. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 29(6), 521-529.
- 107- (USP C. 61 “Microbiological Examination of Nonsterile Products: Microbial Enumeration Tests”. *United States Pharmacopeia*. 2015;32:71-5.)
- 108- Barst, R. J., Ivy, D. D., Gaitan, G., Szatmari, A., Rudzinski, A., Garcia, A. E., ... & Wessel, D. L. (2012). A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study of oral sildenafil citrate in treatment-naive children with pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 125(2), 324-334.
- 109- Provenza, N., Calpena, A. C., Mallandrich, M., Halbaut, L., & Clares, B. (2014). Design and physicochemical stability studies of paediatric oral formulations of sildenafil. *International Journal of Pharmaceuticals*, 460(1-2), 234-239.
- 110- Bellir, N., Gaid, N. E. Y. A., Deghboudj, C., & Chaffai, N. (2019). Liquid pediatric formulation of sildenafil citrate: Preparation and stability evaluation. *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements*, 11(4), e399.
- 111- EMA- Excipients (2009) https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-formulations-choice-paediatric-population_en.pdf

-
- 112- Elshafeey, A. H., Bendas, E. R., & Mohamed, O. H. (2009). Intranasal microemulsion of sildenafil citrate: in vitro evaluation and in vivo pharmacokinetic study in rabbits. *AAPS PharmSciTech*, 10(2), 361-367.
- 113- Kim, K., Seo, K., Lee, J., Kim, M. G., Ha, K. S., & Kim, C. (2016). Investigation and prediction of the salting-out effect of methane in various aqueous electrolyte solutions. *Journal of industrial and engineering chemistry*, 34, 117-121.
- 114- Kumar, P., Ganesh, V.R.L., Prasad, K., Hariharakrishnan, V.S., Dubey, P.K., Rao, B. (2011). Liquid-Chromatography Determination of Impurities in Sildenafil Citrate. *Asian Journal of Chemistry*. 23. 1219-1222.
- 115- Miranda, C., Pérez-Rodríguez, Z., Hernández-Armengol, R., Quiñones-García, Y., Betancourt-Purón, T., & Cabrera-Pérez, M. Á. (2018). Biowaiver or bioequivalence: ambiguity in sildenafil citrate BCS classification. *AAPS PharmSciTech*, 19(4), 1693-1698.
- 116- Saegeman, V. S., Ectors, N. L., Lismont, D., Verduyck, B., & Verhaegen, J. (2008). Short-and long-term bacterial inhibiting effect of high concentrations of glycerol used in the preservation of skin allografts. *Burns*, 34(2), 205-211.
- 117- Lopalco, A., Curci, A., Lopodota, A., Cutrignelli, A., Laquintana, V., Franco, M., & Denora, N. (2019). Pharmaceutical preformulation studies and paediatric oral formulations of sodium dichloroacetate. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 127, 339-350.
- 118- Soulele, K., & Macheras, P. (2015). Milk as a medium for pediatric formulations: Experimental findings and regulatory aspects. *International Journal of Pharmaceutics*, 492(1-2), 344-345.
- 119- Bakar, S. Y. B. A., Salim, M., Clulow, A. J., Hawley, A., & Boyd, B. J. (2019). Revisiting dispersible milk-drug tablets as a solid lipid formulation in the context of digestion. *International journal of pharmaceutics*, 554, 179-189.
- 120- Kytariolos, J., Charkoftaki, G., Smith, J. R., Voyiatzis, G., Chrissanthopoulos, A., Yannopoulos, S. N., ... & Macheras, P. (2013). Stability and physicochemical characterization of novel milk-based oral formulations. *International journal of pharmaceutics*, 444(1-2), 128-138.
- 121- Mennella, J. A., Spector, A. C., Reed, D. R., & Coldwell, S. E. (2013). The bad taste of medicines: overview of basic research on bitter taste. *Clinical therapeutics*, 35(8), 1225-1246.
- 122- Milne, C. P., & Bruss, J. B. (2008). The economics of pediatric formulation development for off-patent drugs. *Clinical therapeutics*, 30(11), 2133-2145.
- 123- U.S. Food and Drug Administration [WWW Document], n.d. URL www.fda.gov
- 124- delMoral-Sanchez, J. M., Gonzalez-Alvarez, I., Gonzalez-Alvarez, M., Navarro-Ruiz, A., & Bermejo, M. (2020). Availability of Authorizations from EMA and FDA for Age-Appropriate medicines contained in the who essential medicines list for children 2019. *Pharmaceutics*, 12(4), 316.
- 125- Taketomo, C. K., Hodding, J. H., & Kraus, D. M. (2010). Pediatric and neonatal dosage handbook (p. 2062). Hudson (OH): Lexi Comp.
- 126- Bresolin, T. M., & Silva, M. A. (2009). Evaluation of physicochemical characteristics of suspensions containing hydrochlorothiazide developed for pediatric use. *Latin American Journal of Pharmacy*, 28(5), 734-40.

-
- 127- Mendes, C., Costa, A. P., Oliveira, P. R., Tagliari, M. P., & Silva, M. A. S. (2013). Physicochemical and microbiological stability studies of extemporaneous antihypertensive pediatric suspensions for hospital use. *Pharmaceutical Development and Technology*, 18(4), 813-820.
- 128- Cirri, M., Mennini, N., Maestrelli, F., Mura, P., Ghelardini, C., & Mannelli, L. D. C. (2017). Development and in vivo evaluation of an innovative “Hydrochlorothiazide-in Cyclodextrins-in Solid Lipid Nanoparticles” formulation with sustained release and enhanced oral bioavailability for potential hypertension treatment in pediatrics. *International journal of pharmaceuticals*, 521(1-2), 73-83.
- 129- Binson, G., Beuzit, K., Migeot, V., Marco, L., Troussier, B., Venisse, N., & Dupuis, A. (2019). Preparation and physicochemical stability of liquid oral dosage forms free of potentially harmful excipient designed for pediatric patients. *Pharmaceutics*, 11(4), 190.
- 130- Trissel L (2005) In: Trissel's stability of compounded formulations. *American Pharmaceutical Association*, Washington.
- 131- Flórez, J., & Armijo, J. A. (1997). Fármacos diuréticos. *Farmacología humana*, 3, 815-829.
- 132- Harris, P. A., & Riegelman, S. (1969). Influence of the route of administration on the area under the plasma concentration-time curve. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58(1), 71-75.
- 133- Rehm, C. R., & Smith, J. B. (1960). The photometric determination of hydrochlorothiazide and its hydrolysis product. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 49(6), 386-389.
- 134- Sangoi, M. S., Wrasse-Sangoi, M., Oliveira, P. R., Rolim, C. M., & Steppe, M. (2011). Simultaneous determination of aliskiren and hydrochlorothiazide from their pharmaceutical preparations using a validated stability-indicating MEKC method. *Journal of separation science*, 34(15), 1859-1866.
- 135- Lusina, M., Cindrić, T., Tomaić, J., Peko, M., Pozaić, L., & Musulin, N. (2005). Stability study of losartan/hydrochlorothiazide tablets. *International journal of pharmaceuticals*, 291(1-2), 127-137.
- 136- Thomas, J., Stonebrook, E., & Kallash, M. (2020). Pediatric hypertension: Review of the definition, diagnosis, and initial management. *International Journal of Pediatrics and Adolescent Medicine*.
- 137- Sweetman, S. C., & Blake, P. S. (2011). Martindale. The complete drug reference, 33.
- 138- WHO. 2006. Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate release, solid oral dosage forms. Technical Report Series, No937, 40th Report, Annex 8 of WHO Expert committee on specifications for pharmaceutical preparations. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_937_eng.pdf. (accessed July 22, 2009)
- 139- Shin, S. C., & Kim, J. (2003). Physicochemical characterization of solid dispersion of furosemide with TPGS. *International journal of pharmaceuticals*, 251(1-2), 79-84.
- 140- Rowbotham, P. C., Stanford, J. B. & Sugden, J. K. (1976). Some aspects of the photochemical degradation of frusemide. *Pharm Acta Helv* 51,304–307.
- 141- Devarakonda, B., Otto, D. P., Judefeind, A., Hill, R. A., & de Villiers, M. M. (2007). Effect of pH on the solubility and release of furosemide from polyamidoamine

- (PAMAM) dendrimer complexes. *International journal of pharmaceutics*, 345(1-2), 142-153.
- 142- Granero, G. E., Longhi, M. R., Mora, M. J., Junginger, H. E., Midha, K. K., Shah, V. P., ... & Barends, D. M. (2010). Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: furosemide. *Journal of pharmaceutical sciences*, 99(6), 2544-2556.
- 143- Provenza, N., Calpena, A. C., Mallandrich, M., Sánchez, A., Egea, M. A., & Clares, B. (2014). Permeation studies through porcine small intestine of furosemide solutions for personalised paediatric administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 475(1-2), 208-213.
- 144- Lafeber, I., Tichem, J. M., Ouwerkerk, N., van Unen, A. D., van Uiter, J. J. D., Bijleveld-Olierook, H. C. M., ... & Schimmel, K. J. M. (2021). 3D printed furosemide and sildenafil tablets: Innovative production and quality control. *International Journal of Pharmaceutics*, 603, 120694.
- 145- Verbeeck, R. K., Kanfer, I., Löbenberg, R., Abrahamsson, B., Cristofolletti, R., Groot, D. W., ... & Dressman, J. B. (2017). Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: Enalapril. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106(8), 1933-1943.
- 146- Ip, D. P., & Brenner, G. S. (1987). Enalapril maleate. In *Analytical profiles of drug substances* (Vol. 16, pp. 207-243). Academic Press.
- 147- Al-Omari, M. M., Abdelah, M. K., Badwan, A. A., & Jaber, A. M. Y. (2001). Effect of the drug-matrix on the stability of enalapril maleate in tablet formulations. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 25(5-6), 893-902.
- 148- Bout, M. R., & Vromans, H. (2021). Study on the Mechanism Responsible for the Incompatibility of Enalapril Maleate with Sodium Starch Glycolate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 110(5), 2074-2082.
- 149- Nahata, M. C., Morosco, R. S., & Hipple, T. F. (1998). Stability of enalapril maleate in three extemporaneously prepared oral liquids. *American journal of health-system pharmacy*, 55(11), 1155-1157.
- 150- Guideline on pharmaceutical development of medicines for paediatric use. EMA/CHMP/QWP/805880/2012 Rev. 2. Available at https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-pharmaceutical-development-medicines-paediatric-use_en.pdf.
- 151- Salunke, S., Brandys, B., Giacoia, G., & Tuleu, C. (2013). The STEP (safety and toxicity of excipients for paediatrics) database: part 2—the pilot version. *International journal of pharmaceutics*, 457(1), 310-322.
- 152- Casas, M., Álvarez, J., & Lucero, M. J. (2015). Physicochemical stability of captopril and enalapril extemporaneous formulations for pediatric patients. *Pharmaceutical development and technology*, 20(3), 271-278.
- 153- Moffett, B. S., DiSanto, A. R., Espinosa, O., Hou, J., & Colabuono, P. (2014). Bioequivalence of enalapril oral solution for treatment of pediatric hypertension and enalapril tablets. *Clinical Pharmacology in Drug Development*, 3(6), 493-498.
- 154- Alarie, H., Roullin, V. G., & Leclair, G. (2019). Development of a safe and versatile suspension vehicle for pediatric use: Formulation development. *International Journal of Pharmaceutics*, 569, 118552.

ANEXO

Contenido del Anexo

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Índice Tablas del Anexo | 2 |
| Índice Figuras del Anexo | 4 |
| A.1 Introducción | 5 |
| A.2 Validación analítica | 5 |
| A.3 Atributos Analíticos | 6 |
| A.3.1 Exactitud | 7 |
| A.3.2 Precisión | 9 |
| A.3.3 Especificidad/selectividad | 10 |
| A.3.4 Límite de detección | 10 |
| A.3.5 Límite de cuantificación | 11 |
| A.3.6 Linealidad e intervalo | 13 |
| A.3.7 Robustez | 18 |
| A.3.8 Rugosidad, aspereza o resistencia | 19 |
| A.3.9 Aptitud del sistema | 20 |
| A.3.10 Resultados de la validación de los métodos cromatográficos empleados en la cuantificación de cada uno de los ingredientes activos empleados | 20 |
| Soluciones madre, diluciones y soluciones de trabajo | 20 |
| A.3.10.1 Gotas de Atenolol | 21 |
| A.3.10.2 Gotas de Citrato de Sildenafil | 29 |
| A.3.10.3 Gotas de Hidroclorotiazida | 38 |
| A.3.10.4 Gotas de Furosemida | 47 |
| A.3.10.5 Gotas de Maleato de Enalapril | 62 |
| Referencias bibliográficas del anexo | 76 |

Índice Tablas del Anexo

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla A.1 Parámetros de calidad a evaluar en la validación de distintos ensayos analíticos, según su finalidad. | 7 |
| Tabla A.2 Atenolol. Resultados de la linealidad del método CLAE | 22 |
| Tabla A.3 Atenolol. Resumen de los datos de validación del método cromatográfico. | 26 |
| Tabla A.4 Atenolol. Resultados de la determinación de la exactitud del método | 27 |
| Tabla A.5 Atenolol. Análisis estadístico de la exactitud del método | 27 |
| Tabla A.6 Atenolol. Resultados de la aptitud del sistema | 28 |
| Tabla A.7 Citrato de sildenafil. Resultados de la linealidad del método..... | 30 |
| Tabla A.8 Citrato de sildenafil. Resultados de la linealidad del método..... | 33 |
| Tabla A.9 Citrato de sildenafil. Resultados de la determinación de la exactitud del método con matriz 1..... | 35 |
| Tabla A.10 Citrato de sildenafil. Resultados de la determinación de la exactitud del método con matriz 2..... | 35 |
| Tabla A.11 Citrato de sildenafil. Análisis estadístico de la exactitud del método. Matriz 1 | 36 |
| Tabla A.12 Citrato de sildenafil. Análisis estadístico de la exactitud del método. Matriz 2 | 36 |
| Tabla A.13 Citrato de sildenafil. Resultados de la exactitud, precisión y especificidad del método | 37 |
| Tabla A.14 Citrato de sildenafil. Resultados de la aptitud del sistema..... | 38 |
| Tabla A.15 Hidroclorotiazida. Resultados de la linealidad del método..... | 40 |
| Tabla A.16 Hidroclorotiazida Resumen de los datos de validación del método cromatográfico | 44 |
| Tabla A.17 Hidroclorotiazida. Resultados de la determinación de la exactitud del método... | 45 |
| Tabla A.18 Hidroclorotiazida. Análisis estadístico de la exactitud del método | 46 |
| Tabla A.19 Hidroclorotiazida. Resultados de la aptitud del sistema..... | 47 |
| Tabla A.20 Furosemida. Resultados de la linealidad del método | 49 |
| Tabla A.21 Furosemida. Resumen de los datos de validación del método cromatográfico .. | 52 |
| Tabla A.22 Furosemida. Resultados de la determinación de la exactitud del método con matriz 1 | 54 |
| Tabla A.23 Furosemida. Resultados de la determinación de la exactitud del método con matriz 2 | 54 |
| Tabla A.24 Furosemida. Análisis estadísticos de la exactitud del método empleando la Matriz 1 | 54 |
| Tabla A. 25 Furosemida. Análisis estadísticos de la exactitud del método empleando la Matriz 2 | 55 |
| Tabla A. 26 Furosemida. Resultados de la aptitud del sistema | 56 |
| Tabla A. 27 Furosemida. Resultados de la linealidad del método UV | 58 |
| Tabla A.28 Furosemida. Resumen resultados de la validación del método UV | 62 |
| Tabla A.29 Maleato de enalapril. Resultados de la linealidad del método 1 | 64 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla A.30 Maleato de enalapril. Resultados de la linealidad del método 2 | 67 |
| Tabla A.31 Maleato de enalapril. Resumen de los datos de validación de los métodos 1 y 2 | 71 |
| Tabla A.32 Maleato de enalapril. Resultados de la determinación de exactitud del método 1 | 72 |
| Tabla A.33 Maleato de enalapril. Resultados de los parámetros estadísticos para determinar la exactitud del método 1..... | 73 |
| Tabla A.34 Maleato de enalapril. Resultados de la determinación de exactitud del método 2 | 73 |
| Tabla A.35 Maleato de enalapril. Resultados de los parámetros estadísticos para determinar la exactitud del método 2..... | 74 |
| Tabla A.36 Maleato de enalapril. Resultados de la aptitud del sistema de los métodos 1 y 2 | 74 |

Índice Figuras del Anexo

| | |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| Figura A.1 Curva de calibración de Atenolol por CLAE | 23 |
| Figura A.2 Curva de calibración de Sildenafil por CLAE..... | 31 |
| Figura A.3 Curva de calibración de Hidroclorotiazida por CLAE..... | 41 |
| Figura A.4 Curva de calibración de Furosemida por CLAE | 50 |
| Figura A. 5 Curva de calibración de Furosemida por UV..... | 59 |
| Figura A. 6 Curva de calibración de Enalapril por CLAE | 65 |
| Figura A.7 Curva de calibración de Enalapril por CLAE | 68 |

A.1 Introducción

La Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) es una de las técnicas más empleadas en la determinación de la riqueza de un IFA como así también en la determinación de impurezas relacionadas. La propia industria farmacéutica comenzó a proponer e imponer el uso de esta metodología a las autoridades regulatorias desde principios de la década de 1970, a partir de lo cual la técnica tuvo una rápida difusión, que continúa hasta el presente. Al ser una técnica separativa, es el método analítico elegido con más frecuencia en el análisis farmacéutico para determinar el contenido de un IFA en una matriz compleja.

A.2 Validación analítica

Las actividades y métodos propios de la industria farmacéutica que pueden tener impacto sobre la seguridad y la eficacia de los productos que ésta elabora o utiliza, requieren de una demostración previa de su aptitud para el uso propuesto. De ese modo, la calidad de los productos no se verá afectada por la calidad de los métodos empleados para producirlos y controlarlos. La demostración de aptitud para el uso pretendido es lo que en el ámbito de la industria farmacéutica se conoce como “validación”¹. La validación de un método analítico es el proceso usado para confirmar que el procedimiento analítico empleado en un ensayo específico es apto para el uso pretendido. Los resultados de la validación del método pueden usarse para juzgar la calidad, confiabilidad y consistencia del resultado analítico, por lo que la validación debe ser parte integral de cualquier buena práctica analítica. Indicaciones exhaustivas y estudios acerca de la validación analítica comenzaron a ser publicadas a mediados de la década de 1990 (2-4)^{2,3,4}. Según la Farmacopea Argentina 7^o Edición y otros textos de alcance similar relacionados con la calidad de los medicamentos, la validación de un método analítico *es el proceso por el cual se establece, por medio de estudios de laboratorio debidamente documentados, que dicho método es apropiado para el uso propuesto.*

Las Buenas Prácticas de Fabricación y Control requieren que los métodos analíticos empleados para evaluar las especificaciones establecidas sean apropiados.

