
**Evaluación del desempeño de métodos para ensayos de disolución de metronidazol,
propranolol y ranitidina tabletas**

Autores: Yenny E. Maldonado¹, Yania Suárez², Maylinne P. Estrada¹, Henry Ponce¹

¹ Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH). Facultad de Química y Farmacia. Ciudad Universitaria. Edificio I1. Tegucigalpa, Honduras

² Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Cuba yaniasp@ifal.uh.cu ([autora para correspondencia](#))

Resumen

En la Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH) se realizan estudios para evaluar la equivalencia farmacéutica de diferentes formulaciones disponibles en el mercado hondureño. Para ello se requieren métodos analíticos válidos para cuantificar los analitos disueltos en los ensayos de disolución en las diferentes presentaciones que actualmente se comercializan en la ciudad de Tegucigalpa. En el presente trabajo se evaluó el desempeño de tres técnicas espectrofotométricas oficiales, simples y rápidas, para su aplicación a los ensayos de disolución de tabletas de metronidazol 500 mg, clorhidrato de propranolol 40 mg y clorhidrato de ranitidina 300 mg. Se seleccionaron los parámetros correspondientes a la categoría I y los criterios de aceptación vigentes para este tipo de método. Además, se evaluaron los parámetros intrínsecos de los ensayos de disolución exigidos para métodos manuales. Los métodos resultaron lineales, precisos y exactos en rangos de 6 a 24 µg/ mL para metronidazol, de 12 a 36 µg/ mL para clorhidrato de propranolol y de 6 a 16 µg/ mL para clorhidrato de ranitidina; por lo que pueden ser utilizados en tabletas de las mismas dosis que circulan en Tegucigalpa para investigaciones que requieran de este ensayo. Las disoluciones de referencia de los ingredientes farmacéuticos activos pueden ser utilizadas por un período de tres horas sin protección de la luz ni conservación a temperatura controlada, mientras que las muestras deben utilizarse en el menor plazo posible para no afectar la calidad de los resultados analíticos. El efecto del filtro resultó crítico en las respuestas analíticas, siendo este un paso obligatorio en los procedimientos evaluados.

Palabras clave: metronidazol, clorhidrato de propranolol, clorhidrato de ranitidina, ensayo de disolución, espectrofotometría UV

Performance evaluation of methods for dissolution tests of metronidazole, propranolol and ranitidine in tablets

Abstract

Studies are conducted at the National Autonomous University of Honduras (UNAH) to evaluate the pharmaceutical equivalence of different formulations available in the Honduran market. For this, valid analytical methods are required to quantify the analytes dissolved in the dissolution tests in the different presentations that are currently marketed in the city of Tegucigalpa. In the present work, the performance of three official, simple and fast spectrophotometric techniques was evaluated for their application to the dissolution tests of metronidazole 500 mg tablets, propranolol hydrochloride 40 mg and ranitidine hydrochloride 300 mg. The parameters corresponding to category I, and the current acceptance criteria for this type of method were selected. In addition, the intrinsic parameters of the dissolution test required for manual methods were evaluated. The methods were linear, precise and exact in ranges from 6 to 24 g/ mL for metronidazole, from 12 to 36 µg/ mL for propranolol hydrochloride and for 6 to 16 µg/ mL from ranitidine hydrochloride; reason why they can be used in tablets of the same doses that circulate in Tegucigalpa for investigations that require this trial. The reference solutions of the active pharmaceutical ingredients can be used for a period of three hours without protection from light or conservation at a controlled temperature, while the samples should be used as quickly as possible so as not to affect the quality of the analytical results. The effect of the filter was critical in the analytical responses, this being a mandatory step in the evaluated procedures.

Key words: metronidazole, propranolol hydrochloride, ranitidine hydrochloride, dissolution test, UV spectrophotometry

Introducción

Los medicamentos genéricos constituyen una alternativa apropiada para mejorar el acceso a los medicamentos que la población necesita y para dar sostenibilidad a programas de salud tanto públicos como privados. ¹ Los equivalentes farmacéuticos están definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como aquellos productos que contienen la misma cantidad de ingrediente farmacéutico activo (IFA), en la misma forma farmacéutica, están destinados a ser administrados por la misma vía y cumplen con estándares de calidad idénticos o comparables. ^{2,3}

Algunos países han incorporado en su legislación algunas pruebas de control de calidad de medicamentos alternativas a las pruebas de bioequivalencia y biodisponibilidad. Estas pruebas alternativas involucran perfiles de disolución y otras pruebas *in vitro* para la mayoría de los

medicamentos; mientras que las pruebas *in vivo*, se destinan sólo a un número reducido de medicamentos que las requieren.⁴

El ensayo de disolución es una prueba físico-química utilizada para evaluar la calidad de un producto farmacéutico tomando como base la velocidad de disolución de los IFA presentes en las formas de dosificación tributarias a este índice. Presenta las ventajas y limitaciones propias de un ensayo *in vitro*, pero cuando se presenta con un diseño adecuado, alerta sobre problemas potenciales de biodisponibilidad.⁵

En la Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH) se realizan estudios para comprobar la equivalencia farmacéutica de formulaciones diferentes de tabletas que contienen clorhidrato de propranolol (CIPr) 40 mg, metronidazol (MTZ) 500 mg y clorhidrato de ranitidina (CIRa) 300 mg respectivamente, que se encuentran disponibles actualmente en el mercado hondureño.