La validación de métodos analíticos ha recibido considerable atención no sólo en la literatura sino también en los comités de la industria y agencias regulatorias⁵ como FDA, ISO, EPA, ICH, AOAC y otros. La FDA también ha publicado una guía para la validación de métodos bioanalíticos⁶.

No existe una guía oficial que indique el orden en que deben realizarse los experimentos de validación y la secuencia óptima puede depender del método en sí. Sin embargo, antes de la validación de un método, deben definirse los parámetros a validar y sus correspondientes intervalos de aceptación.

En el caso de métodos cromatográficos instrumentales, y bajo el concepto de que el instrumento es un sistema, una vez validado el método y puesto en uso de manera rutinaria se emplearán las pruebas de aptitud del sistema como verificación rápida de su idoneidad de uso. Los criterios de aceptación de estas pruebas deben ser definidos de manera tal que indiquen cuándo el método o el sistema están bajo control estadístico, y por lo tanto son aptos para su uso proyectado⁷.

A.3 Atributos 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 pretendido. Los diferentes atributos por evaluar dependen de la naturaleza y la finalidad del método analítico. En la Tabla A.1 se muestran de forma esquemática, los parámetros de calidad analítica que requieren de validación y cuáles de ellos deben ser evaluados, según lo estipulado por la FA 7ª Edición⁸, para los diferentes tipos de ensayos analíticos de utilidad en el control de calidad farmacéutico.

Tabla A.1 Parámetros de calidad a evaluar en la validación de distintos ensayos analíticos, según su finalidad.

| Característica | Valoración | Determinación de Impurezas | | Desempeño | Identificación |
|--------------------------|------------|----------------------------|---------------|-----------|----------------|
| | | Cuantitativo | Ensayo límite | | |
| Exactitud | + | + | * | * | - |
| Precisión | | | | | |
| Repetibilidad | + | + | - | + | - |
| Precisión Intermedia | + | + | - | + | - |
| Especificidad | + | + | + | * | * |
| Límite de detección | - | - | + | * | - |
| Límite de cuantificación | - | + | - | * | - |
| Linealidad | + | + | - | * | - |
| Intervalo | + | + | * | * | - |

(+) Requerido siempre, (-) no requerido y (*) requerido según el caso.

A.3.1 Exactitud

La exactitud de un método analítico es la proximidad entre el resultado obtenido y el valor real. Debe establecerse en todo el intervalo especificado para el método analítico, generalmente mediante pruebas de recuperación. Esta propiedad puede informarse como el porcentaje de recuperación del principio activo o como la diferencia entre el valor promedio y el valor verdadero aceptado (sesgo)⁹.

Para la valoración de ingredientes farmacéuticos activos, puede determinarse por la aplicación del método analítico a una muestra de pureza conocida (como, por ejemplo, una sustancia de referencia) o por comparación de los resultados del método analítico propuesto con los de otro método cuya exactitud haya sido establecida. La exactitud también puede deducirse luego de establecerse la precisión, linealidad y especificidad del método.

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 (método de adición de estándar)

De no disponer de todos los excipientes presentes en el producto comercial para reconstruir la matriz, se puede emplear una mezcla de composición conocida, como la misma especialidad medicinal, y evaluar la recuperación de cantidades conocidas de sustancias de referencia agregadas a la misma; esta estrategia se conoce como el “método de adición de estándar”.

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.

Evaluación estadística

Determinar los siguientes parámetros estadísticos:

- Cálculo del porcentaje de cada concentración
- Cálculo de la desviación estándar (S)
- Cálculo de la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación

(CV)

- También se calcula el test “t” de Student

Para confirmar que el valor medio no difiere significativamente del aceptado como referencia, se debe determinar el valor de “t” experimental con la siguiente fórmula:

$$t_{exp} = \frac{n(100 - R)}{DER}$$

Se selecciona el ttabla con las siguientes condiciones: n-1 grados de libertad y probabilidad de cometer error (p) de 0,05, es decir un grado de confianza del 95%.

Criterio de aceptación:

Si t_{exp} es menor que t_{tabla} , no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100% y la exactitud es apropiada.

A.3.2 Precisión

La precisión de un método analítico está dada por el grado de concordancia o dispersión entre los resultados de ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a varias alícuotas de una muestra homogénea⁸. Generalmente se expresa como la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) (Ecuación A-2) de una serie de mediciones. Puede ser considerada en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad¹⁰.

$$DE = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (\text{Ecuación A-1})$$

$$DER = \frac{100 \times DE}{\bar{x}} \quad (\text{Ecuación A-2})$$

La repetibilidad de un método expresa su precisión bajo las mismas condiciones operativas en un intervalo de tiempo corto. Puede ser evaluada usando:

- Un mínimo de 9 determinaciones que cubran el rango específico del procedimiento, efectuando 3 replicados de muestras independientes a 3 concentraciones diferentes.
- Un mínimo de 6 determinaciones al nivel del 100%.

La precisión intermedia debe establecerse identificando los fenómenos aleatorios que puedan afectar la precisión del procedimiento analítico. Variaciones típicas incluyen el día, analista, equipamiento, etc. Actualmente no se considera evaluar estos efectos en forma individual, sugiriéndose para tal fin el uso de diseños experimentales.

La reproducibilidad habitualmente se evalúa por medio de ensayos inter-laboratorios, siendo particularmente indicada su verificación en el caso de la normalización de un procedimiento analítico, por ejemplo, para su inclusión en compendios.

En determinaciones efectuadas por un solo operador, la verificación de repetibilidad suele denominarse “precisión intra-día”, mientras que la precisión intermedia suele reemplazarse por el término “precisión inter-día”.

A.3.3 Especificidad/selectividad

La selectividad analítica podría interpretarse como “la medida en que el método puede utilizarse para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar¹¹. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) recomienda el término selectividad, mientras que otras áreas, por ejemplo, en el campo farmacéutico, utiliza el término especificidad, sin embargo, existe un acuerdo sobre la interpretación. Por otra parte, un método analítico se considera selectivo cuando proporciona respuestas para una serie de entidades químicas que pueden distinguirse unas de otras.

En el caso de una valoración, se debe demostrar que el método no se ve afectado por la presencia de impurezas o excipientes. Para métodos cromatográficos instrumentales, deben desarrollarse cromatogramas para demostrar la especificidad. Los ensayos de pureza de pico (como, por ejemplo, empleando arreglo de diodos o espectrometría de masa) pueden ser útiles para demostrar que el pico cromatográfico del analito no incluye a otro componente.

A.3.4. 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.

Para métodos no instrumentales, el límite de detección (LOD) se determina generalmente 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. Este método también puede utilizarse en métodos instrumentales.

En 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 aceptable para la estimación.

Existen varios procedimientos para determinar el valor de LOD, siendo uno de los más comunes aquél que emplea la desviación estándar del término libre (DE_a) de una curva de calibración elaborada con soluciones de referencia cuyas concentraciones estén en las vecindades del LOD y la pendiente (b) de dicha curva¹², usando la Ecuación A-3.

$$\text{LOD} = 3,3 (DE_a/b) \quad (\text{Ecuación A-3})$$

A.3.5 Límite de cuantificación

Es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud en una muestra, bajo las condiciones experimentales establecidas. Esta propiedad debe ser determinada cuando las concentraciones del analito mayoritario en la muestra son bajas y particularmente en la cuantificación de impurezas y/o productos de degradación¹³.

Para métodos instrumentales como CLAE, este límite puede ser determinado sobre la base de la relación señal-ruido. Para ello, se comparan las señales provenientes de muestras con analito a concentraciones bajas y conocidas, y las señales de una muestra blanco, estableciéndose la concentración mínima del analito que puede ser cuantificada con seguridad. En general, una relación señal-ruido de 10:1 se considera aceptable para estimar el límite de cuantificación.

Otra alternativa es emplear la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la curva de calibración. En este caso, el límite de cuantificación (LOQ) puede expresarse según la Ecuación A-4.

$$\text{LOQ} = 10 (\text{DE}/b) \quad (\text{Ecuación A-4})$$

donde DE es la desviación estándar de la respuesta y b es la pendiente de la curva de calibración.

La pendiente puede estimarse a partir de la curva de calibración del analito, mientras que la estimación de DE puede llevarse a cabo ya sea analizando las respuestas de un número apropiado de mediciones de una muestra blanco y calculando el desvío estándar de esas respuestas (método basado en la desviación estándar del blanco) o realizando una curva de calibración con concentraciones de analito cercanas al límite de cuantificación (método basado en la curva de calibración), donde la desviación estándar de la regresión lineal o la desviación estándar de la ordenada al origen de la regresión lineal pueden usarse como desvío estándar.

El valor de LOQ puede calcularse de diferentes modos, siendo los más usados los que emplean la pendiente de la curva de calibración. El procedimiento que resulta más apropiado consiste en obtener el valor de la respuesta Y entre los límites de la curva de calibración $Y = a + bC$, el que se usa por una parte para calcular los valores teóricos de $C = (Y - a)/b$, y por otra para obtener la desviación estándar de la curva (DE_c), cuyo cálculo se detalla en la Ecuación I.2.12, y la desviación estándar relativa $\text{DER} = 100 \times \text{DE}_c/C$ de los resultados del análisis.

Luego, se traza un gráfico de DER calculado versus C para determinar la concentración de analito C_p correspondiente al valor permisible de DER para el procedimiento analítico en consideración. Este valor varía entre 10 y 20 %, en el caso de impurezas, y se fija en 2% para productos principales.

Los valores de las desviaciones estándar de los resultados se calculan a partir de la Ecuación A-5.

$$DE_c = \frac{DE_0}{b} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \left(\frac{DE_b}{b}\right)^2 \left(\frac{Y_s - \bar{Y}}{DE_0}\right)^2} \quad (\text{Ecuación A-5}).$$

Donde DE_0 es la desviación estándar de la curva de calibración, N es el número de puntos experimentales, Y_s es la respuesta (área bajo de la curva, altura de pico, etc.), n es el número de determinaciones independientes, b es la pendiente de la curva de calibración y DE_b es su correspondiente desvío e \bar{Y} es el promedio de todas las respuestas usadas para construir el gráfico de calibración.

A.3.6 Linealidad e intervalo

La linealidad se estudia y demuestra para un intervalo de concentraciones, que es el rango de trabajo, con tres replicados y a un mínimo de cinco niveles de concentración¹⁴.

La linealidad de la respuesta instrumental se puede determinar o inferir a través del coeficiente de regresión de la curva de calibración del analito, construida al representar gráficamente el área bajo la curva del analito (ABC) en el cromatograma en función de la cantidad de estándar agregado, estando esta cantidad dentro del intervalo de trabajo. Estadísticamente, dicha curva de calibración deberá contener el valor (0,0) y presentar un coeficiente de correlación ($r > 0,99$ (ó $p < 0,05$))¹⁵.

Se define como intervalo al rango de concentraciones dentro del cual puede ser determinado el analito con precisión, exactitud y linealidad. Los rangos de trabajo que se sugieren deben ser validados y dependen de la aplicación del método a validar. Para valoraciones de ingrediente farmacéutico activo o producto terminado, entre 80% y 120% de la respuesta objetivo (nivel del 100%). Para uniformidad de contenido, entre 70% y 130% pudiendo ampliarse según la naturaleza de la forma de dosificación. Para la prueba de disolución, $\pm 20\%$ de los extremos del intervalo especificado, y para la determinación de una impureza, desde el nivel de referencia de la impureza, hasta el 120% de la especificación.

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). Deben informarse el coeficiente de correlación, la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión (Ecuación A-6)

También es relevante asegurar la distribución al azar de los residuos.

Evaluación estadística

a- Cálculo de la recta de regresión

$$y = a + b \times x \quad (\text{Ecuación A-6})$$

Donde:

x: Concentración o cantidad de analito (variable independiente)

y: Respuesta (variable dependiente)

b: Valor de la pendiente (indica la sensibilidad del método)

a: Ordenada al origen (término independiente o intercepto). Para demostrar que la recta pasa por el origen y que cualquier desviación se debe a un error aleatorio.

Fórmula para hallar "a"

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$

Fórmula para hallar "b"

$$b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

n= Número de muestras

b- Interpretación estadística de la regresión lineal

Realizar la interpretación estadística de la regresión lineal, a través del cálculo de:

- Cálculo del coeficiente de correlación (r)
- Límite de confianza del intercepto a.
- Límite de confianza de la pendiente b.
- Coeficiente de variación de los factores respuesta.

Cálculo del coeficiente de correlación (r) (Mínimo 0,99)

Se determina para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto: $y = bx + a$, y refleja el grado de relación entre las concentraciones (x) y su respuesta (y)

Fórmula para hallar "r"

$$r = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}) (\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n})}$$

El valor de:

r= 1 indica una recta perfectamente lineal

r= -1 indica una recta perfectamente lineal negativa

r= 0 indica que no hay correlación entre x e y.

Coefficiente de determinación "r²" (Mínimo 0,98)

Indica el grado de ajuste de la ecuación. Sin embargo, el mejor indicativo del modelo lineal no es "r", sino un test estadístico.

Test estadístico para el coeficiente de correlación "r"

En este caso se calcula el valor de $t_{\text{regresión}}$ (test de regresión) con n-2 grados de libertad y un intervalo de confianza de 95% ($\alpha = 0,05$) y se compara con el valor de t_{tabulado} (test tabulado) para el nivel de confianza requerido.

α = probabilidad de cometer error (p)

$1-\alpha$ = grado de confianza

Fórmula para hallar $t_{\text{regresión}}$

$$t_{\text{regresión}} = \frac{|r| \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

Hipótesis nula (H0): es la no correlación entre x e y ($r=0$)

Hipótesis alternativa (H1): "r" NO debe ser significativamente diferente de uno ($r \neq 0$)

Criterio de aceptación: Si el valor observado de $t_{\text{regresión}}$ es mayor a t_{tabla} , la hipótesis nula se rechaza, existiendo una correlación lineal significativa, por lo tanto, r es cercano a 1.

Límite de confianza del intercepto "a"

Este valor se calcula en función de su varianza (S_a^2)

Fórmula para hallar la Varianza del intercepto "a":

$$S_a^2 = S_b^2 \frac{\sum x^2}{n}$$

Fórmula para hallar la desviación estándar del intercepto "a"

$$S_a = \sqrt{S_a^2}$$

Fórmula para hallar los límites de confianza del intercepto

$$a = a \pm t_{\text{tabla}} S_a$$

Determinación del test estadístico del intercepto "a"

Fórmula para hallar el valor de $t_{\text{experimental}}$

$$t_{\text{exp}} = \frac{|a|}{S_a}$$

Criterio de aceptación

Si $t_{\text{experimental}}$ es menor que t_{tabla} , según las condiciones mencionadas, existe una correlación lineal significativa.

Límite de confianza de la pendiente “b”

Este valor se calcula en función de su Varianza (S_b^2)

Hipótesis nula (H_0): $b=0$

Criterio de aceptación: “b” debe ser significativamente diferente de cero

Fórmula para hallar la varianza de la pendiente “b”: (S_b^2)

$$S_b^2 = \frac{S_{xy}^2}{(\sum x)^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}}$$

Fórmula para hallar la varianza del error experimental total (determinación de la varianza de x sobre y)

$$S_{xy}^2 = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n - 2}$$

Fórmula para hallar la desviación estándar de la pendiente “b” (S_b)

$$S_b = \sqrt{S_b^2}$$

$$S_b \text{ relativa (\%)} = \frac{s_b \times 100}{b}$$

Fórmula para hallar los límites de confianza de la pendiente

$$b = b \pm t_{\text{tabla}} \times S_b$$

t_{tabla} = es el valor en la tabla de la distribución de student con las siguientes condiciones:

- n-2 grados de libertad
- probabilidad de cometer error (p) de 0,05, es decir, un grado de confianza del 95%.

Determinación del test estadístico de la pendiente “b”

Fórmula para hallar el valor de $t_{\text{experimental}}$

$$t_{\text{exp}} = \frac{|b|}{S_b}$$

Criterio de aceptación:

Si $t_{\text{experimental}}$ es mayor que t_{tabla} , existe una correlación lineal significativa, entonces la pendiente “b” es significativamente diferente de cero y se rechaza la hipótesis nula

Cálculo del coeficiente de variación (CV) o desvío estándar relativo (DER) de los factores de respuesta (f):

Criterio de aceptación:

$$CV < 5\%$$

Fórmula para hallar “f”

$$f = y/x$$

A.3.7 Robustez

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.

Inicialmente, las pruebas de robustez se realizaban para determinar la importancia de ciertos factores que podían afectar los resultados del método cuando éste era aplicado en diferentes laboratorios. Por lo tanto, estas pruebas eran realizadas al final de la validación del método, justo antes de los estudios inter-laboratorios¹⁶.

Sin embargo, si el método demostraba falta de robustez, debía ser adaptado o re-desarrollado y re-validado, con el consiguiente gasto extra de tiempo y dinero.

Actualmente, es preferible determinar la robustez de un método en etapas tempranas de su desarrollo, durante la optimización o al inicio de su validación¹⁷. Este enfoque tiene mucho sentido práctico, ya que una vez identificados los parámetros que afectan al método, éstos pueden ser manipulados convenientemente a los fines de lograr mejor selectividad o una más afinada optimización.

Esta información permite establecer los límites de aptitud del sistema¹⁸. Las guías ICH afirman que una de las finalidades de evaluar la robustez es establecer una serie de parámetros (por ejemplo, la resolución) de aptitud del sistema que permiten garantizar la validez del procedimiento analítico durante su uso. Estas guías no requieren la realización de pruebas de robustez como parte de la validación analítica, a diferencia de la FDA que demanda su realización para el registro de medicamentos en los Estados Unidos¹⁹.

A.3.8 Rugosidad, aspereza o resistencia

El término rugosidad fue introducido y popularizado por Youden y Steiner²⁰, actualmente la USP distingue robustez de rugosidad y tal como se encuentra definida se asemeja fuertemente a la reproducibilidad, mientras que ICH las considera sinónimos. La USP define esta propiedad como el grado de reproducibilidad de los resultados de la prueba obtenidos por el análisis de una misma muestra bajo una variedad de condiciones normales de la prueba, en diferentes laboratorios y con diferentes analistas, instrumentos, lotes de reactivos, temperaturas, días, tiempos de duración del ensayo, etc²¹. Esta propiedad puede ser convenientemente evaluada empleando estrategias de diseño experimental²².