El CIPr es un agente bloqueante β -adrenérgico no selectivo, utilizado principalmente en el tratamiento de la hipertensión, arritmias cardíacas y en angina de pecho. Se clasifica como de riesgo sanitario intermedio.⁶ El MTZ es un antibacteriano, antiprotozoario y antihelmíntico ampliamente utilizado en infecciones de distinto origen.⁷ El CIRa es un antiácido, con acción similar a la cimetidina, que inhibe la secreción basal gástrica y la secreción gástrica ácida inducida por la histamina. Se usa en el tratamiento de úlceras duodenales, úlceras gástricas benignas, entre otras.⁸ Debido a que los tres IFA pertenecen a la clase I del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, solamente con estudios *in vitro* de disolución podrían ser considerados bioequivalentes de los respectivos productos de referencia.⁹

10

Para lograr este propósito, se hace necesario contar con las técnicas analíticas validadas para llevar a cabo los ensayos de disolución. La validación de un procedimiento analítico es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.¹¹ Los métodos analíticos se clasifican en varias categorías para su validación. Los empleados en los ensayos de disolución pertenecen a la categoría I y se clasifican como procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.¹² Además se requiere de la comprobación de la aptitud del sistema y de la evaluación de parámetros intrínsecos del ensayo de disolución.^{11, 12} Los métodos oficiales validados, cuando se aplican dentro de su alcance y sin modificaciones, requieren al menos, una evaluación del desempeño.¹³

Para el ensayo de disolución de las tabletas de metronidazol 500 mg, propranolol 40 mg y ranitidina 300 mg se recomiendan como métodos oficiales en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP)¹³, el uso de técnicas simples por espectrofotometría UV directa. Estas técnicas se fundamentan en la

determinación de la concentración de los analitos disueltos en las condiciones de operación descritas, a partir de las mediciones de las absorbancias de las muestras a longitudes de onda seleccionadas; contra los medios de disolución como ensayos de corrección y comparando la respuesta con disoluciones de referencia a las concentraciones establecidas como 100 % en cada caso.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en el presente trabajo se propuso como objetivo evaluar el desempeño de las técnicas analíticas oficiales por espectrofotometría UV para el ensayo de disolución de tabletas de metronidazol 500 mg, propranolol 40 mg y ranitidina 300 mg.

Materiales y métodos

Sustancias de referencia química:

- Sustancia de referencia química de clorhidrato de propranolol, pureza 99,62 % (patrón secundario donado por un laboratorio hondureño de especialidades farmacéuticas, vigencia 02/2021)
- Sustancia de referencia química de clorhidrato de ranitidina, pureza 103,77 % (patrón secundario donado por un laboratorio hondureño de especialidades farmacéuticas, vigencia 02/2021)
- Sustancia de referencia química de metronidazol, pureza 99,7 % (patrón secundario donado por un laboratorio hondureño de especialidades farmacéuticas, serie: 1220150363, vigencia 02/2021)

Disoluciones y reactivos:

- Ácido clorhídrico grado A.C.S (J.T. Baker, México) 36,5 %
- Disolución acuosa de ácido clorhídrico 0,1 mol/L
- Agua destilada obtenida mediante un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, Estados Unidos)

Productos terminados:

- Tabletetas de clorhidrato de propranolol 40 mg marca: Propan, fabricante: MC, Honduras.
- Tabletetas de metronidazol 500 mg marca: Amegyl, fabricante: Karnel, Honduras.
- Tabletetas de clorhidrato de ranitidina 150 mg marcas: Andifar y Genfar. Honduras

Equipos:

- Balanza analítica Explorer® Pro-OHAUS*, modelo: EP1145C, precisión 0,1; Estados Unidos.
- Baño ultrasónico BRANSON CPX 2800 ULTRASONIC BATH, México.
- Espectrofotómetro UV- SHIMADZU 1700, modelo: Lamdda 2S, No. de serie: A11024436909 CS, Japón.
- Disolutor*: Vankel, modelo: VK 7000, No. de serie: 1-3313-0394, Estados Unidos.