A.3.9 Aptitud del sistema

La condición de aptitud del sistema puede determinarse mediante inyecciones replicadas de soluciones de trabajo, midiendo el área bajo las curvas de los analitos, la resolución y parámetros de asimetría de pico para cada analito, entre otros.

El valor de DER de las respuestas instrumentales también es uno de los indicadores de la aptitud del sistema. Usualmente, para usos farmacéuticos la DER del área de los picos debe ser menor de 2,0%, el factor de coleo, menor de 2,0 y la resolución entre picos adyacentes debería superar el valor de 2,0.

A.3.10 Resultados de la validación de los métodos cromatográficos empleados en la cuantificación de cada uno de los ingredientes activos empleados

Soluciones madre, diluciones y soluciones de trabajo

En esta sección se describe la preparación de las soluciones madre de los ingredientes activos y los diferentes grupos de soluciones de trabajo para fines de validación, cuyas concentraciones se indican en los apartados correspondientes.

Además, se describe la preparación de las soluciones de ensayo a partir de las formulaciones desarrolladas, para ser analizadas por el método validado para la determinación del contenido de sus ingredientes farmacéuticos activos.

Todas las soluciones se conservaron a 4°C y se llevaron a temperatura ambiente en el momento de su uso. En todo momento, las soluciones fueron protegidas de la luz a lo largo de los experimentos.

Soluciones de las muestras

Para cada una de las formulaciones líquidas desarrolladas, se realizaron diluciones de acuerdo con la concentración final del ingrediente activo, empleando fase móvil y agitación mecánica por 10 minutos. Se determinó la densidad de la formulación y las diluciones finales fueron realizadas por peso.

A.3.10.1 Gotas de Atenolol

Soluciones para CLAE

Soluciones madre

La solución madre de ATN fue preparada en un matraz aforado de 50,00 mL disolviendo una cantidad exactamente pesada (66 mg) de ATN en metanol, siendo la concentración final 1,32 mg mL⁻¹.

Soluciones de trabajo

Las soluciones de trabajo fueron preparadas inmediatamente antes de su uso, en matraces aforados de 10,00 mL, mediante diluciones apropiadas de la solución madre en fase móvil. Un total de seis soluciones fueron preparadas con las siguientes concentraciones: 0,066; 0,0792; 0,0924; 0,1056; 0,1188 y 0,132 mg mL⁻¹.

Condiciones cromatográficas.

Determinación de Atenolol

El contenido de atenolol fue determinado empleando una columna SiliaChrom C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm). La fase móvil consistió en una mezcla de buffer citrato (10 mM, pH 4): metanol (70:30) con un flujo de 0,5 mL min⁻¹ y un volumen de inyección de 20 µL. La longitud de onda de detección fue 226 nm²³.

Validación del método cromatográfico.

Linealidad y rango (intervalo de concentraciones de trabajo)

La linealidad del método propuesto fue evaluada analizando soluciones de trabajo a seis concentraciones. Teniendo en cuenta el propósito de la cuantificación, el rango lineal fue 0,066-0,132 mg mL⁻¹. Este rango equivale al intervalo del 70 al 130% de la respuesta objetivo para el contenido promedio de los analitos en las formulaciones desarrolladas.

La Tabla A.2 resume los datos obtenidos de las áreas bajo la curva para cada de las concentraciones evaluadas, por triplicado. Además, se presentan los cálculos de $x \cdot y$, x^2 , y^2 y $f(x/y)$, necesarios para realizar la evaluación estadística de la linealidad.

a- Cálculo de la recta de regresión

Tabla A.2 Atenolol. Resultados de la linealidad del método CLAE

| | ATN (mg mL ⁻¹) | Área (mUA) | $x \cdot y$ | x^2 | y^2 | $f(y/x)$ |
|---------------------------|-------------------------------|---------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| | 0,066 | 6591606 | 435045,99 | 0,004356 | 4,34493E+13 | 99872818,18 |
| | 0,066 | 6497462 | 428832,49 | 0,004356 | 4,2217E+13 | 98446393,94 |
| | 0,066 | 6501682 | 429111,01 | 0,004356 | 4,22719E+13 | 98510333,33 |
| | 0,0792 | 7500015 | 594001,18 | 0,00627264 | 5,62502E+13 | 94697159,09 |
| | 0,0792 | 7580505 | 600375,99 | 0,00627264 | 5,74641E+13 | 95713446,97 |
| | 0,0792 | 7680800 | 608319,36 | 0,00627264 | 5,89947E+13 | 96979797,98 |
| | 0,0924 | 8978241 | 829589,46 | 0,00853776 | 8,06088E+13 | 97167110,39 |
| | 0,0924 | 8965247 | 828388,82 | 0,00853776 | 8,03757E+13 | 97026482,68 |
| | 0,0924 | 8947459 | 826745,21 | 0,00853776 | 8,0057E+13 | 96833971,86 |
| | 0,1056 | 11041525 | 1165985,04 | 0,01115136 | 1,21915E+14 | 104559895,8 |
| | 0,1056 | 11043520 | 1166195,71 | 0,01115136 | 1,21959E+14 | 104578787,9 |
| | 0,1056 | 11054947 | 1167402,40 | 0,01115136 | 1,22212E+14 | 104686998,1 |
| | 0,1188 | 12213028 | 1450907,72 | 0,01411344 | 1,49158E+14 | 102803266 |
| | 0,1188 | 12224526 | 1452273,68 | 0,01411344 | 1,49439E+14 | 102900050,5 |
| | 0,1188 | 12218778 | 1451590,82 | 0,01411344 | 1,49299E+14 | 102851666,7 |
| | 0,132 | 13101723 | 1729427,43 | 0,017424 | 1,71655E+14 | 99255477,27 |
| | 0,132 | 13119417 | 1731763,04 | 0,017424 | 1,72119E+14 | 99389522,73 |
| | 0,132 | 13062948 | 1724309,13 | 0,017424 | 1,70641E+14 | 98961727,27 |
| Sumatoria | 1,782 | 178323429 | 18620264,56 | 0,1855656 | 1,87009E+15 | 1795234907 |
| Promedio | | | | | | 99735272,59 |
| Desviación estándar | | | | | | 3217837,30 |
| Coefficiente de variación | | | | | | 3,22 |

De los datos obtenidos de la Tabla A.2, se obtienen los siguientes valores:

$$a = -550340,762$$

$$b = 105628262$$

$$\text{Ecuación de la recta: } y = 105628262x - 550340,762$$

La Figura A.1 Representa la curva de calibración de Atenolol.

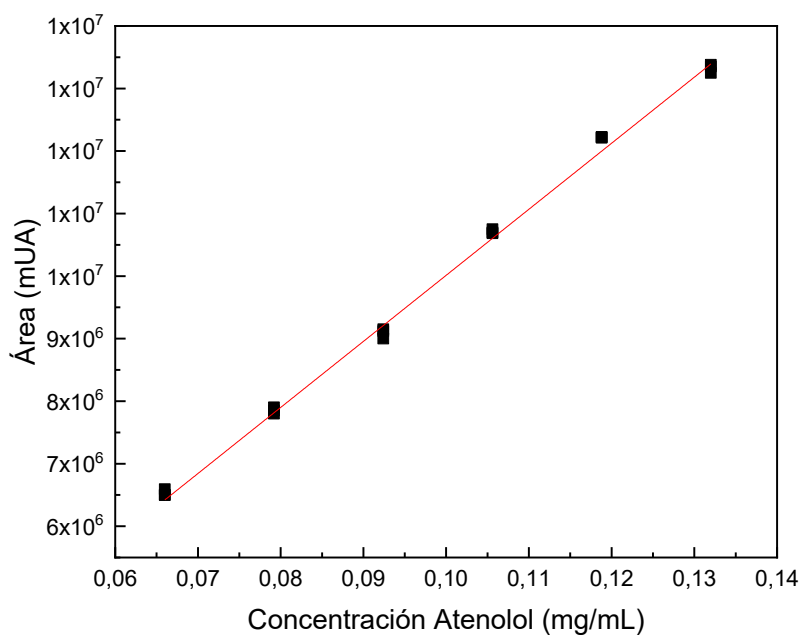


Figura A.1 Curva de calibración de Atenolol por CLAE

b- Interpretación estadística de la regresión lineal

Cálculo del coeficiente de correlación (r) (Mínimo 0,99)

Resultado: 0,9932

Coefficiente de determinación "r²" (Mínimo 0,98)

Resultado: 0,9864

Interpretación: El 98,64% de las variaciones se deben a la influencia de la variable "x" (concentración inyectada).

Test estadístico para el coeficiente de correlación "r"

Resultados:

t_{tabla} : 2,12, para $18-2= 16$ grados de libertad y $p=0,05$

$t_{\text{regresión}}$: 47,72

Como $t_{\text{regresión}} > t_{\text{tabla}}$, si existe una correlación lineal significativa entre x e y ($r \neq 0$).

Límite de confianza del intercepto "a"

Resultado

$t_{\text{tabla}} = 2,12$ para $18-2 = 16$ grados de libertad y $p = 0.05$

Intervalo de confianza del intercepto "a"

$a = -550340,7619 \pm 2,12 \times 313802,276$

$a = -1215571,87$ hasta $114890,3458$

El intervalo de confianza del intercepto "a" incluye el cero.

Determinación del test estadístico del intercepto "a"

Resultado:

$t_{\text{tabla}} = 2,12$ para $18-2 = 16$ grados de libertad y $p=0,05$

$t_{\text{experimental}} = 1,75$

Límite de confianza de la pendiente "b"

Resultado

$t_{\text{tabla}} = 2,12$ para $18-2 = 16$ grados de libertad y $p = 0,05$

Intervalo de confianza de la pendiente "b"

$b = 105628261,9 \pm 2,12 \times 3090605,738$

$b = 99076470,42$ hasta $112180053,4$

Determinación del test estadístico de la pendiente "b"

Resultado:

$t_{\text{tabla}} = 2,12$ para $18-2=16$ grados de libertad y $p = 0,05$

$t_{\text{experimental}} = 34,17$

$t_{\text{experimental}} > t_{\text{tabla}} \Rightarrow b \neq 0$

Cálculo del coeficiente de variación (CV) de los factores de respuesta (f):

Resultados:

Promedio de "f": 99735272,59

Desviación estándar de "f": 3217837,301

Coeficiente de variación (CV): 3,22 %

Los parámetros calculados para evaluar la calidad de la regresión cumplen con los criterios de aceptación correspondientes, lo que indica que la técnica es lineal en el intervalo de concentraciones estudiado.

Precisión

La repetibilidad fue evaluada mediante el análisis estadístico de las desviaciones estándares relativas para nueve inyecciones de una solución conteniendo tres niveles diferentes de concentración del analito. Las concentraciones estudiadas fueron equivalentes a 90, 100 y 110% del valor nominal y las desviaciones estándares relativas fueron 1,2, 0,2 y 0,1% para cada nivel, respectivamente.

La precisión intermedia se determinó analizando nueve muestras independientes de estándares conteniendo el analito a tres niveles, 90, 100 y 110 %, por tres analistas diferentes durante tres días. Una prueba ANOVA aplicada a los resultados obtenidos, reveló que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos entre los distintos días y analistas (Tabla A.3). En todos los casos, las desviaciones estándares relativas fueron menores al 2%, confirmando la precisión del método.

Los valores del cociente F observados, inferiores a los valores críticos, confirmaron la precisión intermedia del método.

La Tabla A.3 resume los datos de validación del método analítico para rango, linealidad, precisión y especificidad.

Tabla A.3 Atenolol. Resumen de los datos de validación del método cromatográfico.

| Parámetros | Atenolol | |
|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| | Especificaciones | Resultado |
| Rango lineal (mg L ⁻¹) | | 66,0-132,0 |
| Linealidad-Ecuación de regresión | | |
| $b \pm SD_b$ (x 10 ⁸) | | 1,05 ± 0,03 |
| $a \pm SD_a$ (x 10 ⁵) | | -5,5 ± 3,1 |
| Coeficiente de correlación (r) | Mínimo 0,99 | 0,9932 |
| Coeficiente de determinación (r ²) | Mínimo 0,98 | 0,9864 |
| Test estadístico para el "r" p= 0,05 y n-2 grados de libertad | $t_{\text{tabla}} = 2,12$ $t_{\text{regresión}} \gg t_{\text{tabla}}$ | $t_{\text{regresión}} = 47,72$ |
| Coeficiente de variación (%) | Máximo 5% | 3,22% |
| Prueba de linealidad de la pendiente p=0,05 y n-2 grados de libertad | $t_{\text{tabla}} = 2,12$ $t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}}$ | $t_{\text{exp}} = 34,17$ |
| Prueba de proporcionalidad del intercepto p=0,05 y n-2 grados de libertad | $t_{\text{tabla}} = 2,12$ $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$ | $t_{\text{exp}} = 1,75$ |
| Precisión | | |
| Repetibilidad (Rec., % ± DER) | | |
| Nivel bajo (90%) | | 102,4 ± 1,2 |
| Nivel medio (100%) | | 100,8 ± 0,2 |
| Nivel alto (110%) | | 100,9 ± 0,1 |
| Precisión intermedia (Rec., % ± DER) | | |
| Nivel bajo (90%) | | 100,4 ± 0,4 |
| Nivel medio (100%) | | 100,5 ± 0,4 |
| Nivel alto (110%) | | 100,1 ± 0,4 |
| Recuperación global (% ± DER) | | 100,4 ± 0,4 |
| ANOVA- F _{entre días} | $F_{(0,95; 2; 17)} = 3,124$ | F = 1,539 |
| ANOVA- F _{entre analistas} | $F_{(0,95; 2; 17)} = 3,124$ | F = 3,118 |
| Especificidad (Pureza de pico) | > 0,95 | 0,9997 |

Exactitud

La exactitud se evaluó midiendo la recuperación del analito por el método de adición de estándar. Cantidades conocidas del analito fueron agregadas a una muestra de gotas pre-analizada con el método CLAE, conteniendo el equivalente al 80% de lo declarado, a fin de obtener muestras fortificadas con concentraciones correspondientes al 90, 100 y 110%. Cada una de las muestras fueron inyectadas tres veces. Los resultados de exactitud, expresados como porcentaje de analito recuperado en el ensayo y el correspondiente sesgo se muestran en la Tabla A.4, donde el sesgo se calculó como la diferencia entre el porcentaje de analito efectivamente recuperado y el valor teórico (100%).

Tabla A.4 Atenolol. Resultados de la determinación de la exactitud del método

| Inicial | Concentración (mg mL ⁻¹) | | | RSD (%) n=3 | Recuperación analito (%) | Sesgo (%) |
|---------|--------------------------------------|--------|------------|----------------|--------------------------|-----------|
| | Agregado | Total | Encontrado | | | |
| 0,085 | 0,00 | 0,085 | 0,0849 | 0,26 | 99,99 | -0,01 |
| 0,085 | 0,0093 | 0,0943 | 0,0937 | 0,40 | 99,37 | -0,63 |
| 0,085 | 0,0193 | 0,1043 | 0,1046 | 0,17 | 100,36 | +0,36 |
| 0,085 | 0,0288 | 0,1138 | 0,1145 | 0,44 | 100,69 | +0,69 |

Evaluación estadística

La Tabla A.5 resume los datos para el análisis estadístico de la exactitud del método.

Tabla A.5 Atenolol. Análisis estadístico de la exactitud del método

| Análisis estadístico | |
|----------------------------------------|--------|
| Nº de muestras (n) | 9 |
| Recuperación promedio (R) (90-110%) | 100,14 |
| Desviación estándar (S) | 0,69 |
| Desvío estándar relativo (Máximo 5,0%) | 0,68 |

Cálculo de "t" de Student

Criterio de aceptación:

Si t_{exp} es menor que t_{tabla} , no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100% y la exactitud es apropiada.

Resultado:

$t_{tabla} = 2,306$; para $9-1=8$ grados de libertad y $p=0,05$

$t_{exp} = -1,85$

Aptitud del sistema

La demostración de aptitud del sistema fue realizada de acuerdo con las indicaciones de la USP 38 para confirmar que el equipo era adecuado para efectuar los análisis. La prueba se llevó a cabo inyectando cinco replicados de una solución estándar conteniendo $0,1056 \text{ mg mL}^{-1}$ de ATN.

El correspondiente valor de DER fue menor al 2%, resultado satisfactorio de acuerdo con los requerimientos oficiales. El número de platos teóricos de la columna y el factor de coeio también fueron determinados, y sus correspondientes valores se listan en la Tabla A.6

Tabla A.6 Atenolol. Resultados de la aptitud del sistema

| Analito | Factor de coeio (t_f) | Platos teóricos (N) | DER (%) ^a |
|---------|---------------------------|-------------------------|----------------------|
| ATN | 1,25 | 1460 | 0,15 |

^a Cinco replicados

Selectividad

La selectividad del método fue establecida determinando la pureza de pico usando un detector con arreglo de diodos bajo las condiciones cromatográficas citadas.

Se encontró un valor de pureza de pico superior a 0,9997, evidenciando la aptitud del método para determinar inequívocamente el analito de interés, es decir sin interferencias.

Además, se inyectaron soluciones de la matriz de la formulación y un estándar de Atenolol. No se observó la presencia de productos de degradación y los tiempos de retención para atenolol en la formulación y la solución estándar fueron coincidentes.

A.3.10.2 Gotas de Citrato de Sildenafil

Soluciones para CLAE

Soluciones madre

La solución madre de Citrato de Sildenafil (SIL) fue preparada en un matraz aforado de 25,00 mL disolviendo una cantidad exactamente pesada (32,6 mg) de SIL en acetonitrilo, siendo la concentración final 1,304 mg mL⁻¹.

Soluciones de trabajo

Las soluciones de trabajo fueron preparadas inmediatamente antes de su uso, en matraces aforados de 10,00 mL, mediante diluciones apropiadas de la solución madre en fase móvil. El rango de trabajo fue 0,065-0,13 mg mL⁻¹.

Condiciones cromatográficas.

Determinación de Citrato de Sildenafil

Cada una de las muestras fue analizada a 240 nm para determinar el contenido de citrato de sildenafil. Se empleó una columna SiliaChrom C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm), la fase móvil consistió en una mezcla de buffer acetato de amonio (50 mM, pH 7): acetonitrilo (50:50) con un flujo de 1 mL min⁻¹ y un volumen de inyección de 20 μL²⁴.

Validación del método cromatográfico

Linealidad y rango (intervalo de concentraciones de trabajo)

Teniendo en cuenta el propósito de la cuantificación, el rango lineal fue 0,065-0,13 mg mL⁻¹. Este rango equivale al intervalo del 70 al 130% de la respuesta objetivo para el contenido promedio de los analitos en las formulaciones desarrolladas.