*El equipo fue previamente verificado para el trabajo en el laboratorio por el Dr. Oscar Osorto, de la empresa SIGMA (Tegucigalpa, Honduras).

Descripción de las condiciones experimentales aplicadas para la ejecución de los ensayos de disolución:

Se aplicaron las mismas condiciones descritas en las monografías oficiales de la Farmacopea de los Estados Unidos¹³ del 2017, correspondientes a cada tableta en estudio, las cuales se resumen en la Tabla I.

Preparación de las disoluciones de referencia (SR):

Se pesaron exactamente las cantidades requeridas de las sustancias de referencia de trabajo (55 mg de MTZ, 20 mg de CIPr y 80 mg de CIRa) y se colocaron por separado en matraces volumétricos de 50 mL. Se añadieron 25 mL de disolvente (el medio de disolución indicado en cada caso en la Tabla I) y las mezclas se sonicaron durante 10 minutos y se homogenizaron manualmente. Cuando alcanzaron la temperatura ambiente se llevó a volumen con el mismo disolvente. De las disoluciones resultantes se tomaron las alícuotas necesarias en cada caso para obtener las concentraciones de trabajo, diluyendo con el mismo disolvente utilizado como medio de disolución.

Tabla I. Condiciones experimentales utilizadas en los ensayos de disolución y determinación espectrofotométrica por UV del contenido de analito disuelto¹³

PARÁMETROS	METRONIDAZOL	CLORHIDRATO DE PROPANOLOL	CLORHIDRATO DE RANITIDINA
Aparato	1	1	2
rpm	100	100	50
Medio	HCl 0,1 mol/L	HCl diluido (1:100)	Agua destilada
Volumen del vaso (mL)	900	1000	900
Tiempo de ensayo (min)	60	30	45
Q (%)	≥ 85	≥ 75	≥ 80
Alícuota extraída del vaso (mL)	20	50	20
Alícuota filtrada para análisis (mL)	0,5	10	5
Concentración de trabajo (µg/mL)	16	2,4	10
λ (nm)	278	289	314

Preparación de la disolución muestra (Sm)

En cada vaso del equipo disolutor, se colocó una tableta y se ejecutó el ensayo en las condiciones establecidas.¹³ Una vez transcurrido el tiempo de ensayo, se tomó una muestra de cada vaso y se filtró a través de papel *whatman* N° 2. De aquí se extrajo la alícuota filtrada para análisis, se transfirió

- Prueba de proporcionalidad del método analítico o hipótesis nula de la ordenada en el origen $a = 0$. Se empleó la prueba estadística t de *Student* para $n-2$ grados de libertad, siendo n el número total de valores; donde: si t experimental (t_{exp}) $<$ t tabulada (t_{tab}) no existieron diferencias significativas entre el intercepto y el origen.
- Prueba de la hipótesis nula de la pendiente: $b = 0$. Se determinó a partir de una prueba ANOVA de la regresión. Si la probabilidad (p) asociada al valor de la pendiente, $p \ll 0,05$; el valor de “ b ” difiere significativamente de cero.
- $CV_f \leq 5 \%$

En la determinación de la **exactitud** se emplearon muestras enriquecidas para tres niveles de concentración (bajo, medio y alto) del intervalo de la linealidad del sistema correspondiente a cada analito. Se estimó la concentración real (%) a partir de las absorbancias obtenidas en el análisis por triplicado en cada nivel de concentración de muestras reales (tabletas) enriquecidas con los analitos para alcanzar las concentraciones deseadas. Se construyeron las curvas de recuperación de concentración real (%) vs concentración teórica (%) para cada analito. Los resultados fueron procesados estadísticamente de igual forma que las curvas de calibración de la linealidad del sistema. Además, se calcularon los porcentos de recobro (R) y se determinaron los valores de recobrado medio (\bar{R}) y los CV. Se realizó la prueba G de *Cochran*, para determinar si el factor concentración tuvo alguna influencia en los resultados. El valor de G experimental (G_{exp}) se comparó con la G tabulada (G_{tab}) para $\alpha = 0,05$; tres grupos experimentales (k) y tres réplicas (n). Por último, se aplicó la prueba t de *Student* para evaluar si existieron diferencias significativas entre el valor medio de recobrado obtenido y el 100 %.

Criterios de aceptación:

- ✓ \bar{R} : 97 – 103 %
- ✓ $CV \leq 3,0 \%$
- ✓ Si $G_{exp} < G_{tab}$ las varianzas de las tres concentraciones fueron equivalentes, o lo que es igual, el factor concentración no influyó en la variabilidad de los resultados.
- ✓ Si $t_{exp} < t_{tab}$, no existieron diferencias significativas entre \bar{R} y el 100 %.