La Tabla A.6 resume los datos obtenidos de las áreas bajo la curva para cada de las concentraciones evaluadas, por triplicado. Además, se presentan los cálculos de $x \cdot y$, x^2 , y^2 y $f(x/y)$, necesarios para realizar la evaluación estadística de la linealidad.

a- Cálculo de la recta de regresión

La Tabla A.7 resume los resultados de la validación del método HPLC empleado en la cuantificación de sildenafil en cada una de las formulaciones.

Tabla A.7 Citrato de sildenafil. Resultados de la linealidad del método

| SIL (mg mL ⁻¹) | Área (mUA) | $x \cdot y$ | x^2 | y^2 | $f(y/x)$ | |
|-------------------------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 0,065 | 4997854 | 324860,51 | 0,004225 | 2,49785E+13 | 76890061,54 | |
| 0,065 | 4987097 | 324161,30 | 0,004225 | 2,48711E+13 | 76724569,23 | |
| 0,065 | 4991160 | 324425,40 | 0,004225 | 2,49117E+13 | 76787076,92 | |
| 0,0715 | 5466370 | 390845,45 | 0,00511225 | 2,98812E+13 | 76452727,27 | |
| 0,0715 | 5483877 | 392097,20 | 0,00511225 | 3,00729E+13 | 76697580,42 | |
| 0,0715 | 5517445 | 394497,31 | 0,00511225 | 3,04422E+13 | 77167062,94 | |
| 0,0845 | 6624518 | 559771,77 | 0,00714025 | 4,38842E+13 | 78396662,72 | |
| 0,0845 | 6647089 | 561679,02 | 0,00714025 | 4,41838E+13 | 78663775,15 | |
| 0,0845 | 6597517 | 557490,18 | 0,00714025 | 4,35272E+13 | 78077124,26 | |
| 0,1014 | 7988598 | 810043,83 | 0,01028196 | 6,38177E+13 | 78783017,75 | |
| 0,1014 | 8031867 | 814431,31 | 0,01028196 | 6,45109E+13 | 79209733,73 | |
| 0,1014 | 8051341 | 816405,97 | 0,01028196 | 6,48241E+13 | 79401785,01 | |
| 0,1157 | 9025273 | 1044224,08 | 0,01338649 | 8,14556E+13 | 78005816,77 | |
| 0,1157 | 9040085 | 1045937,83 | 0,01338649 | 8,17231E+13 | 78133837,51 | |
| 0,1157 | 9029107 | 1044667,68 | 0,01338649 | 8,15248E+13 | 78038954,19 | |
| 0,13 | 9989962 | 1298695,06 | 0,0169 | 9,97993E+13 | 76845861,54 | |
| 0,13 | 9957197 | 1294435,61 | 0,0169 | 9,91458E+13 | 76593823,08 | |
| 0,13 | 9908565 | 1288113,45 | 0,0169 | 9,81797E+13 | 76219730,77 | |
| Sumatoria | 1,7043 | 132334922 | 13286783,02 | 0,17113785 | 1,03173E+15 | 1397089201 |
| Promedio | | | | | | 77616066,71 |
| Desviación estándar | | | | | | 1017620,33 |
| Coefficiente de variación | | | | | | 1,31 |

De los datos obtenidos de la Tabla A.7, se obtienen los siguientes valores:

$$a = 16206,12$$

$$b = 77476507,53$$

Ecuación de la recta: $y = 77476507,53 x + 16206,12$

La Figura A.2 Representa la curva de calibración de Sildenafil.

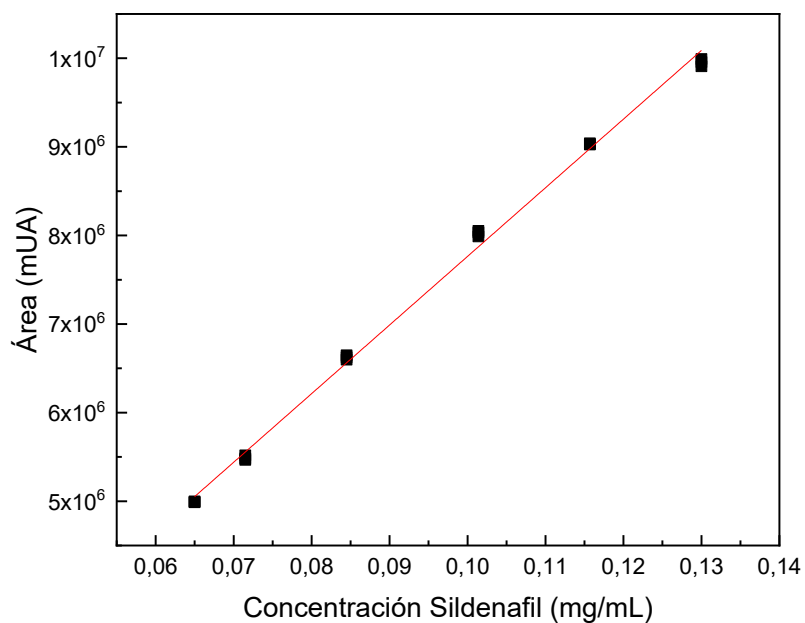


Figura A.2 Curva de calibración de Sildenafil por CLAE

b- Interpretación estadística de la regresión lineal

Cálculo del coeficiente de correlación (r) (Mínimo 0,99)

Resultado: 0,9985

Coeficiente de determinación "r²" (Mínimo 0,98)

Resultado: 0,9970

Test estadístico para el coeficiente de correlación "r"

Resultados:

t_{tabla} : 2,12, para $18-2=16$ grados de libertad y $p=0,05$

$t_{\text{regresión}}$: 72,95

Como $t_{\text{regresión}} > t_{\text{tabla}}$, si existe una correlación lineal significativa entre x e y ($r \neq 0$)

Límite de confianza del intercepto “a”

Resultado

$t_{\text{tabla}} = 2,12$ para $18-2 = 16$ grados de libertad y $p = 0.05$

Intervalo de confianza del intercepto “a”

$a = 16206,12286 \pm 2,12 \times 103368,4314$

$a = -202925,1627$ hasta $235337,4084$

Determinación del test estadístico del intercepto “a”

Criterio de aceptación

Si $t_{\text{experimental}}$ es menor que t_{tabla} , según las condiciones mencionadas, existe una correlación lineal significativa.

Resultado:

$t_{\text{tabla}} = 2,12$ para $18-2 = 16$ grados de libertad y $p = 0,05$

$t_{\text{experimental}} = 0,15$

Límite de confianza de la pendiente “b”

Resultado

$t_{\text{tabla}} = 2,12$ para $18-2 = 16$ grados de libertad y $p = 0,05$

Intervalo de confianza de la pendiente “b”

$b = 77476507,53 \pm 2,12 \times 1060110,516$

$b = 75229173,63$ hasta $79723841,43$

Determinación del test estadístico de la pendiente “b”

Criterio de aceptación:

Si $t_{\text{experimental}}$ es mayor que t_{tabla} , existe una correlación lineal significativa, entonces la pendiente “b” es significativamente diferente de cero y se rechaza la hipótesis nula

$t_{\text{tabla}} = 2,12$ para $18-2=16$ grados de libertad y $p = 0,05$

$t_{\text{experimental}} = 73,08$

Cálculo del coeficiente de variación (CV) de los factores de respuesta (f):

Resultados:

Promedio de "f": 77616066,71

Desviación estándar de "f": 1017620,332

Coeficiente de variación (CV): 1,31 %

La Tabla A.8 muestra los resultados de los parámetros calculados para evaluar la calidad de la regresión, los cuales cumplen con los criterios de aceptación correspondientes, lo que indica que el método es lineal en el intervalo de concentraciones estudiado.

Tabla A.8 Citrato de sildenafil. Resultados de la linealidad del método

| Parámetros | Citrato de sildenafil | |
|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------|
| | Especificaciones | Resultado |
| Rango lineal (mg L ⁻¹) | | 65,0-130,0 |
| Linealidad-Ecuación de regresión | | |
| $b \pm SD_b$ (x 10 ⁷) | | 7,75 ± 0,1 |
| $a \pm SD_a$ (x 10 ⁴) | | 1,62 ± 1,1 |
| Coeficiente de correlación (r) | Mínimo 0,99 | 0,9985 |
| Coeficiente de determinación (r ²) | Mínimo 0,98 | 0,9970 |
| Test estadístico para el "r" | $t_{\text{tabla}} = 2,12$ | $t_{\text{regresión}} = 72,95$ |
| p= 0,05 y n-2 grados de libertad | $t_{\text{regresión}} \gg t_{\text{tabla}}$ | |
| Coeficiente de variación (%) | Máximo 5% | 1,31% |
| Prueba de linealidad de la pendiente p=0,05 y n-2 grados de libertad | $t_{\text{tabla}} = 2,12$ | $t_{\text{exp}} = 73,08$ |
| | $t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}}$ | |
| Prueba de proporcionalidad del intercepto p=0,05 y n-2 grados de libertad | $t_{\text{tabla}} = 2,12$ | $t_{\text{exp}} = 0,5$ |
| | $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$ | |

Precisión

La precisión fue determinada a dos niveles, repetibilidad y la precisión entre días (precisión intermedia).

La repetibilidad fue evaluada mediante el análisis estadístico de las desviaciones estándares relativas para nueve inyecciones de una solución conteniendo tres niveles diferentes de concentración del analito. Las concentraciones estudiadas fueron equivalentes a 70, 100 y 130% del valor nominal y las desviaciones estándares relativas fueron 0,4, 0,1 y 0,3% para cada nivel, respectivamente.

La precisión intermedia se determinó analizando tres muestras independientes de estándares conteniendo el analito al 100%, durante tres días. Una prueba *t* aplicado a los resultados obtenidos, reveló que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos entre los distintos días (Tabla A.13). En todos los casos, las desviaciones estándares relativas fueron menores al 2%, confirmando la precisión del método. Los valores del cociente *t* observado, inferior al valor crítico, confirma la precisión intermedia del método.

Exactitud

La exactitud se evaluó midiendo la recuperación del analito por el método de adición de estándar sobre las dos matrices optimizadas (matriz 1 y matriz 2, 5 y 20% v/v de glicerina, respectivamente) y en la formulación que contiene 2 mg mL⁻¹. La determinación de recuperaciones esencialmente cuantitativas en el rango estudiado, con un bajo valor de DER y mínimo sesgo son indicativas de exactitud. Por ello, cantidades conocidas del analito fueron agregadas a una muestra de gotas pre-analizada con el método CLAE, conteniendo el equivalente al 80% de lo declarado, a fin de obtener muestras fortificadas con concentraciones correspondientes al 90, 100 y 110%. Cada una de las muestras fueron inyectadas tres veces. Los resultados de exactitud, expresados como porcentaje de analito recuperado en el ensayo y el correspondiente sesgo para la exactitud determinada en la matriz 1 y en la matriz 2, se muestran en las Tablas A.9 y A.10, donde el sesgo se calculó

como la diferencia entre el porcentaje de analito efectivamente recuperado y el valor teórico (100%).

Tabla A.9 Citrato de sildenafil. Resultados de la determinación de la exactitud del método con matriz 1

| Concentración (mg mL ⁻¹) | | | | RSD (%) | Recuperación de | Sesgo |
|--------------------------------------|----------|--------|------------|---------|-----------------|-------|
| Inicial | Agregado | Total | Encontrado | n=3 | analito (%) | (%) |
| 0,08 | 0,00 | 0,08 | 0,079 | 0,35 | 99,88 | -0,12 |
| 0,08 | 0,0102 | 0,0904 | 0,0902 | 0,45 | 99,85 | -0,15 |
| 0,08 | 0,0193 | 0,0996 | 0,0992 | 0,37 | 99,58 | -0,42 |
| 0,08 | 0,0326 | 0,1126 | 0,1132 | 0,24 | 101,16 | +1,16 |

Tabla A.10 Citrato de sildenafil. Resultados de la determinación de la exactitud del método con matriz 2

| Concentración (mg mL ⁻¹) | | | | RSD (%) | Recuperación de | Sesgo |
|--------------------------------------|----------|--------|------------|---------|-----------------|-------|
| Inicial | Agregado | Total | Encontrado | n=3 | analito (%) | (%) |
| 0,083 | 0,00 | 0,083 | 0,0839 | 0,38 | 101,08 | +1,08 |
| 0,083 | 0,0104 | 0,0934 | 0,0925 | 0,35 | 99,03 | -0,97 |
| 0,083 | 0,0185 | 0,1015 | 0,1022 | 0,47 | 100,69 | +0,69 |
| 0,083 | 0,0318 | 0,1148 | 0,1154 | 0,29 | 100,86 | +0,26 |

Evaluación estadística

Las Tablas A.11 y A.12 muestran los resultados de los parámetros estadísticos para evaluar la exactitud del método en las dos matrices desarrolladas.

Tabla A.11 Citrato de sildenafil. Análisis estadístico de la exactitud del método. Matriz 1

| Análisis estadístico | |
|-------------------------------------------------|--------|
| Nº de muestras (n) | 9 |
| Recuperación promedio (R) (90-110%) | 100,19 |
| Desviación estándar (S) | 0,84 |
| Desvío estándar relativo (DER) (Máximo 5,0%) | 0,84 |

Cálculo de "t" de Student

Criterio de aceptación:

Si t_{exp} es menor que t_{tabla} , no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100% y la exactitud es apropiada.

Resultado:

$t_{tabla} = 2,306$; para $9-1=8$ grados de libertad y $p=0,05$

$t_{exp} = 2,03$

Tabla A.12 Citrato de sildenafil. Análisis estadístico de la exactitud del método. Matriz 2

| Análisis estadístico | |
|-------------------------------------------------|--------|
| Nº de muestras (n) | 9 |
| Recuperación promedio (R) (90-110%) | 100,19 |
| Desviación estándar (S) | 1,01 |
| Desvío estándar relativo (DER) (Máximo 5,0%) | 1,00 |

Resultado:

$t_{tabla} = 2,306$; para $9-1=8$ grados de libertad y $p=0,05$

$t_{exp} = 1,71$

La Tabla A.13 resume los resultados de la exactitud, precisión y especificidad del método.

Tabla A.13 Citrato de sildenafil. Resultados de la exactitud, precisión y especificidad del método

| Parámetros | Citrato de Sildenafil |
|-------------------------------------------|-----------------------|
| Precisión | |
| Repetibilidad [Rec., %± RSD] ^a | |
| Nivel bajo (70%) | 101,4 ± 0,4 |
| Nivel medio (100%) | 99,7 ± 0,1 |
| Nivel alto (130%) | 100,0 ± 0,3 |
| Precisión Intermedia ^b | |
| t_{cal} | 2,083 |
| t_{crit} | 2,776 |
| Exactitud (Bias,%) | |
| Matriz 1 | |
| Nivel bajo (90%) | +1,43 |
| Nivel medio (100%) | +0,61 |
| Nivel alto (110%) | +1,06 |
| Matriz 2 | |
| Nivel bajo (90%) | -0,97 |
| Nivel medio (100%) | +0,69 |
| Nivel alto (110%) | +0,26 |
| Especificidad (Pureza de pico) | 0,9997 |

^a Nueve replicados de solución estándar a tres niveles

^b Inyecciones por triplicado, dos días al nivel del 100%

Aptitud del sistema

La demostración de aptitud del sistema fue realizada de acuerdo con las indicaciones de la USP 38 para confirmar que el equipo era adecuado para efectuar los análisis. La

prueba se llevó a cabo inyectando cinco replicados de una solución estándar conteniendo 0,1014 mg mL⁻¹ de SIL.

El correspondiente valor de DER fue menor al 2%, resultado satisfactorio de acuerdo con los requerimientos oficiales. El número de platos teóricos de la columna y el factor de coeio también fueron determinados, y sus correspondientes valores se listan en la Tabla A.14

Tabla A.14 Citrato de sildenafil. Resultados de la aptitud del sistema

| Analito | Factor de coeio (t_f) | Platos teóricos (N) | DER (%) ^a |
|---------|---------------------------|-------------------------|----------------------|
| SIL | 1,26 | 10980 | 0,28 |

^a Cinco replicados

Selectividad

La selectividad del método fue establecida determinando la pureza de pico usando un detector con arreglo de diodos bajo las condiciones cromatográficas citadas.

Se encontró un valor de pureza de pico superior a 0,9997, evidenciando la aptitud del método para determinar inequívocamente el analito de interés, es decir sin interferencias. Además, se inyectaron soluciones de la matriz de la formulación y un estándar de Sildenafil. No se observó la presencia de productos de degradación y los tiempos de retención para Sildenafil en la formulación y la solución estándar fueron coincidentes.

A.3.10.3 Gotas de Hidroclorotiazida

Soluciones para CLAE

Solución madre

La solución madre de HCT fue preparada en un matraz aforado de 50,00 mL disolviendo una cantidad exactamente pesada (67,7 mg) de HCT en fase móvil (ver condiciones cromatográficas), siendo la concentración final 1,354 mg mL⁻¹.

Soluciones de trabajo

Las soluciones de trabajo fueron preparadas inmediatamente antes de su uso, en matraces aforados de 10,00 mL, mediante diluciones apropiadas de la solución madre en fase móvil. El rango de trabajo fue 0,0677-0,1354 mg mL⁻¹.

Condiciones cromatográficas

Determinación de Hidroclorotiazida

Los análisis de cada una de las muestras se llevaron a cabo empleando una columna SiliaChrom XDB1 C18 (250 × 4,6 mm d.i., 5 µm tamaño de partícula), termostaticada a 30°C con una fase móvil conteniendo 30 % de acetonitrilo y 70 % de una solución buffer de fosfatos (50 mM, pH 2,5), a una velocidad de flujo de 1,0 mL min⁻¹, con detección UV a 225 nm²⁵.

Validación del método cromatográfico

Para determinar el rango y la linealidad, se prepararon estándares de calibración que contenían 67,7, 81,24, 94,78, 108,32, 121,86 y 135,4 mg L⁻¹ de HCT y fueron inyectadas por triplicado. Este rango equivale al intervalo del 70 al 130% de la respuesta objetivo para el contenido promedio del analito en las formulaciones desarrolladas.

Evaluación estadística

a- Cálculo de la recta de regresión

La Tabla A.15 resume los datos obtenidos de las áreas bajo la curva para cada de las concentraciones evaluadas, por triplicado. Además, se presentan los cálculos de $x \cdot y$, x^2 , y^2 y $f(x/y)$, necesarios para realizar la evaluación estadística de la linealidad.