La **precisión** se evaluó a dos niveles con muestras reales: tabletas de CIPr (Propan), de MTZ (Amegyl) y CIRa (Zantac y Genfar), dentro del mismo laboratorio.

- **Repetibilidad:** Se realizó a través del análisis sextuplicado de las tabletas (una por vaso). Participó el mismo analista, el mismo día, en el mismo equipo. Se determinó el CV.

- **Precisión intermedia:** Participaron dos analistas, en dos días diferentes, realizando análisis por sextuplicado. Se determinó el CV y se compararon las contribuciones de las fuentes de variación: día/analista, a través de la prueba ANOVA empleando el programa *STATGRAPHICS* Plus 5.1*.

Criterios de aceptación:

- ✓ $CV \leq 3,0 \%$.
- ✓ *Si $p > 0,05$; no existieron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras a comparar (solo para precisión intermedia).

Estabilidad de las soluciones analíticas: Se midieron por triplicado las absorbancias a las λ seleccionadas para la cuantificación de cada analito en las disoluciones SR y Sm recién preparadas, utilizando el mismo procedimiento descrito con anterioridad. Posteriormente se almacenaron a temperatura ambiente (30 ± 2 °C) por un período de tres horas, no protegidas de la luz. Cada 60 minutos se midieron los valores de absorbancia correspondientes a las SR y Sm. Los resultados se utilizaron para calcular las concentraciones (%), las cuales se compararon entre muestreos para el mismo tipo de muestra (SR y Sm) a través del análisis de varianza (ANOVA) y el test de Rangos múltiples de Duncan, para identificar entre cuáles muestras existieron diferencias significativas. Además, se construyeron los gráficos de aceptación. Se utilizó el programa *STATGRAPHICS* Plus 5.1. A partir de los resultados obtenidos se definieron los períodos máximos de conservación para SR y Sm, respectivamente.

Criterios de aceptación:

- Las disoluciones SR y Sm se consideraron estables, si en el intervalo de tiempo analizado, las respuestas analíticas no mostraron variaciones superiores al 2 % respecto a los valores iniciales (disoluciones recién preparadas) y se mantuvieron en el intervalo de 98 a 102 %. ¹¹
- Si $p > 0,05$; no existieron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras a comparar.

Evaluación del efecto del filtro

Se prepararon por triplicado SR y Sm de cada analito. En cada caso se compararon los resultados de las absorbancias resultantes de las disoluciones filtradas (con papel filtro *whatman* N° 2) con los resultados sin filtrar. Las disoluciones fueron preparadas en iguales intervalos de tiempo (recién elaboradas). Además, se calcularon las medias, las DE y los CV. Se determinó el efecto del filtro a través de la comparación de las medias de las muestras filtradas y sin filtrar a través del análisis de varianza (ANOVA) con el programa *STAGRAPHICS* Plus 5.1.

Criterio de aceptación: Si $p > 0,05$; no existieron diferencias significativas entre las muestras filtradas y sin filtrar para SR y Sm, respectivamente.

Resultados

En la Tabla II se resume el procesamiento estadístico de las curvas de calibración obtenidas en los ensayos de linealidad del sistema para cada IFA. Las ecuaciones de regresión, tuvieron elevados coeficientes de correlación lineal y de determinación, muy próximos a la unidad, acorde a los criterios establecidos. Los interceptos no difieren significativamente de cero, ya que las t experimentales fueron inferiores a la t tabulada (2,16) y $p > 0,05$. Las pendientes fueron significativas con valores de t alto y $p \ll 0,05$. Los factores respuesta dieron variación permisible, con valores inferiores al 5 % establecido como límite para el CVf. Se observó el peor comportamiento para el MTZ.

Tabla II: Resultados del procesamiento estadístico por regresión lineal de las curvas de calibración de la linealidad del sistema

PARÁMETRO	METRONIDAZOL	CLORHIDRATO DE PROPRANOLOL	CLORHIDRATO DE RANITIDINA
Ecuación	$Y=0,3738X-0,0030$	$Y=0,0018X-0,0001$	$42,8126X + 0,0024$
r	0,9961	0,9962	0,9993
r^2	0,9922	0,9924	0,9986
Significación del intercepto	$t_{exp} = -0,1984$ $p=0,8485$	$t_{exp} = -0,1196$ $p=0,9906$	$t_{exp} = 0,5170$ $p=0,6138$
Significación de la pendiente	$t_{exp} = 40,7212$ $p= 0,0000$	$t_{exp} = 44,2313$ $p= 0,0000$	$t_{exp} = 102,6650$ $p=0,0000$
CV _f (%)	4,2964	3,0362	1,2339

Para evaluar el parámetro **exactitud** se determinó el porciento de recobro (R) de los puntos equivalentes a tres niveles de concentración y se construyeron las curvas de recuperación correspondientes. Cuando se llevó a cabo el procesamiento estadístico (Ver Tabla III) se comprobó el cumplimiento de todos los criterios exigidos según la regresión lineal aplicada.

Los coeficientes de recobrado medio quedaron dentro del límite permitido para métodos espectrofotométricos y en correspondencia los CV totales. Por otra parte, a través de la prueba t de *Student* se corroboró que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los recobrados medios y el 100 %, ya que las t obtenidas fueron inferiores a la tabulada. La influencia de la concentración de analito no influyó en la varianza (S) de los resultados. Como la $G_{exp} < G_{tab}$ las varianzas de los tres niveles de concentración evaluados fueron equivalentes, no influyó el factor concentración en la variabilidad de las respuestas medidas.

Tabla III: Resultados de la exactitud de los métodos y procesamiento estadístico por regresión lineal de las curvas de recuperación

PARÁMETRO	METRONIDAZOL	CLORHIDRATO DE PROPANOLOL	CLORHIDRATO DE RANITIDINA	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
Ecuación	$Y=1,011X-0,1141$	$Y=0,9961X-0,3755$	$Y=0,9917X+0,7781$	$y = bx+a$
r	0,9994	0,9998	0,9999	$r \geq 0,99$
r ²	0,9987	0,9995	0,9999	$r^2 \geq 0,98$
Significación del intercepto	$t_{exp} = -0,086$ $p = 0,9335$	$t_{exp} = -0,488$ $p = 0,6399$	$t_{exp} = 1,555$ $p = 0,3668$	$t_{exp} < t_{tab}(2,16);$ $\alpha=0,05;$ $n=13$ $p>0,05$
Significación de la pendiente	$t_{exp} = 81,4822$ $p = 0,0000$	$t_{exp} = 140,0620$ $p = 0,0000$	$t_{exp} = 372,25$ $p = 0,0000$	$t_{exp} > t_{tab}(2,16);$ $\alpha=0,05; n=13$ $p \leq 0,005$
CV _f (%)	1,6265	0,8782	0,5714	$CV_f \leq 5 \%$
R medio (%)	100,81	99,15	100,02	97 -103
CV _{R total} (%)	1,65	0,88	0,57	≤ 3
t Student (comparación con 100 %)	$t_{exp} = 0,4387$	$t_{exp} = 0,2497$	$t_{exp} = 0,0038$	$t_{exp} < t_{tab} (12,7)$
Prueba de Cochran	$G_{exp} = 0,3634$	$G_{exp} = 0,3638$	$G_{exp} = 0,4148$	$G_{exp} < G_{tab} (\alpha = 0,05; K=3; n=3);$ $G_{tab} = 0,8709$

Los resultados de la **precisión** evidenciaron una gran concordancia entre las réplicas, en condiciones de repetibilidad y de precisión intermedia, lo cual se expresó por $CV < 3 \%$. No existió efecto significativo de las fuentes de variación: día/analista en los resultados, pues en cada método se obtuvieron valores de $p > 0,05$ al comparar las fuentes de variación (Tabla IV).

Los resultados obtenidos en la evaluación de la **estabilidad de SR y Sm** se muestran en la Figura 1, a través de los gráficos de aceptación.

Para las SR, se observó ligera variación en el tiempo para CIRa (a las tres horas) y transcurrida la primera hora para el ClPr, mientras que el MTZ reflejó gran estabilidad. Los cambios de concentración fueron mínimos y no describieron tendencias. Todos los valores estuvieron dentro de los límites especificados (98 - 102 %), muy cercanos al 100 %. Estos resultados fueron confirmados estadísticamente, donde los valores obtenidos de p superaron ampliamente al 0,05 en cada caso ($p_{MTZ} = 0,3829$; $p_{ClPr} = 0,1147$ y $p_{CIRa} = 0,7241$); por lo que no existieron diferencias significativas ni entre réplicas ni entre muestras durante el período analizado.

Tabla IV. Resultados de la precisión de los métodos analíticos

Parámetros	Metronidazol		Clorhidrato de propranolol		Clorhidrato de ranitidina	
Repetibilidad						
Absorbancia media	0,7385		0,5146		0,4939	
DE	0,0073		0,0032		0,0014	
CV (%)	0,9946		0,6374		0,2752	
Precisión intermedia						
Fuentes de variación	ANALISTA 1/ DIA 1	ANALISTA 2/ DIA 2	ANALISTA 1/ DIA 1	ANALISTA 2/ DIA 2	ANALISTA 1/ DIA 1	ANALISTA 2/ DIA 2
Concentración media (%)	97,80	98,69	107,77	107,03	101,82	101,93
DE	0,49	1,00	0,67	0,80	0,46	1,01
CV (%)	0,50	1,01	0,72	0,75	0,45	1,00
Concentración media (%)	98,18		107,40		101,53	
DE	0,87		0,80		0,74	
CV total (%)	0,89		0,75		0,73	
p	0,08		0,11		0,07	