Tabla A.15 Hidroclorotiazida. Resultados de la linealidad del método

| | HCT (mg mL ⁻¹) | Área (mUA) | x*y | x ² | y ² | f(y/x) |
|---------------------------|-------------------------------|------------|-------------|----------------|----------------|-------------|
| | 0,0677 | 12546115 | 849371,98 | 0,00458329 | 1,57405E+14 | 185319276,2 |
| | 0,0677 | 12328371 | 834630,71 | 0,00458329 | 1,51989E+14 | 182102969 |
| | 0,0677 | 12303882 | 832972,81 | 0,00458329 | 1,51386E+14 | 181741240,8 |
| | 0,08124 | 16653019 | 1352891,26 | 0,006599938 | 2,77323E+14 | 204985462,8 |
| | 0,08124 | 16625176 | 1350629,29 | 0,006599938 | 2,76396E+14 | 204642737,6 |
| | 0,08124 | 16597238 | 1348359,61 | 0,006599938 | 2,75468E+14 | 204298842,9 |
| | 0,09478 | 19520352 | 1850138,96 | 0,008983248 | 3,81044E+14 | 205954336,4 |
| | 0,09478 | 19389868 | 1837771,68 | 0,008983248 | 3,75967E+14 | 204577632,4 |
| | 0,09478 | 19534901 | 1851517,91 | 0,008983248 | 3,81612E+14 | 206107839,2 |
| | 0,10832 | 22056522 | 2389162,46 | 0,011733222 | 4,8649E+14 | 203623726 |
| | 0,10832 | 22083361 | 2392069,66 | 0,011733222 | 4,87675E+14 | 203871501,1 |
| | 0,10832 | 22086506 | 2392410,33 | 0,011733222 | 4,87814E+14 | 203900535,5 |
| | 0,12186 | 24528913 | 2989093,33 | 0,01484986 | 6,01668E+14 | 201287649,8 |
| | 0,12186 | 24611372 | 2999141,79 | 0,01484986 | 6,0572E+14 | 201964319,7 |
| | 0,12186 | 24508896 | 2986654,06 | 0,01484986 | 6,00686E+14 | 201123387,5 |
| | 0,1354 | 26999973 | 3655796,34 | 0,01833316 | 7,28999E+14 | 199408958,6 |
| | 0,1354 | 27119646 | 3672000,06 | 0,01833316 | 7,35475E+14 | 200292806,5 |
| | 0,1354 | 27152660 | 3676470,16 | 0,01833316 | 7,37267E+14 | 200536632,2 |
| Sumatoria | 1,8279 | 366646771 | 39261082,49 | 0,195248154 | 7,90038E+15 | 3595739854 |
| Promedio | | | | | | 199763325,2 |
| Desviación estándar | | | | | | 7961826,39 |
| Coefficiente de variación | | | | | | 3,98 |

De los datos obtenidos de la Tabla A.15, se obtienen los siguientes valores:

$$a = -1028739,73$$

$$b = 210713981,1$$

$$\text{Ecuación de la recta: } y = 210713981,1 x - 1028739,73$$

La Figura A.3 Representa la curva de calibración de Hidroclorotiazida.

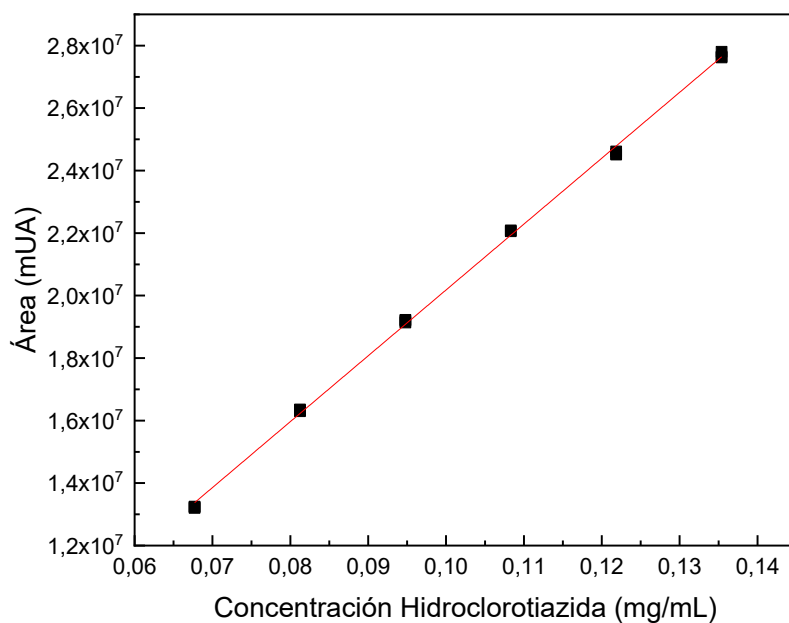


Figura A.3 Curva de calibración de Hidroclorotiazida por CLAE

b- Interpretación estadística de la regresión lineal

Cálculo del coeficiente de correlación (r) (Mínimo 0,99)

Resultado: 0,9945

Coefficiente de determinación "r²" (Mínimo 0,98)

Resultado: 0,9891

Test estadístico para el coeficiente de correlación "r"

Resultados:

t_{tabla} : 2,12, para $18-2=16$ grados de libertad y $p=0,05$

$t_{\text{regresión}}$: 38,10

Como $t_{\text{regresión}} > t_{\text{tabla}}$, si existe una correlación lineal significativa entre x e y ($r \neq 0$)

Límite de confianza del intercepto “a”

Fórmula para hallar los límites de confianza del intercepto

$$a = a \pm t_{\text{tabla}} \times S_a$$

Resultado

$$t_{\text{tabla}} = 2,12 \text{ para } 18-2 = 16 \text{ grados de libertad y } p = 0,05$$

Intervalo de confianza del intercepto “a”

$$a - 1028739,73 \pm 2,12 \times 575877,1612$$

$$a = -2249544,776 \text{ hasta } 192065,3155$$

Determinación del test estadístico del intercepto “a”

Criterio de aceptación

Si $t_{\text{experimental}}$ es menor que t_{tabla} , según las condiciones mencionadas, existe una correlación lineal significativa.

Resultado:

$$t_{\text{tabla}} = 2,12 \text{ para } 18-2 = 16 \text{ grados de libertad y } p = 0,05$$

$$t_{\text{experimental}} = 1,78$$

Límite de confianza de la pendiente “b”

Fórmula para hallar los límites de confianza de la pendiente

$$b = b \pm t_{\text{tabla}} \times S_b$$

$$t_{\text{tabla}} = 2,12 \text{ para } 18-2 = 16 \text{ grados de libertad y } p = 0,05$$

Intervalo de confianza de la pendiente “b”

$$b = 210713981,1 \pm 2,12 \times 5529331,646$$

$$b = 198992321,7 \text{ hasta } 222435640,6$$

Determinación del test estadístico de la pendiente “b”

Criterio de aceptación:

Si $t_{\text{experimental}}$ es mayor que t_{tabla} , existe una correlación lineal significativa, entonces la pendiente "b" es significativamente diferente de cero y se rechaza la hipótesis nula

$t_{\text{tabla}} = 2,12$ para $18-2=16$ grados de libertad y $p = 0,05$

$t_{\text{experimental}} = 38,10$

Cálculo del coeficiente de variación (CV) de los factores de respuesta (f):

Resultados:

Promedio de "f": 199763325,2

Desviación estándar de "f": 7961826,396

Coeficiente de variación (CV): 3,98 %

Los parámetros calculados para evaluar la calidad de la regresión cumplen con los criterios de aceptación correspondientes, lo que indica que la técnica es lineal en el intervalo de concentraciones estudiado.

La repetibilidad fue evaluada mediante el análisis estadístico de las desviaciones estándares relativas para seis inyecciones de una solución conteniendo 94,78 mg L⁻¹ del IFA.

La precisión intermedia se determinó analizando nueve muestras independientes de estándares conteniendo el analito a tres niveles, 90, 100 y 110 %, por tres analistas diferentes durante tres días. Una prueba ANOVA aplicada a los resultados obtenidos, reveló que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos entre los distintos días y analistas. En todos los casos, las desviaciones estándares relativas fueron menores al 2%, confirmando la precisión del método.

Los valores del cociente F observados, inferiores a los valores críticos, confirmaron la precisión intermedia del método. La Tabla A.16 resume los datos de validación del método cromatográfico.

Tabla A.16 Hidroclorotiazida Resumen de los datos de validación del método cromatográfico

| Parámetros | Hidroclorotiazida | |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| | Especificaciones | Resultado |
| Rango lineal (mg L ⁻¹) | | 67,7-135,4 |
| Linealidad-Ecuación de regresión | | |
| $b \pm SD_b$ (x 10 ⁸) | | 2,10 ± 0,05 |
| $a \pm SD_a$ (x 10 ⁵) | | -1,03 ± 0,57 |
| Coefficiente de correlación (r) | Mínimo 0,99 | 0,9945 |
| Coefficiente de determinación (r ²) | Mínimo 0,98 | 0,9891 |
| Test estadístico para el "r" | $t_{\text{tabla}} = 2,12$ | $t_{\text{regresión}} = 38,10$ |
| $p = 0,05$ y n-2 grados de libertad | $t_{\text{regresión}} \gg t_{\text{tabla}}$ | |
| Coefficiente de variación (%) | Máximo 5% | 3,98% |
| Prueba de linealidad de la pendiente $p = 0,05$ y n-2 grados de libertad | $t_{\text{tabla}} = 2,12$ $t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}}$ | $t_{\text{exp}} = 38,10$ |
| Prueba de proporcionalidad del intercepto $p = 0,05$ y n-2 grados de libertad | $t_{\text{tabla}} = 2,12$ $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$ | $t_{\text{exp}} = 1,78$ |
| Precisión | | |
| Repetibilidad (Rec., % ± DER, n=6) | | |
| Nivel medio (100%) | | 100,5 ± 0,3 |
| Precisión intermedia (Rec., % ± DER) | | |
| Nivel bajo (90%) | | 100,3 ± 0,4 |
| Nivel medio (100%) | | 100,6 ± 0,5 |
| Nivel alto (110%) | | 100,5 ± 0,3 |
| Recuperación global (% ± DER) | | 100,3 ± 0,3 |
| ANOVA- F _{entre días} | $F_{(0,95; 2; 17)} = 3,124$ | F=1,475 |
| ANOVA- F _{entre analistas} | $F_{(0,95; 2; 17)} = 3,124$ | F=2,718 |
| Especificidad (Pureza de pico) | > 0,95 | 0,9952 |

Exactitud

La exactitud se evaluó midiendo la recuperación del analito por el método de adición de estándar sobre la formulación conteniendo HPMC al 1%p/p. Cantidades conocidas del analito fueron agregadas a una muestra de gotas pre-analizada con el método CLAE, conteniendo el equivalente al 80% de lo declarado, a fin de obtener muestras fortificadas con concentraciones correspondientes al 90, 100 y 110%. Cada una de las muestras fueron inyectadas tres veces. Los resultados de exactitud, expresados como porcentaje de analito recuperado en el ensayo y el correspondiente sesgo se muestran en la Tabla A.17, donde el sesgo se calculó como la diferencia entre el porcentaje de analito efectivamente recuperado y el valor teórico (100%).

Tabla A.17 Hidroclorotiazida. Resultados de la determinación de la exactitud del método

| Concentración (mg mL ⁻¹) | | | | RSD (%) | Recuperación de | Sesgo |
|--------------------------------------|----------|--------|------------|---------|-----------------|-------|
| Inicial | Agregado | Total | Encontrado | n=3 | analito (%) | (%) |
| 0,082 | 0,00 | 0,082 | 0,0817 | 0,28 | 99,63 | -0,37 |
| 0,082 | 0,0095 | 0,0915 | 0,0917 | 0,41 | 100,56 | +0,21 |
| 0,082 | 0,0198 | 0,1018 | 0,1022 | 0,27 | 100,39 | +0,39 |
| 0,082 | 0,0294 | 0,1114 | 0,1111 | 0,47 | 99,32 | -0,68 |

Evaluación estadística

La Tabla A.18 resume los resultados de los parámetros estadísticos necesarios para evaluar la exactitud del método.

Tabla A.18 Hidroclorotiazida. Análisis estadístico de la exactitud del método

| Análisis estadístico | |
|-------------------------------------------|--------|
| Nº de muestras (n) | 9 |
| Recuperación promedio (R) (90-110%) | 100,09 |
| Desviación estándar (S) | 0,67 |
| Desvío estándar relativo (Máximo 5,0%) | 0,67 |

Cálculo de "t" de Student

Criterio de aceptación:

Si t_{exp} es menor que t_{tabla} , no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100% y la exactitud es apropiada.

Resultado:

$t_{tabla} = 2,306$; para $9-1=8$ grados de libertad y $p=0,05$

$t_{exp} = -1,21$

Aptitud del sistema

La demostración de aptitud del sistema fue realizada de acuerdo con las indicaciones de la USP 38 para confirmar que el equipo era adecuado para efectuar los análisis. La prueba se llevó a cabo inyectando cinco replicados de una solución estándar conteniendo $0,10832 \text{ mg mL}^{-1}$ de HCT.

El correspondiente valor de DER fue menor al 2%, resultado satisfactorio de acuerdo con los requerimientos oficiales. El número de platos teóricos de la columna y el factor de coeol también fueron determinados, y sus correspondientes valores se listan en la Tabla A.19.

Tabla A.19 Hidroclorotiazida. Resultados de la aptitud del sistema

| Analito | Factor de coleo (t_r) | Platos teóricos (N) | DER (%)^a |
|----------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------|
| HCT | 1,25 | 4460 | 0,36 |

^a Cinco replicados

Selectividad

La selectividad del método fue establecida determinando la pureza de pico usando un detector con arreglo de diodos bajo las condiciones cromatográficas citadas.

Se encontró un valor de pureza de pico superior a 0,9982, evidenciando la aptitud del método para determinar inequívocamente el analito de interés, es decir sin interferencias.

Además, se inyectaron soluciones de la matriz de la formulación y un estándar de Hidroclorotiazida. No se observó la presencia de productos de degradación y los tiempos de retención para hidroclorotiazida en la formulación y la solución estándar fueron coincidentes

A.3.10.4 Gotas de Furosemida

Soluciones para CLAE

Soluciones madre

La solución madre de FURO fue preparada en un matraz aforado de 50,00 mL disolviendo una cantidad exactamente pesada (65,5 mg) de FURO en solución diluyente (ver condiciones cromatográficas), siendo la concentración final 1,31 mg mL⁻¹.

Soluciones de trabajo

Las soluciones de trabajo fueron preparadas inmediatamente antes de su uso, en matraces aforados de 10,00 mL, mediante diluciones apropiadas de la solución madre en solución diluyente. El rango de trabajo fue 0,0655-0,131 mg mL⁻¹.

Condiciones cromatográficas.

Determinación de Furosemida

El contenido de FURO fue determinado empleando la monografía oficial de la USP 38 para soluciones orales. La fase móvil está compuesta por una mezcla de agua, acetonitrilo y ácido acético glacial en una proporción 165:35:2. La solución diluyente está compuesta por una mezcla de los mismos componentes en una proporción 22:22:1. Se empleó una columna Luna Phenomenex CN de 250 x 4,6 mm, termostaticada a 30°C, con una velocidad de flujo de 2 mL min⁻¹ y detectado a 254 nm.

Validación del método cromatográfico

Linealidad y rango (intervalo de concentraciones de trabajo)

La linealidad del método propuesto fue evaluada analizando soluciones de trabajo a seis concentraciones. Teniendo en cuenta el propósito de la cuantificación, el rango lineal fue 0,0655-0,131 mg mL⁻¹

Este rango equivale al intervalo del 70 al 130% de la respuesta objetivo para el contenido promedio del analito en las formulaciones desarrolladas.

La Tabla A.20 resume los datos obtenidos de las áreas bajo la curva para cada de las concentraciones evaluadas, por triplicado. Además, se presentan los cálculos de x^*y , x^2 , y^2 y $f(x/y)$, necesarios para realizar la evaluación estadística de la linealidad.

a- Cálculo de la recta de regresión

Tabla A.20 Furosemida. Resultados de la linealidad del método

| | FURO (mg mL ⁻¹) | Área (mUA) | x*y | x ² | y ² | f(y/x) |
|------------------------------|--------------------------------|---------------|------------|----------------|----------------|-------------|
| | 0,0655 | 1827098 | 119674,91 | 0,00429025 | 3,33829E+12 | 27894625,95 |
| | 0,0655 | 1823225 | 119421,23 | 0,00429025 | 3,32415E+12 | 27835496,18 |
| | 0,0655 | 1822317 | 119361,76 | 0,00429025 | 3,32084E+12 | 27821633,59 |
| | 0,0917 | 2528201 | 231836,03 | 0,00840889 | 6,3918E+12 | 27570348,96 |
| | 0,0917 | 2533975 | 232365,50 | 0,00840889 | 6,42103E+12 | 27633315,16 |
| | 0,0917 | 2520932 | 231169,46 | 0,00840889 | 6,3551E+12 | 27491079,61 |
| | 0,1048 | 2862052 | 299943,04 | 0,01098304 | 8,19134E+12 | 27309656,49 |
| | 0,1048 | 2857748 | 299491,99 | 0,01098304 | 8,16672E+12 | 27268587,79 |
| | 0,1048 | 2863013 | 300043,76 | 0,01098304 | 8,19684E+12 | 27318826,34 |
| | 0,1179 | 3290258 | 387921,41 | 0,01390041 | 1,08258E+13 | 27907192,54 |
| | 0,1179 | 3299338 | 388991,95 | 0,01390041 | 1,08856E+13 | 27984206,96 |
| | 0,1179 | 3299845 | 389051,72 | 0,01390041 | 1,0889E+13 | 27988507,21 |
| | 0,131 | 3680550 | 482152,05 | 0,017161 | 1,35464E+13 | 28095801,53 |
| | 0,131 | 3682220 | 482370,82 | 0,017161 | 1,35587E+13 | 28108549,62 |
| | 0,131 | 3689667 | 483346,37 | 0,017161 | 1,36136E+13 | 28165396,95 |
| Sumatoria | 1,5327 | 42580439 | 4567142,06 | 0,16423077 | 1,27025E+14 | 416393224,9 |
| Promedio | | | | | | 27759548,32 |
| Desviación estándar | | | | | | 306317,9696 |
| Coefficiente de variación | | | | | | 1,103468853 |

De los datos obtenidos de la Tabla A.20, se obtienen los siguientes valores:

$$a = -61599,63964$$

$$b = 28384180,59$$

$$\text{Ecuación de la recta: } y = 28384180,59 x - 61599,63964$$

La Figura A.4 Representa la curva de calibración de Furosemida.

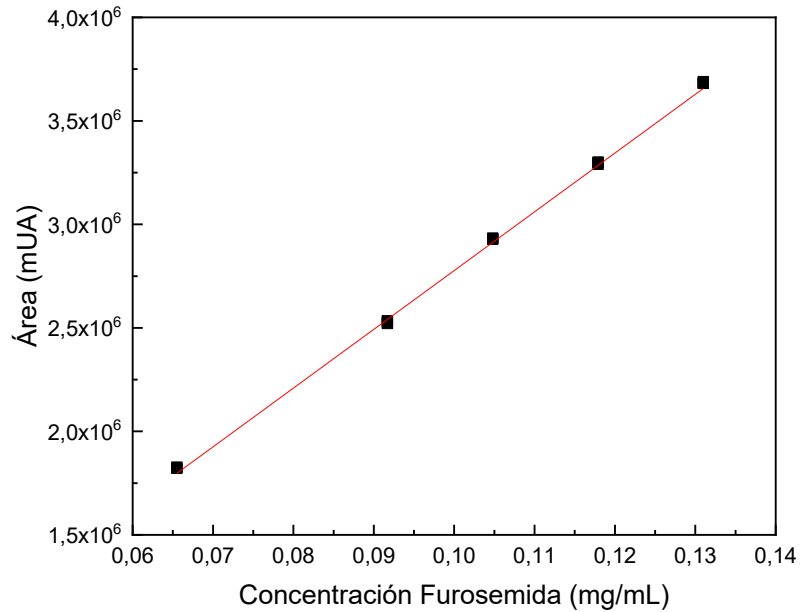


Figura A.4 Curva de calibración de Furosemida por CLAE

b- Interpretación estadística de la regresión lineal

Cálculo del coeficiente de correlación (r) (Mínimo 0,99)

Resultado: 0,9988

Coefficiente de determinación "r²" (Mínimo 0,98)

Resultado: 0,9977

Test estadístico para el coeficiente de correlación "r"

Resultados:

t_{tabla} : 2,12, para $18-2= 16$ grados de libertad y $p=0,05$

$t_{\text{regresión}}$: 83,30

Como $t_{\text{regresión}} > t_{\text{tabla}}$, si existe una correlación lineal significativa entre x e y ($r \neq 0$)

Límite de confianza del intercepto "a"

Resultado

$t_{\text{tabla}}= 2,12$ para $18-2 = 16$ grados de libertad y $p= 0,05$

Intervalo de confianza del intercepto "a"

$a= -61599,63964 \pm 2,12 \times 38925,02752$

$a= -145692,049$ hasta $22492,76977$

Determinación del test estadístico del intercepto "a"

Criterio de aceptación

Si $t_{\text{experimental}}$ es menor que t_{tabla} , según las condiciones mencionadas, existe una correlación lineal significativa.

Resultado:

$t_{\text{tabla}} = 2,12$ para $18-2 = 16$ grados de libertad y $p=0,05$

$t_{\text{experimental}} = 1,58$

Límite de confianza de la pendiente "b"

Intervalo de confianza de la pendiente "b"

$b = 28384180,59 \pm 2,12 \times 372003,729$

$b = 27580515,4$ hasta $29187845,79$

Determinación del test estadístico de la pendiente "b"

Criterio de aceptación:

Si $t_{\text{experimental}}$ es mayor que t_{tabla} , existe una correlación lineal significativa, entonces la pendiente "b" es significativamente diferente de cero y se rechaza la hipótesis nula

$t_{\text{tabla}} = 2,12$ para $18-2=16$ grados de libertad y $p= 0,05$

$t_{\text{experimental}} = 76,30$

Cálculo del coeficiente de variación (CV) de los factores de respuesta (f):

Resultados:

Promedio de "f": 27759548,32

Desviación estándar de "f": 306317,9696

Coeficiente de variación (CV): 1,10 %

Los parámetros calculados para evaluar la calidad de la regresión cumplen con los criterios de aceptación correspondientes, lo que indica que la técnica es lineal en el intervalo de concentraciones estudiado.

La Tabla A.21 resume los datos de validación con respecto a rango, linealidad, precisión y especificidad.

Tabla A.21 Furosemida. Resumen de los datos de validación del método cromatográfico

| Parámetros | Furosemida | |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| | Especificaciones | Resultado |
| Rango lineal (mg L ⁻¹) | | 65,5-131,0 |
| Linealidad-Ecuación de regresión | | |
| $b \pm SD_b$ (x 10 ⁸) | | 2,84 ± 0,03 |
| $a \pm SD_a$ (x 10 ⁵) | | -6,16 ± 3,89 |
| Coefficiente de correlación (r) | Mínimo 0,99 | 0,9988 |
| Coefficiente de determinación (r ²) | Mínimo 0,98 | 0,9977 |
| Test estadístico para el "r" | $t_{\text{tabla}} = 2,12$ | $t_{\text{regresión}} = 83,30$ |
| $p = 0,05$ y n-2 grados de libertad | $t_{\text{regresión}} \gg t_{\text{tabla}}$ | |
| Coefficiente de variación (%) | Máximo 5% | 1,10% |
| Prueba de linealidad de la pendiente $p = 0,05$ y n-2 grados de libertad | $t_{\text{tabla}} = 2,12$ $t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}}$ | $t_{\text{exp}} = 76,30$ |
| Prueba de proporcionalidad del intercepto $p = 0,05$ y n-2 grados de libertad | $t_{\text{tabla}} = 2,12$ $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$ | $t_{\text{exp}} = 1,58$ |
| Precisión | | |
| Repetibilidad (Rec., % ± DER, n=6) | | |
| Nivel medio (100%) | | 99,8 ± 0,2 |
| Precisión intermedia (Rec., % ± DER) | | |
| Nivel bajo (90%) | | 100,1 ± 0,4 |
| Nivel medio (100%) | | 100,2 ± 0,2 |
| Nivel alto (110%) | | 99,8 ± 0,5 |
| Recuperación global (% ± DER) | | 100,1 ± 0,3 |
| ANOVA- $F_{\text{entre días}}$ | $F_{(0,95; 2; 17)} = 3,124$ | $F = 1,739$ |
| ANOVA- $F_{\text{entre analistas}}$ | $F_{(0,95; 2; 17)} = 3,124$ | $F = 2,818$ |
| Especificidad (Pureza de pico) | > 0,95 | 0,9963 |

La precisión fue evaluada a dos niveles, repetibilidad y precisión intermedia. Para determinar repetibilidad, se realizaron 6 inyecciones al nivel del 100% (0,10304 mg mL⁻¹). La recuperación promedio fue de 99,8%, con un DER menor al 2%.

Para la determinación intermedia del método, se analizaron nueve muestras independientes conteniendo FURO a tres niveles, 90, 100 y 110%, por tres analistas diferentes durante tres días. La prueba ANOVA aplicada a los resultados obtenidos, reveló que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos entre los distintos días y analistas. En todos los casos, las desviaciones estándares relativas fueron menores al 2%, confirmando la precisión del método.

Los valores del cociente *F* observados, inferiores a los valores críticos, confirmaron la precisión intermedia del método.

Exactitud

La exactitud se evaluó midiendo la recuperación del analito por el método de adición de estándar sobre las dos matrices optimizadas empleando la formulación que contiene 2 mg mL⁻¹. Cantidades conocidas del analito fueron agregadas a una muestra de gotas pre-analizada con el método CLAE, conteniendo el equivalente al 80% de lo declarado, a fin de obtener muestras fortificadas con concentraciones correspondientes al 90, 100 y 110%. Cada una de las muestras fueron inyectadas tres veces. Los resultados de exactitud, expresados como porcentaje de analito recuperado en el ensayo y el correspondiente sesgo para la exactitud determinada en la matriz 1(10% glicerina y 10% y en la matriz 2 (HPMC 0,5 % p/v), se muestran en las Tablas A.22 y A.23, donde el sesgo se calculó como la diferencia entre el porcentaje de analito efectivamente recuperado y el valor teórico (100%).

Tabla A.22 Furosemida. Resultados de la determinación de la exactitud del método con matriz 1

| Concentración (mg mL ⁻¹) | | | | RSD (%) n=3 | Recuperación de analito (%) | Sesgo (%) |
|--------------------------------------|----------|--------|------------|----------------|--------------------------------|--------------|
| Inicial | Agregado | Total | Encontrado | | | |
| 0,078 | 0,00 | 0,078 | 0,079 | 0,33 | 101,3 | +1,3 |
| 0,078 | 0,0106 | 0,0886 | 0,089 | 0,41 | 100,45 | +0,45 |
| 0,078 | 0,0201 | 0,0981 | 0,0978 | 0,37 | 99,32 | -0,68 |
| 0,078 | 0,0330 | 0,111 | 0,1111 | 0,28 | 100,78 | +0,78 |

Tabla A.23 Furosemida. Resultados de la determinación de la exactitud del método con matriz 2

| Concentración (mg mL ⁻¹) | | | | RSD (%) n=3 | Recuperación de analito (%) | Sesgo (%) |
|--------------------------------------|----------|--------|------------|----------------|--------------------------------|--------------|
| Inicial | Agregado | Total | Encontrado | | | |
| 0,083 | 0,00 | 0,083 | 0,0835 | 0,36 | 100,6 | +0,6 |
| 0,083 | 0,0103 | 0,0933 | 0,0925 | 0,39 | 99,14 | -0,86 |
| 0,083 | 0,0185 | 0,1015 | 0,1022 | 0,41 | 100,69 | +0,69 |
| 0,083 | 0,0316 | 0,1146 | 0,1151 | 0,37 | 100,43 | +0,43 |

Evaluación estadística

La Tabla A.24 resume los parámetros estadísticos para determinar la exactitud cuando se empleó la Matriz 1.

Tabla A.24 Furosemida. Análisis estadísticos de la exactitud del método empleando la Matriz 1

| Análisis estadístico | |
|-------------------------------------------------|--------|
| Nº de muestras (n) | 9 |
| Recuperación promedio (R) (90-110%) | 100,18 |
| Desviación estándar (S) | 0,76 |
| Desvío estándar relativo (DER) (Máximo 5,0%) | 0,75 |

Cálculo de "t" de Student

Criterio de aceptación:

Si t_{exp} es menor que t_{tabla} , no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100% y la exactitud es apropiada.

Resultado:

$t_{tabla} = 2,306$; para $9-1=8$ grados de libertad y $p=0,05$

$t_{exp} = 2,11$

La Tabla A.25 resume los parámetros estadísticos para determinar la exactitud cuando se empleó la Matriz 2

Tabla A. 25 Furosemida. Análisis estadísticos de la exactitud del método empleando la Matriz 2

| Análisis estadístico | |
|-------------------------------------------------|--------|
| Nº de muestras (n) | 9 |
| Recuperación promedio (R) (90-110%) | 100,08 |
| Desviación estándar (S) | 0,83 |
| Desvío estándar relativo (DER) (Máximo 5,0%) | 0,83 |

Cálculo de "t" de Student

Resultado:

$t_{tabla} = 2,306$; para $9-1=8$ grados de libertad y $p=0,05$

$t_{exp} = 0,87$

Aptitud del sistema

La demostración de aptitud del sistema fue realizada de acuerdo con las indicaciones de la USP 38 para confirmar que el equipo era adecuado para efectuar los análisis. La prueba se llevó a cabo inyectando cinco replicados de una solución estándar conteniendo $0,10304 \text{ mg mL}^{-1}$ de FURO.

El correspondiente valor de DER fue menor al 2%, resultado satisfactorio de acuerdo con los requerimientos oficiales. El número de platos teóricos de la columna y el factor de coleo también fueron determinados, y sus correspondientes valores se listan en la Tabla A.26.

Tabla A. 26 Furosemida. Resultados de la aptitud del sistema

| Analito | Factor de coleo (t_f) | Platos teóricos (N) | DER (%)^a |
|----------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------|
| FURO | 1,35 | 5420 | 0,58 |

^a Cinco replicados

Selectividad

La selectividad del método fue establecida determinando la pureza de pico usando un detector con arreglo de diodos bajo las condiciones cromatográficas citadas.

Se encontró un valor de pureza de pico superior a 0,9982, evidenciando la aptitud del método para determinar inequívocamente el analito de interés, es decir sin interferencias.

Además, se inyectaron soluciones de la matriz de la formulación y un estándar de Furosemida. No se observó la presencia de productos de degradación y los tiempos de retención para Furosemida en la formulación y la solución estándar fueron coincidentes.

Determinación del contenido de Furosemida empleando espectroscopia UV

Solución madre

La solución madre se preparó pesando 65,9 mg de FURO en un vaso de precipitado. Se incorporaron 30 mL de NaOH 0,1 N. Se agitó hasta disolución completa y se ajustó el pH a 7 agregando gota a gota ácido fosfórico 10% v/v. El NaOH y el ácido fosfórico fueron preparados con agua conservada (conteniendo metil y propilparabeno).

Esta solución se trasvasó a un matraz de 50 mL y se completó a volumen con agua conservada.

Soluciones de trabajo

Las soluciones de trabajo fueron preparadas inmediatamente antes de su uso, en matraces aforados de 10,00 mL, mediante diluciones apropiadas de la solución madre con agua conservada. El rango de trabajo fue 0,0659-0,1318 mg mL⁻¹.

Desarrollo del método espectroscópico

En este caso, debemos considerar varios factores que pueden influir en este método. Hay que tener en cuenta que ésta no es una técnica separativa como lo es CLAE, por lo que debe evaluarse la influencia en la absorción total de todos los componentes de la matriz además del ingrediente activo. Por tal motivo, la solución madre fue preparada con agua conservada.

Se realizaron mediciones de los espectros de absorción de la mezcla Gli (10%v/v)-Sor (10% v/v) de la matriz 1, HPMC 0,5% p/v de la matriz 2, NaOH 0,1 N todas disueltas en agua conservada y una solución de FURO 0,10 mg mL⁻¹ disuelta en NaOH 0,1 N.

La solución de FURO mostró 3 máximos a 228, 270 y 330 nm. Cuando se realizan las mediciones de las matrices y NaOH, se observó que la presencia de metil y propilparabeno interfería en la absorbancia de FURO, sin posibilidades de poder emplear las longitudes de onda de 228 y 270 nm. Por tal motivo, se evaluó la posibilidad de utilizar el tercer máximo de absorción, es decir, 330 nm.

Para determinar la linealidad del método, se midieron las absorbancias de las soluciones de trabajo a seis concentraciones dentro del rango 0,0659- 0,1318 mg mL⁻¹, a 330 nm.

La Tabla A.27 resume los datos obtenidos de las absorbancias para cada de las concentraciones, por triplicado. Además, se presentan los cálculos de x^*y , x^2 , y^2 y $f(x/y)$, necesarios para realizar la evaluación estadística de la linealidad.

a- Cálculo de la recta de regresión

Tabla A. 27 Furosemida. Resultados de la linealidad del método UV

| | FURO (mg mL ⁻¹) | Absorbancia (UA) | x*y | x ² | y ² | f(y/x) |
|---------------------------|--------------------------------|---------------------|--------|----------------|----------------|---------|
| | 0,0659 | 0,987 | 0,0650 | 0,0043 | 0,9741 | 14,9772 |
| | 0,0659 | 0,989 | 0,0651 | 0,0043 | 0,9781 | 15,0075 |
| | 0,0659 | 0,984 | 0,0648 | 0,0043 | 0,9682 | 14,9317 |
| | 0,0790 | 1,185 | 0,0937 | 0,0062 | 1,4042 | 14,9848 |
| | 0,0790 | 1,193 | 0,0943 | 0,0062 | 1,4232 | 15,0859 |
| | 0,0790 | 1,215 | 0,0960 | 0,0062 | 1,4762 | 15,3641 |
| | 0,0922 | 1,433 | 0,1322 | 0,0085 | 2,0534 | 15,5321 |
| | 0,0922 | 1,383 | 0,1273 | 0,0085 | 1,9126 | 14,9902 |
| | 0,0922 | 1,382 | 0,1275 | 0,0085 | 1,9099 | 14,9794 |
| | 0,1054 | 1,587 | 0,1673 | 0,0111 | 2,5185 | 15,0512 |
| | 0,1054 | 1,608 | 0,1695 | 0,0111 | 2,5856 | 15,2503 |
| | 0,1054 | 1,614 | 0,1701 | 0,0111 | 2,6049 | 15,3072 |
| | 0,1186 | 1,778 | 0,2109 | 0,0141 | 3,1612 | 14,9890 |
| | 0,1186 | 1,773 | 0,2103 | 0,0141 | 3,1435 | 14,9468 |
| | 0,1186 | 1,776 | 0,2106 | 0,0141 | 3,1541 | 14,9721 |
| | 0,1318 | 1,985 | 0,2616 | 0,0174 | 3,9402 | 15,0606 |
| | 0,1318 | 1,993 | 0,2626 | 0,0174 | 3,9720 | 15,1213 |
| | 0,1318 | 1,989 | 0,2621 | 0,0174 | 3,9561 | 15,0910 |
| Sumatoria | 1,9111 | 28,843 | 0,2621 | 0,1855 | 3,9561 | 286,735 |
| Promedio | | | | | | 15,0913 |
| Desviación estándar | | | | | | 0,1614 |
| Coefficiente de variación | | | | | | 1,070 |

De los datos obtenidos de la tabla A.27, se obtienen los siguientes valores:

$$a = 0,002746$$

$$b = 15,0646$$

Ecuación de la recta: $y = 15,0646 x + 0,002746$

La Figura A.5 Representa la curva de calibración de Furosemida

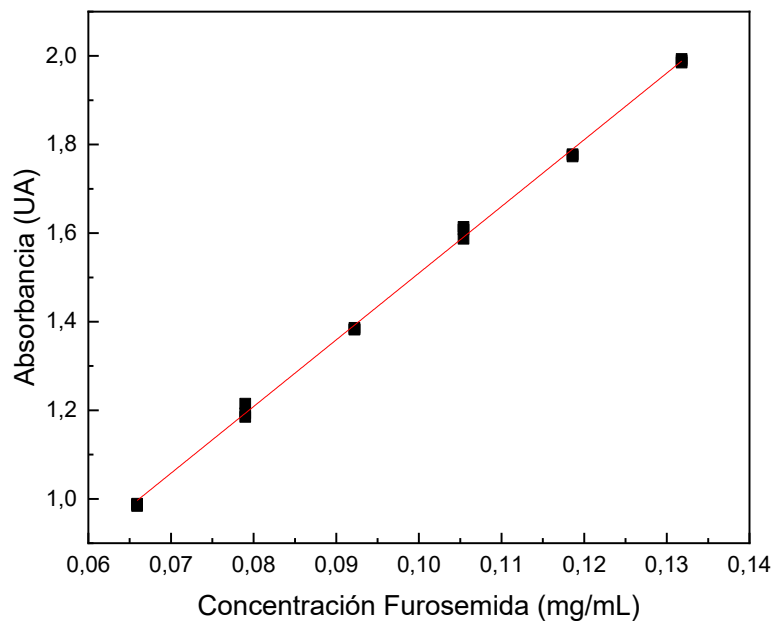


Figura A. 5 Curva de calibración de Furosemida por UV

c- Interpretación estadística de la regresión lineal

Cálculo del coeficiente de correlación (r) (Mínimo 0,99)

Resultado: 0,9990

Coeficiente de determinación "r²" (Mínimo 0,98)

Resultado: 0,9980

Interpretación: El 99,80% de las variaciones se deben a la influencia de la variable "x" (concentración inyectada).