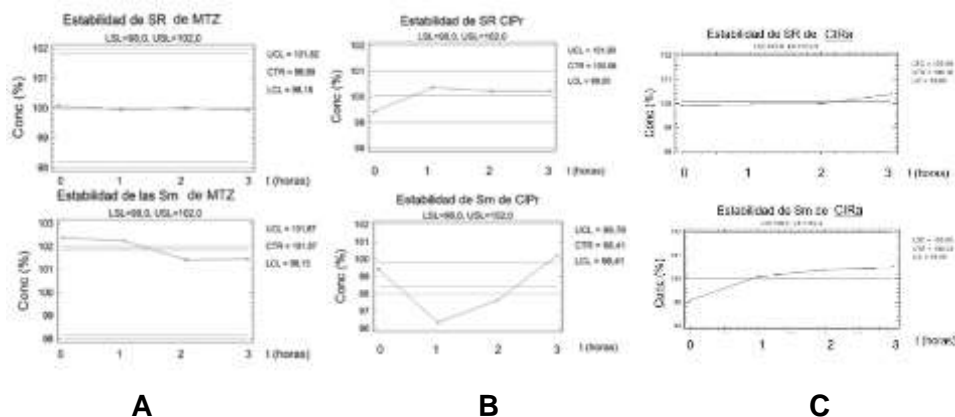


Figura 1. Gráficos de aceptación para estabilidad de SR y Sm: A: Metronidazol (MTZ), B: Clorhidrato de propranolol (CIPr) y C: Clorhidrato de ranitidina (CIRa)

Sin embargo, para las Sm, aunque en cada momento (t) las dispersiones observadas fueron mínimas denotando gran correspondencia entre réplicas; se obtuvieron diferencias significativas entre muestreos para el MTZ y el CIPr para un 95 % de confianza ($p_{MTZ} = 0,0000$; $p_{CIPr} = 0,0000$). En el caso del CIRa se superó ligeramente el valor límite ($p = 0,05$), $p_{CIRa} = 0,0510$; por lo que no existieron diferencias significativas entre muestreos, confirmando la mayor estabilidad de Sm_{CIRa}. Para el MTZ

se describió una tendencia a la disminución de la absorbancia en el tiempo, a partir de la primera hora de almacenamiento con valores iniciales de concentración fuera del rango recomendado (98 -102 %), y diferencias significativas entre las absorbancias entre muestreos, con excepción de t2 y t3, según la prueba de contraste de rangos múltiples de Duncan. Al analizar los resultados de Sm para el CIPr, se detectó un desplazamiento importante de la línea central (98,41 %) hacia el límite inferior del rango permitido (98 %); así como inestabilidad de la respuesta analítica en el tiempo, denotando una caída importante a los 60 minutos (t1) seguido de un incremento. Tanto a t1 como a t2 los valores estuvieron fuera del rango deseado y aunque a partir de los incrementos observados después de t2, no se superó el 102 %; ni las diferencias fueron significativas estadísticamente; se recomienda no usar las soluciones Sm de CIPr por períodos de tiempo prolongados, dado a las variaciones respecto al rango deseado en más de un 2 %. Afortunadamente, el ensayo de disolución tiene solo 30 minutos de duración.¹³

Para Sm_{CIRa} se observó una ligera tendencia al incremento de la absorbancia en el tiempo, aunque no fue significativa desde el punto de vista estadístico, no superó la variación de 2 % respecto al valor inicial, manteniéndose en el intervalo deseado durante las tres horas de ensayo.

Estos resultados indicaron que las Sm del MTZ y del CIPr fueron inestables y deben utilizarse en tiempos lo más próximos posibles a su preparación, en aras de asegurar mayor confiabilidad en los resultados analíticos; mientras que Sm de CIRa puede emplearse durante tres horas sin control de temperatura ni protección frente a la luz.

El efecto del filtro, constituye también parte de los ensayos intrínsecos de los métodos utilizados en ensayos de disolución, según se recomienda en las regulaciones vigentes.¹¹ En la Tabla V se resumen los resultados obtenidos para las SR y Sm de cada analito antes y después de filtrar.

Tabla V. Efecto del filtro en Sm recién preparadas de los analitos en estudio

VALORES DE ABSORBANCIA A λ MÁXIMA					
Sm de MTZ		Sm de CIPr		Sm CIRa	
Con filtro	Sin filtro	Con filtro	Sin filtro	Con filtro	Sin filtro
0,6996	0,8138	0,4873	0,4974	0,4032	0,5163
0,6992	0,8135	0,4888	0,4978	0,4028	0,5196
0,6992	0,8132	0,4889	0,4976	0,4028	0,5143
X = 0,6963	X = 0,3135	X = 0,4880	X = 0,4976	X = 0,4029	X = 0,5167
DE=0,0003	DE= 0,0003	DE= 0,0008	DE=0,0002	DE=0,0002	DE=0,0027
CV =0,0330 %	CV = 0,3680 %	CV = 0,1643 %	CV =0,0402 %	CV =0,0573 %	CV =0,5180 %
p (ANOVA) = 0,000 *		p (ANOVA) = 0,000 *		p (ANOVA) = 0,000*	

**hay diferencias significativas*

Las réplicas mostraron gran similitud entre los valores de absorbancia para cada caso, reflejando dispersiones mínimas con muy bajas DE y CV. Sin embargo, al comparar en cada caso las absorbancias antes y después de filtradas las muestras; las $p=0,00 < 0,05$; por lo quedó demostrada la necesidad de filtrar las soluciones. En los tres analitos la lectura de las S_m directamente, provocó incrementos en la absorbancia que fueron más marcadas para el MTZ, lo cual sugiere posibles interferencias en las determinaciones analíticas cuando se utilizaron muestras reales.

Discusión

La sencillez y rapidez de la espectrofotometría UV lo convierte en un método de elección para realizar ensayos de disolución, siendo uno de los métodos más recomendados en las monografías oficiales para estos propósitos. La adaptación de los métodos consistió solo en realizar los ajustes necesarios para las preparaciones de SR y S_m , a través de la definición de las concentraciones de trabajo a las λ máximas. Los ajustes tuvieron como objetivo obtener valores adecuados de absorbancia, ya que en la farmacopea no se especifican estas condiciones experimentales.¹³

El Clra es muy soluble en agua, el MTZ es soluble en HCl diluido y moderadamente soluble en agua, mientras que el ClPr en medio ligeramente ácido se mantiene en forma de sal, soluble en medio acuoso.¹³ De ahí que se mantuvieran las mismas condiciones propuestas como medio de disolución, para la preparación de SR y S_m (medio como disolvente).

Al mantener los mismos procedimientos, en los que se proponen solo cambios menores, no variar el alcance (ensayo de disolución) y ser métodos oficiales; no se requiere una validación exhaustiva, sino solo una evaluación del desempeño que confirme, a través de la evaluación de algunos parámetros, la validez de los métodos para el uso previsto.¹¹ Por eso se llevó a cabo el análisis de tres de los parámetros exigidos para métodos clasificados como de contenido o potencia: linealidad, precisión y exactitud y se adicionaron dos parámetros específicos para ensayos de disolución que se ejecutan por procedimientos manuales: la estabilidad de las disoluciones y el efecto del filtro.¹¹

Los resultados del procesamiento estadístico de las linealidades de los tres sistemas, avalaron la proporcionalidad existente entre la respuesta analítica y la concentración de cada analito en el rango analizado. La obtención de elevados valores de r y r^2 no fue suficiente, se realizó la evaluación de otros parámetros necesarios para confirmar la linealidad. La línea recta debe ubicarse lo más próxima posible al centro del cuadrante. Significa que el intercepto (a) ≈ 0 y la pendiente (b) ≈ 1 . El cumplimiento de todos los criterios permitió afirmar que no se presentaron errores proporcionales o dependientes de la concentración en los rangos estudiados. La mayor variación de los valores de f (CVf) se obtuvo para el MTZ. Se atribuyó a que para este analito se realizaron lecturas de absorbancia más próximas a la unidad para los dos niveles de concentración superiores al 100 %, implicando riesgos mayores de error en las lecturas espectrofotométricas.

El cumplimiento satisfactorio de todos los criterios de aceptación para la exactitud de los métodos permitió afirmar que las técnicas no se afectaron por errores sistemáticos de forma significativa, por lo que se pueden obtener valores experimentales muy próximos a los valores verdaderos, sin sesgo entre valores teóricos y experimentales, ni por exceso ni por defecto, al evaluar muestras enriquecidas con concentraciones conocidas.

Los métodos fueron suficientemente repetibles, con resultados experimentales concordantes al realizar análisis repetidos por el mismo analista en el mismo laboratorio. La elevada concordancia observada ratificó la elevada precisión intra día.