Test estadístico para el coeficiente de correlación "r"

Criterio de aceptación: Si el valor observado de tregresión es mayor a t_{tabla}, la hipótesis nula se rechaza, existiendo una correlación lineal significativa, por lo tanto, r es cercano a 1.

Resultados:

t_{tabla}: 2,12, para 18-2= 16 grados de libertad y p=0,05

t_{regresión}: 89,35

Como t_{regresión} > t_{tabla}, si existe una correlación lineal significativa entre x e y (r ≠ 0).

Límite de confianza del intercepto “a”

Resultado

$t_{\text{tabla}} = 2,12$ para $18-2 = 16$ grados de libertad y $p = 0.05$

Intervalo de confianza del intercepto “a”

$a = 0,002746 \pm 2,12 \times 0,01692$

$a = -0,033128494$ hasta $0,038620558$

El intervalo de confianza del intercepto “a” incluye el cero.

Determinación del test estadístico del intercepto “a”

Criterio de aceptación

Si $t_{\text{experimental}}$ es menor que t_{tabla} , según las condiciones mencionadas, existe una correlación lineal significativa.

Resultado:

$t_{\text{tabla}} = 2,12$ para $18-2 = 16$ grados de libertad y $p = 0,05$

$t_{\text{experimental}} = 0,1623$

Límite de confianza de la pendiente “b”

Resultado

$t_{\text{tabla}} = 2,12$ para $18-2 = 16$ grados de libertad y $p = 0,05$

Intervalo de confianza de la pendiente “b”

$b = 15,0646 \pm 2,12 \times 0,1669$

$b = 14,7108$ hasta $15,4185$

Determinación del test estadístico de la pendiente “b”

Criterio de aceptación:

Si $t_{\text{experimental}}$ es mayor que t_{tabla} , existe una correlación lineal significativa, entonces la pendiente “b” es significativamente diferente de cero y se rechaza la hipótesis nula

$t_{\text{tabla}} = 2,12$ para $18-2=16$ grados de libertad y $p = 0,05$

$t_{\text{experimental}} = 90,25$

Cálculo del coeficiente de variación (CV) de los factores de respuesta (f):

Resultados:

Promedio de "f": 15,0913

Desviación estándar de "f": 0,1614

Coefficiente de variación (CV): 1,07 %.

Los parámetros calculados para evaluar la calidad de la regresión cumplen con los criterios de aceptación correspondientes, lo que indica que la técnica es lineal en el intervalo de concentraciones estudiado.

La precisión del ensayo se realizó por repetibilidad (dentro del día) y precisión intermedia (entre días). La repetibilidad se evaluó analizando seis muestras conteniendo 0,10544 mg mL⁻¹ de FURO y durante el mismo día. La recuperación obtenida fue de 100,3 % con un DER de 0,4%.

Para determinar la exactitud, cantidades conocidas del analito fueron agregadas a una muestra de gotas pre-analizada con el método UV, conteniendo el equivalente al 80% de lo declarado, a fin de obtener muestras fortificadas con concentraciones correspondientes al 90, 100 y 110%. Cada una de las muestras fueron evaluadas por triplicado. Los resultados de exactitud, expresados como porcentaje de analito recuperado mostraron un promedio global de 100,52%, con una DER de 0,65%, demostrando la exactitud del método

La especificidad se obtuvo mediante los espectros de absorción de una solución estándar de FURO y los obtenidos por los excipientes empleados en las formulaciones.

La precisión intermedia se determinó analizando nueve muestras independientes de estándares conteniendo el analito a tres niveles, 90, 100 y 110 %, por tres analistas diferentes durante tres días. Una prueba ANOVA aplicada a los resultados obtenidos, reveló que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos entre los distintos días y analistas (Tabla A.28). En todos los casos, las desviaciones estándares relativas fueron menores al 2%, confirmando la precisión del método. Los valores del cociente F observados, inferiores a los valores críticos, confirmaron la precisión intermedia del método.

Tabla A.28 Furosemida. Resumen resultados de la validación del método UV

| Parámetros | Furosemida |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| Rango lineal (mg L ⁻¹) | 65,9-131,8 |
| Linealidad-Ecuación de regresión | |
| <i>b</i> ± DE | 15,064 ± 0,167 |
| <i>a</i> ± DE | 0,0027 ± 0,017 |
| <i>r</i> (<i>n</i> =18) | 0,9990 |
| Precisión | |
| Repetibilidad (Rec., % ± SD, <i>n</i> = 6) | |
| Nivel medio (100%) | 100,3 ± 0,4 |
| Precisión intermedia (Rec., % ± SD) | |
| Nivel bajo (90%) | 100,3 ± 0,4 |
| Nivel medio (100%) | 100,6 ± 0,5 |
| Nivel alto (110%) | 100,5 ± 0,3 |
| Recuperación global (% ± RSD) | 100,3 ± 0,3 |
| ANOVA- <i>F</i> _{entre días} (<i>F</i> _(0,95; 2; 17) =3,124) | 1,475 |
| ANOVA- <i>F</i> _{entre analistas} (<i>F</i> _(0,95; 2; 17) =3,124) | 2,718 |

A.3.10.5 Gotas de Maleato de Enalapril

Soluciones para CLAE

Soluciones madre

La solución madre de ENA fue preparada en un matraz aforado de 50,00 mL disolviendo una cantidad exactamente pesada (64,7 mg) de ENA en fase móvil, siendo la concentración final 1,294 mg mL⁻¹.

Soluciones de trabajo

Las soluciones de trabajo fueron preparadas inmediatamente antes de su uso, en matraces aforados de 10,00 mL, mediante diluciones apropiadas de la solución madre en fase móvil. El rango de trabajo fue 0,0647-0,1294 mg mL⁻¹.

Condiciones cromatográficas.

Determinación de Maleato de Enalapril

Para determinar enalapril en los estudios de estabilidad química iniciales y para las muestras conteniendo propionato de calcio como conservante, se empleó el método publicado en la farmacopea americana (USP 38) para la valoración de comprimidos (Método 1). Las condiciones cromatográficas son las siguientes: fase móvil: solución buffer de fosfato monobásico de sodio (10 mM, pH= 2,2) en una proporción 75:25, la columna, Luna C8, de 4,6 mm × 25 cm (Phenomenex, Inc., Torrance, EEUU), termostaticada a 50°C, volumen de inyección, 50 µL, flujo de 2 mL min⁻¹. La detección se llevó a cabo a 215 nm.

Para la determinación de enalapril en las muestras conteniendo benzoato de sodio y metil y propilparabeno, las condiciones cromatográficas de la farmacopea americana fueron modificadas: fase móvil: solución buffer de fosfato monobásico de sodio (10 mM, pH= 2,2) en una proporción 80:20, la columna, Luna C8, de 4,6 mm × 25 cm (Phenomenex, Inc., Torrance, EEUU), termostaticada a 50°C, volumen de inyección, 50 µL, flujo de 1,5 mL min⁻¹. La detección se llevó a cabo a 215 nm. (Método 2)

Validación del método cromatográfico

Linealidad y rango (intervalo de concentraciones de trabajo)

Las mismas soluciones de trabajo fueron empleadas en la validación de ambos métodos cromatográficos. Se analizaron las soluciones de trabajo a seis concentraciones. Teniendo en cuenta el propósito de la cuantificación, el rango lineal fue 0,0647-0,1294 mg mL⁻¹. Este rango equivale al intervalo del 70 al 130% de la respuesta objetivo para el contenido promedio de los analitos en las formulaciones desarrolladas.

Evaluación estadística Método 1

a- Cálculo de la recta de regresión

Tabla A.29 Maleato de enalapril. Resultados de la linealidad del método 1

| | ENA (mg mL ⁻¹) | Área (mUA) | x*y | x ² | y ² | f(y/x) |
|---------------------------|----------------------------|------------|-------------|----------------|----------------|-------------|
| | 0,0647 | 3640866 | 235564,03 | 0,00418609 | 1,32559E+13 | 56273044,82 |
| | 0,0647 | 3694939 | 239062,55 | 0,00418609 | 1,36526E+13 | 57108794,44 |
| | 0,0647 | 3665186 | 237137,53 | 0,00418609 | 1,34336E+13 | 56648933,54 |
| | 0,07764 | 4394842 | 341215,53 | 0,00602797 | 1,93146E+13 | 56605383,82 |
| | 0,07764 | 4430774 | 344005,29 | 0,00602797 | 1,96318E+13 | 57068186,5 |
| | 0,07764 | 4421027 | 343248,53 | 0,00602797 | 1,95455E+13 | 56942645,54 |
| | 0,09058 | 5055122 | 457892,95 | 0,008204736 | 2,55543E+13 | 55808368,29 |
| | 0,09258 | 5129251 | 474866,05 | 0,008571056 | 2,63092E+13 | 55403445,67 |
| | 0,09058 | 5166055 | 467941,26 | 0,008204736 | 2,66881E+13 | 57033064,69 |
| | 0,10352 | 5897605 | 610520,06 | 0,01071639 | 3,47817E+13 | 56970681,99 |
| | 0,10352 | 5915898 | 612413,76 | 0,01071639 | 3,49978E+13 | 57147391,81 |
| | 0,10352 | 5906345 | 611424,83 | 0,01071639 | 3,48849E+13 | 57055110,12 |
| | 0,11646 | 6781900 | 789820,07 | 0,013562932 | 4,59942E+13 | 58233728,32 |
| | 0,11646 | 6725606 | 783264,07 | 0,013562932 | 4,52338E+13 | 57750352,05 |
| | 0,11646 | 6815591 | 793743,72 | 0,013562932 | 4,64523E+13 | 58523020,78 |
| | 0,1294 | 7362025 | 952646,03 | 0,01674436 | 5,41994E+13 | 56893547,14 |
| | 0,1294 | 7311862 | 946154,94 | 0,01674436 | 5,34633E+13 | 56505888,72 |
| | 0,1294 | 7333648 | 948974,05 | 0,01674436 | 5,37824E+13 | 56674250,39 |
| Sumatoria | 1,7489 | 99648542 | 10189895,32 | 0,178693754 | 5,81175E+14 | 1024645839 |
| Promedio | | | | | | 56924768,81 |
| Desviación estándar | | | | | | 747045,81 |
| Coefficiente de variación | | | | | | 1,31 |

De los datos obtenidos de la Tabla A.29, se obtienen los siguientes valores:

$$a = -92094,59833$$

$$b = 57925693,16$$

Ecuación de la recta: $y = 57925693,16 x - 92094,59833$

La Figura A.6 Representa la curva de calibración de Enalapril.

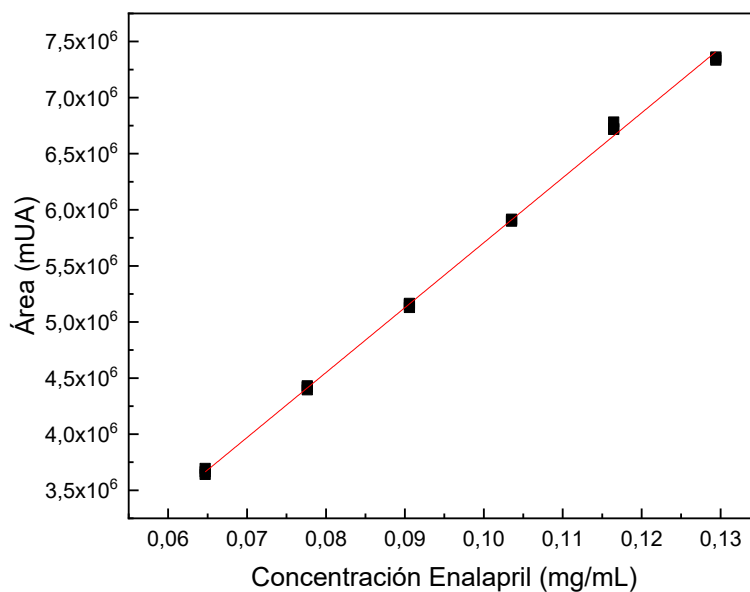


Figura A. 6 Curva de calibración de Enalapril por CLAE

b- Interpretación estadística de la regresión lineal

Cálculo del coeficiente de correlación (r) (Mínimo 0,99)

Resultado: 0,9983

Coefficiente de determinación "r²" (Mínimo 0,98)

Resultado: 0,9967

Test estadístico para el coeficiente de correlación "r"

Criterio de aceptación: Si el valor observado de tregresión es mayor a t_{tabla} , la hipótesis nula se rechaza, existiendo una correlación lineal significativa, por lo tanto, r es cercano a 1.

Resultados:

t_{tabla} : 2,12, para $18-2= 16$ grados de libertad y $p=0,05$

$t_{\text{regresión}}$: 69,51

Como $t_{\text{regresión}} > t_{\text{tabla}}$, si existe una correlación lineal significativa entre x e y ($r \neq 0$)

Límite de confianza del intercepto "a"

Resultado

$t_{\text{tabla}}= 2,12$ para $18-2 = 16$ grados de libertad y $p= 0.05$

Intervalo de confianza del intercepto "a"

$$a = -92094,59833 \pm 2,12 \times 82308,83643$$

$$a = -266581,5368 \text{ hasta } 82392,34019$$

Determinación del test estadístico del intercepto "a"

Criterio de aceptación

Si $t_{\text{experimental}}$ es menor que t_{tabla} , según las condiciones mencionadas, existe una correlación lineal significativa.

Resultado:

$$t_{\text{tabla}} = 2,12 \quad \text{para } 18-2 = 16 \text{ grados de libertad y } p=0,05$$

$$t_{\text{experimental}} = -1,11$$

Límite de confianza de la pendiente "b"

Resultado

$$t_{\text{tabla}} = 2,12 \quad \text{para } 18-2 = 16 \text{ grados de libertad y } p= 0,05$$

Intervalo de confianza de la pendiente "b"

$$b = 57925693,16 \pm 2,12 \times 826091,2622$$

$$b = 56174457,92 \text{ hasta } 59676928,41$$

Determinación del test estadístico de la pendiente "b"

Criterio de aceptación:

Si $t_{\text{experimental}}$ es mayor que t_{tabla} , existe una correlación lineal significativa, entonces la pendiente "b" es significativamente diferente de cero y se rechaza la hipótesis nula

$$t_{\text{tabla}} = 2,12 \quad \text{para } 18-2=16 \text{ grados de libertad y } p= 0,05$$

$$t_{\text{experimental}} = 70,12$$

Cálculo del coeficiente de variación (CV) de los factores de respuesta (f):

Criterio de aceptación:

Resultados:

$$\text{Promedio de "f": } 56924768,81$$

$$\text{Desviación estándar de "f": } 747045,8135$$

Coefficiente de variación (CV): 1,31 %

Los parámetros calculados para evaluar la calidad de la regresión cumplen con los criterios de aceptación correspondientes, lo que indica que la técnica es lineal en el intervalo de concentraciones estudiado.

Evaluación estadística Método 2

a- Cálculo de la recta de regresión

Tabla A.30 Maleato de enalapril. Resultados de la linealidad del método 2

| | ENA (mg mL ⁻¹) | Área (mUA) | x*y | x ² | y ² | f(y/x) |
|---------------------------|-------------------------------|---------------|-------------|----------------|----------------|-------------|
| | 0,0647 | 4296580 | 277988,72 | 0,00418609 | 1,84606E+13 | 66407727,98 |
| | 0,0647 | 4253394 | 275194,59 | 0,00418609 | 1,80914E+13 | 65740247,3 |
| | 0,0647 | 4227018 | 273488,06 | 0,00418609 | 1,78677E+13 | 65332581,14 |
| | 0,07764 | 5190288 | 402973,96 | 0,00602797 | 2,69391E+13 | 66850695,52 |
| | 0,07764 | 5138601 | 398960,98 | 0,00602797 | 2,64052E+13 | 66184969,09 |
| | 0,07764 | 5025948 | 390214,60 | 0,00602797 | 2,52602E+13 | 64734003,09 |
| | 0,09058 | 5733037 | 519298,49 | 0,008204736 | 3,28677E+13 | 63292525,94 |
| | 0,09258 | 5748000 | 532149,84 | 0,008571056 | 3,30395E+13 | 62086843,81 |
| | 0,09058 | 5766932 | 522368,70 | 0,008204736 | 3,32575E+13 | 63666725,55 |
| | 0,10352 | 6457587 | 668489,40 | 0,01071639 | 4,17004E+13 | 62380090,8 |
| | 0,10352 | 6466629 | 669425,43 | 0,01071639 | 4,18173E+13 | 62467436,24 |
| | 0,10352 | 6476602 | 670457,83 | 0,01071639 | 4,19464E+13 | 62563775,12 |
| | 0,11646 | 7355451 | 856615,82 | 0,013562932 | 5,41027E+13 | 63158603,81 |
| | 0,11646 | 7349587 | 855932,90 | 0,013562932 | 5,40164E+13 | 63108251,76 |
| | 0,11646 | 7364757 | 857699,60 | 0,013562932 | 5,42396E+13 | 63238511,08 |
| | 0,1294 | 8444769 | 1092753,10 | 0,01674436 | 7,13141E+13 | 65260966 |
| | 0,1294 | 8495914 | 1099371,27 | 0,01674436 | 7,21806E+13 | 65656213,29 |
| | 0,1294 | 8486446 | 1098146,11 | 0,01674436 | 7,20198E+13 | 65583044,82 |
| Sumatoria | 1,7489 | 112277540 | 11461529,46 | 0,178693754 | 7,35526E+14 | 1157713212 |
| Promedio | | | | | | 64317400,69 |
| Desviación estándar | | | | | | 1580335,387 |
| Coefficiente de variación | | | | | | 2,45 |

De los datos obtenidos de la tabla A.30, se obtienen los siguientes valores:

$$a = 115475,58$$

$$b = 63010452,03$$

Ecuación de la recta: $y = 63010452,03 x - 115475,58$

La Figura A.7 Representa la curva de calibración de Enalapril.

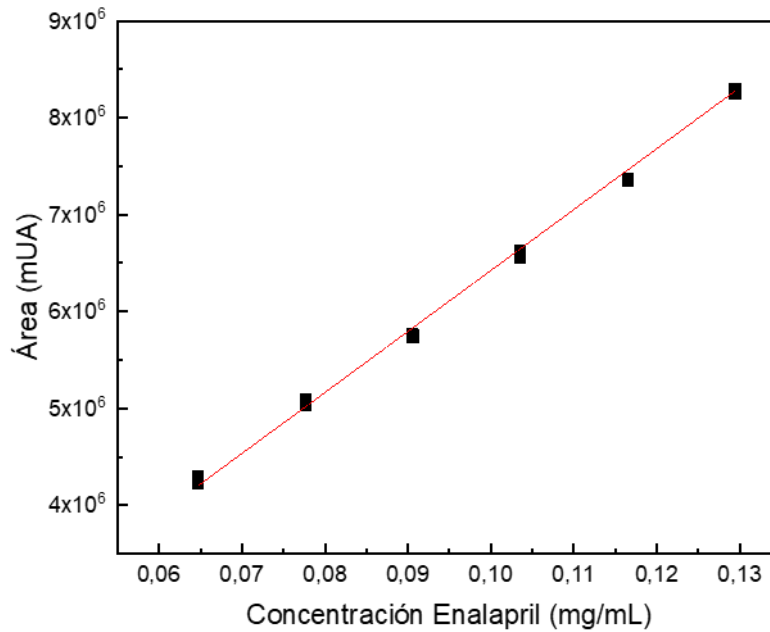


Figura A.7 Curva de calibración de Enalapril por CLAE

b- Interpretación estadística de la regresión lineal

Cálculo del coeficiente de correlación (r) (Mínimo 0,99)

Resultado: 0,9948

Coefficiente de determinación "r²" (Mínimo 0,98)

Resultado: 0,9896

Test estadístico para el coeficiente de correlación "r"

Resultado:

t_{tabla} : 2,12, para $18-2= 16$ grados de libertad y $p=0,05$

$t_{\text{regresión}}$: 39,02

Como $t_{\text{regresión}} > t_{\text{tabla}}$, si existe una correlación lineal significativa entre x e y ($r \neq 0$)

Límite de confianza del intercepto “a”

Resultado

 $t_{\text{tabla}} = 2,12$ para $18-2 = 16$ grados de libertad y $p = 0.05$ *Intervalo de confianza del intercepto “a”* $a = 115475,5807 \pm 2,12 \times 160627,0577$ $a = -225038,5702$ hasta $455989,7316$ *Determinación del test estadístico del intercepto “a”*

Criterio de aceptación

Si $t_{\text{experimental}}$ es menor que t_{tabla} , según las condiciones mencionadas, existe una correlación lineal significativa.

Resultado:

 $t_{\text{tabla}} = 2,12$ para $18-2 = 16$ grados de libertad y $p = 0,05$ $t_{\text{experimental}} = 0,72$ **Límite de confianza de la pendiente “b”**

Resultado

 $t_{\text{tabla}} = 2,12$ para $18-2 = 16$ grados de libertad y $p = 0,05$ *Intervalo de confianza de la pendiente “b”* $b = 63010452,03 \pm 2,12 \times 1612130,782$ $b = 59592887,44$ hasta $66428016,61$ *Determinación del test estadístico de la pendiente “b”*

Criterio de aceptación:

Si $t_{\text{experimental}}$ es mayor que t_{tabla} , existe una correlación lineal significativa, entonces la pendiente “b” es significativamente diferente de cero y se rechaza la hipótesis nula

 $t_{\text{tabla}} = 2,12$ para $18-2 = 16$ grados de libertad y $p = 0,05$ $t_{\text{experimental}} = 39,08$

Cálculo del coeficiente de variación (CV) de los factores de respuesta (f):

Resultados:

Promedio de "f": 64317400,69

Desviación estándar de "f": 1580335,387

Coefficiente de variación (CV): 2,46 %

Los parámetros calculados para evaluar la calidad de la regresión cumplen con los criterios de aceptación correspondientes, lo que indica que la técnica es lineal en el intervalo de concentraciones estudiado.

Precisión

La precisión fue determinada a dos niveles, repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad fue evaluada mediante el análisis estadístico de las desviaciones estándares relativas para seis inyecciones de una solución conteniendo 0,10352 mg mL⁻¹ de concentración del analito, correspondiente al 100% del valor nominal, con DER menores al 2% en ambos casos.

La precisión intermedia se determinó analizando nueve muestras independientes de estándares conteniendo el analito a tres niveles, 90, 100 y 110 %, por tres analistas diferentes durante tres días. Una prueba ANOVA aplicada a los resultados obtenidos, reveló que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos entre los distintos días y analistas (Tabla A.31). En todos los casos, las desviaciones estándares relativas fueron menores al 2%, confirmando la precisión del método.

Los valores del cociente F observados, inferiores a los valores críticos, confirmaron la precisión intermedia del método.

Los resultados que representan el área bajo la curva frente a la concentración de los analitos para ambos métodos, incluyendo las ecuaciones de la calibración y los coeficientes de correlación obtenidos para Enalapril, se muestran en la Tabla A.31. Se demostraron excelentes correlaciones dentro del rango de concentraciones estudiadas.

Tabla A.31 Maleato de enalapril. Resumen de los datos de validación de los métodos 1 y 2

| Parámetros | Maleato de enalapril | | |
|-------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | Especificaciones | Método 1 | Método 2 |
| Rango lineal (mg L ⁻¹) | | 64,7-129,4 | 64,7-129,4 |
| Linealidad-Ecuación de regresión | | | |
| $b \pm SD_b$ (x 10 ⁸) | | 5,79 ± 0,08 | 6,30 ± 0,16 |
| $a \pm SD_a$ (x 10 ⁵) | | -0,92 ± 8,23 | 1,15 ± 1,60 |
| Coefficiente de correlación (r) | Mínimo 0,99 | 0,9983 | 0,9948 |
| Coefficiente de determinación (r ²) | Mínimo 0,98 | 0,9967 | 0,9896 |
| Test estadístico para el "r" | t _{tabla} = 2,12 | t _{regresión} = 69,51 | t _{regresión} = 39,02 |
| p= 0,05 y n-2 grados de libertad | t _{regresión} >> t _{tabla} | | |
| Coefficiente de variación (%) | Máximo 5% | 1,31% | 2,46% |
| Prueba de linealidad de la pendiente | t _{tabla} = 2,12 | t _{exp} = 70,12 | t _{exp} = 39,08 |
| p=0,05 y n-2 grados de libertad | t _{exp} > t _{tabla} | | |
| Prueba de proporcionalidad del intercepto | t _{tabla} = 2,12 | t _{exp} = 1,11 | t _{exp} = 0,72 |
| p=0,05 y n-2 grados de libertad | t _{exp} < t _{tabla} | | |
| libertad | | | |
| Precisión | | | |
| Repetibilidad (Rec., % ± DER, n=6) | | | |
| Nivel medio (100%) | | 100,8 ± 0,2 | 99,8 ± 0,4 |
| Precisión intermedia (Rec., % ± DER) | | | |
| Nivel bajo (90%) | | 100,4 ± 0,4 | 100,1 ± 0,5 |
| Nivel medio (100%) | | 100,5 ± 0,4 | 99,9 ± 0,3 |
| Nivel alto (110%) | | 100,1 ± 0,4 | 100,6 ± 0,7 |
| Recuperación global (% ± DER) | | 100,3 ± 0,3 | 100,2 ± 0,4 |
| ANOVA- F _{entre días} | F _(0,95; 2; 17) = 3,124 | F = 1,539 | F = 1,695 |
| ANOVA- F _{entre analistas} | F _(0,95; 2; 17) = 3,124 | F = 3,118 | F = 2,956 |
| Especificidad (Pureza de pico) | > 0,95 | 0,9995 | 0,9987 |

Exactitud

La exactitud se evaluó midiendo la recuperación del analito por el método de adición de estándar. Cantidades conocidas del analito fueron agregadas a una muestra de gotas pre-analizada con el método 1 y el método 2, conteniendo el equivalente al 80% de lo declarado, a fin de obtener muestras fortificadas con concentraciones correspondientes al 90, 100 y 110%. Cada una de las muestras fueron inyectadas tres veces. Los resultados de exactitud, expresados como porcentaje de analito recuperado en el ensayo y el correspondiente sesgo se muestran en las Tablas A.32 y A.34, donde el sesgo se calculó como la diferencia entre el porcentaje de analito efectivamente recuperado y el valor teórico (100%).

Tabla A.32 Maleato de enalapril. Resultados de la determinación de exactitud del método 1

| Concentración (mg mL ⁻¹) | | | | RSD (%) <i>n</i> =3 | Recuperación de analito (%) | Sesgo (%) |
|--------------------------------------|----------|--------|------------|------------------------|--------------------------------|--------------|
| Inicial | Agregado | Total | Encontrado | | | |
| 0,081 | 0,00 | 0,081 | 0,080 | 0,36 | 98,76 | -1,23 |
| 0,081 | 0,0095 | 0,0905 | 0,0907 | 0,45 | 100,58 | +0,58 |
| 0,081 | 0,0198 | 0,1008 | 0,1005 | 0,35 | 99,25 | -0,75 |
| 0,081 | 0,0298 | 0,1108 | 0,1105 | 0,42 | 99,73 | -0,27 |

Evaluación estadística

La Tabla A.33 resume los resultados de los parámetros estadísticos empleados para determinar la exactitud del método.

Tabla A.33 Maleato de enalapril. Resultados de los parámetros estadísticos para determinar la exactitud del método 1

| Análisis estadístico | |
|-------------------------------------------------|-------|
| Nº de muestras (n) | 9 |
| Recuperación promedio (R) (90-110%) | 99,85 |
| Desviación estándar (S) | 0,67 |
| Desvío estándar relativo (DER) (Máximo 5,0%) | 0,68 |

Resultado:

$t_{\text{tabla}} = 2,306$; para $9-1=8$ grados de libertad y $p=0,05$

$t_{\text{exp}} = 2,01$

Tabla A.34 Maleato de enalapril. Resultados de la determinación de exactitud del método 2

| Concentración (mg mL⁻¹) | | | | RSD (%) n=3 | Recuperación de analito (%) | Sesgo (%) |
|-------------------------------------------|-----------------|--------------|-------------------|------------------------|----------------------------------------|----------------------|
| Inicial | Agregado | Total | Encontrado | | | |
| 0,081 | 0,00 | 0,081 | 0,080 | 0,36 | 99,76 | -0,23 |
| 0,081 | 0,0095 | 0,0905 | 0,0908 | 0,45 | 100,85 | +0,85 |
| 0,081 | 0,0198 | 0,1008 | 0,1006 | 0,35 | 99,35 | -0,65 |
| 0,081 | 0,0298 | 0,1108 | 0,1110 | 0,42 | 100,32 | +0,32 |

Evaluación estadística

La Tabla A.35 resume los resultados de los parámetros estadísticos empleados para determinar la exactitud del método.

Tabla A.35 Maleato de enalapril. Resultados de los parámetros estadísticos para determinar la exactitud del método 2

| Análisis estadístico | |
|----------------------------------------|--------|
| Nº de muestras (n) | 9 |
| Recuperación promedio (R) (90-110%) | 100,17 |
| Desviación estándar (S) | 0,76 |
| Desvío estándar relativo (Máximo 5,0%) | 0,75 |

Resultado:

$t_{\text{tabla}} = 2,306$; para $9-1=8$ grados de libertad y $p=0,05$

$t_{\text{exp}} = -2,02$

Aptitud del sistema

La demostración de aptitud del sistema fue realizada de acuerdo con las indicaciones de la USP 38 para confirmar que el equipo era adecuado para efectuar los análisis. La prueba se llevó a cabo inyectando cinco replicados de una solución estándar conteniendo $0,10352 \text{ mg mL}^{-1}$ de ENA.

El correspondiente valor de DER fue menor al 2%, resultado satisfactorio de acuerdo con los requerimientos oficiales. El número de platos teóricos de la columna y el factor de coleo también fueron determinados, y sus correspondientes valores se listan en la Tabla A.36.

Tabla A.36 Maleato de enalapril. Resultados de la aptitud del sistema de los métodos 1 y 2

| Parámetro | Maleato de Enalapril | |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------|
| | Método 1 | Método 2 |
| Factor de coleo (t_f) | 1,28 | 1,5 |
| Platos teóricos (N) | 270 | 388 |
| DER (%) ^a | 0,54 | 0,66 |

^a Cinco replicados

Selectividad

La selectividad del método fue establecida determinando la pureza de pico usando un detector con arreglo de diodos bajo las condiciones cromatográficas citadas. Se encontró un valor de pureza de pico superior a 0,9995 para el método 1 y de 0,9987 para el método 2, respectivamente, evidenciando la aptitud de los métodos para determinar inequívocamente el analito de interés, es decir sin interferencias.

Además, para ambos métodos, se inyectaron soluciones de la matriz de la formulación y un estándar de Enalapril. No se observó la presencia de productos de degradación y los tiempos de retención para Enalapril en las formulaciones y la solución estándar fueron coincidentes.

Referencias bibliográficas del anexo

- 1- Cuadros-Rodríguez, L.; Valverde-Som, L.; Jiménez-Carvelo, A.M. and Delgado-Aguilar, M. (2020). Validation requirements of screening analytical methods based on scenario-specified applicability indicators. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*,122,115705.
- 2- Hokanson, G.C. (1994). A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, *Part I: The initial validation process*.
- 3- Salazar-Rojas, D.; Intilangelo, A.; Vignaduzzo, S. E. and Maggio, R.M. (2019). Development and validation of a green method for dissolution monitoring of pharmaceutical combinations. Meloxicam and pridinol. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*,170,228-33.
- 4- Ibrahim, A.E.; Saleh, H. and Elhenawee M. (2019). Assessment and validation of green stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of timolol and latanoprost in pharmaceutical dosage forms using eco-friendly chiral mobile phase, *Microchemical Journal*, 148, 21-6.
- 5- Raposo, F.and Ibelli-Bianco, C. (2020). Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*,129,115913.
- 6- Health UDo, Services H, FDA C. CVM. (2001) Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, *Food and Drug Administration*.
- 7- Do, T. K. T., Schmid, M., Phanse, M., Charegaonkar, A., Sprecher, H., Obkircher, M., & Reich, E. (2021). Development of the first universal mixture for use in system suitability tests for High-Performance Thin Layer Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1638, 461830.
- 8- FA. Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina (2003) <1130> Validación de Métodos Analíticos en Farmacopea Argentina, 7º Ed.; Vol. 1, Imprenta del Congreso de la Nación, Buenos Aires, Argentina.
- 9- Clementino, A., & Sonvico, F. (2018). Development and validation of a RP-HPLC method for the simultaneous detection and quantification of simvastatin's isoforms and coenzyme Q10 in lecithin/chitosan nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 155, 33-41.
- 10- ICH. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Topic Q9: Quality Risk Management Geneva; 2005.
- 11- Thompson, M., Ellison, S. L., & Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and applied chemistry*, 74(5), 835-855.
- 12- Epshtein, N. A. (2004). Validation of HPLC techniques for pharmaceutical analysis. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 38(4), 212-228.
- 13- Encarnação, T., Aguiar, A., Palito, C., Pais, A. A., Campos, M. G., Sobral, A. J., & Burrows, H. D. (2020). Development and validation of a RP-HPLC method for the simultaneous analysis of paracetamol, ibuprofen, olanzapine, and simvastatin during microalgae bioremediation. *MethodsX*, 7, 101083.
- 14- Gomes, H. D. O., Cardoso, R. D. S., da Costa, J. G. M., da Silva, V. P. A., Nobre, C. D. A., Teixeira, R. N. P., & do Nascimento, R. F. (2021). Statistical evaluation of

- analytical curves for quantification of pesticides in bananas. *Food Chemistry*, 345, 128768.
- 15- Quiñones-García, Y.A., Calvo-Alonso, A. M., Carabaloso-Noa, I. M., Alonso-Rodríguez, H. L. (2015). Reverse phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC) determination of a monobrominated impurity in Dermofural. Method Validation. *Rev. Cubana Quím.* 27 (2), 163-181.
 - 16- Crabbe, J. (1998). Robustness of Analytical Methods and Pharmaceutical Technological Products. *Computers and Chemistry*, 6(21), 453.
 - 17- Vander Heyden, Y., Nijhuis, A., Smeyers-Verbeke, J., Vandeginste, B. G. M., & Massart, D. L. (2001). Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 24(5-6), 723-753.
 - 18- Sharma, T., Khurana, R. K., Borges, B., Kaur, R., Katare, O. P., & Singh, B. (2021). An HPTLC densitometric method for simultaneous quantification of sorafenib tosylate and chrysin: Analytical method development, validation and applications. *Microchemical Journal*, 162, 105821.
 - 19- FDA, G. R. (1994). Validation of chromatographic methods. center for drug evaluation and research (CDER). *Food and Drug Administration*, 2.
 - 20- Youden, W. J., & Steiner, E. H. (1975). Statistical manual of the association of official analytical chemists.
 - 21- Palakurthi, A. K., Dongala, T., & Katakam, L. N. R. (2020). QbD based development of HPLC method for simultaneous quantification of Telmisartan and hydrochlorothiazide impurities in tablets dosage form. *Practical laboratory medicine*, 21, e00169.
 - 22- Vander Heyden, Y., Questier, F., & Massart, L. (1998). Ruggedness testing of chromatographic methods: selection of factors and levels. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 18(1-2), 43-56.
 - 23- Bonthu, M.G., Neelima, M.S., Raju, V.B., Sumanth, K.S., Mounika, P., Srinivas, K, et al. (2016). Development and validation of stability indicating reverse phase high-performance liquid chromatography method for simultaneous estimation of atenolol, hydrochlorothiazide and losartan in bulk and pharmaceutical dosage form. *Dev.*, 9(2), 118–24.
 - 24- Daraghmeh, N., Al-Omari, M., Badwan, A. A., & Jaber, A. M. Y. (2001). Determination of sildenafil citrate and related substances in the commercial products and tablet dosage form using HPLC. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 25(3-4), 483-492.
 - 25- Ali, T. A., Mohamed, G. G., Aglan, A. A., & Heikal, F. E. T. (2016). RP-HPLC stability-indicating method for estimation of irbesartan and hydrochlorothiazide in bulk and pharmaceutical dosage form. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 44(1), e1601-e1608.