Las determinaciones realizadas por un analista de mayor experiencia (analista 1/ día 1), mostró las menores dispersiones entre los resultados, siendo más evidentes para el MTZ y CIRa. Estos resultados reflejaron la importancia de la experiencia de quien ejecuta el ensayo, aunque se trate de procedimientos simples, con pocos pasos. No obstante, no impactaron desde el punto de vista estadístico las diferencias entre días/analistas (Tabla IV). El cumplimiento de los criterios de aceptación para los parámetros repetibilidad y precisión intermedia ratificó la precisión de los métodos para cuantificar el analito disuelto en ensayos de disolución, por lo que pueden ser aplicados con estos propósitos, sin influencia significativa de los errores aleatorios. Los intervalos analizados se correspondieron con los recomendados para el uso previsto de estos métodos: ensayos de disolución ($\pm 20\%$ de la cantidad especificada = Q).

Las SR y Sm se deben almacenar bajo condiciones que aseguren su estabilidad, durante un periodo específico, siendo el intervalo aceptable una variación no mayor del 2 %, respecto al momento de la preparación (con concentraciones entre 98 % y 102 %); o de lo contrario, se debe asignar el tiempo de vida útil de las mismas. De ahí que la determinación de este período sea muy importante y constituya un parámetro intrínseco de los métodos a utilizar en los ensayos de disolución. La información que deriva de estos ensayos asegura que no ocurran desviaciones en la respuesta analítica debida a cambios operados en la concentración de los analitos por el deterioro que puedan sufrir durante el almacenamiento. En el caso de la espectrofotometría UV, que no resulta una técnica indicadora de la estabilidad química (usualmente los grupos cromóforos permanecen inalterados en los productos de degradación), tiene un gran valor conocer la estabilidad de las soluciones que pudieran expresarse como incrementos o disminuciones de las absorbancias en el tiempo.

Para el MTZ se reconoce el impacto de la temperatura y la luz en su estabilidad, recomendando su conservación en envases bien cerrados, protegidos de la luz y a temperatura controlada.¹³ De igual forma, para el CIPr también la luz es un factor externo reconocido por su importancia en la estabilidad¹³, que pudiera afectar la conservación de muestras y patrones. Para el CIRa se recomiendan envases impermeables y resistentes a la luz.¹³ Como las tres moléculas presentan

grupos fácilmente oxidables, sensibles a reacciones degradativas foto inducidas, se mantuvieron las SR y Sm expuestas a la luz, por representar un riesgo potencial que pudieran afectar la concentración de los analitos en muestras y patrones, pues no se protegen durante la ejecución de los ensayos de disolución.

Todas las SR fueron estables, sin necesidad de protegerlas de la luz, ni de controlar la temperatura, por lo que los riesgos de degradación no impactaron negativamente transcurridos tres horas de preparadas. Sin embargo, no se recomienda el uso de las Sm del MTZ ni del CIPr transcurrido un tiempo de preparadas, debido a las variaciones observadas en la respuesta (absorbancia), mientras no se realicen estudios posteriores que permitan establecer condiciones especiales de conservación o definir períodos de conservación en condiciones diferentes de operación.

El efecto del filtro es un parámetro que se debe estudiar debido a la necesidad de filtrar los medios de disolución antes de comenzar el ensayo y antes de la cuantificación. Típicamente se utiliza un filtro desechable con un tamaño de poro entre 0,2 y 10 μm . El mismo, además, debe ser compatible con el medio de disolución y no debe alterar significativamente la concentración del medicamento en la solución.^{5, 11} Los resultados demostraron que el efecto del filtro resultó crítico en las respuestas analíticas, por lo que no se puede eliminar este paso de los procedimientos propuestos.

Teniendo en cuenta el cumplimiento satisfactorio de los criterios de aceptación para la linealidad, exactitud y precisión de los métodos espectrofotométricos, los mismos se consideraron válidos para el objetivo propuesto en el intervalo de 6 a 24 $\mu\text{g/mL}$ (37,5 a 150 %) para el MTZ, de 12 a 36 $\mu\text{g/mL}$ (50 a 150 %) para el CIPr y de 6 a 16 $\mu\text{g/mL}$ (60 a 160%) para CIRa.

Referencias

1. Sánchez C. Experiencia Reguladora Cubana en Calidad y Bioequivalencia para la Intercambiabilidad Terapéutica de Medicamentos Genéricos. Acta Farmacéutica Bonaerense; 2006, 25: 468.
2. ANMAT. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. La ANMAT y la bioequivalencia. Boletín para Profesionales; 2002: 39.
3. Hernández G, Moreno A, Zaragoza F, Porras A. Medicamentos genéricos, requisitos para su comercialización. Tratado de medicina farmacéutica. Madrid: Medica Panamericana, 2010: 539.
4. AIS. Acción Internacional para la Salud. Géneros y bioequivalencia: balance y perspectivas en América Latina, 2004. [En línea] Disponible en: <http://www.med-informatica.com/TERAPEUTICA-STAR/GenericosBioequivalenciaAIS2004.pdf> [Consultado: diciembre 15, 2016]

-
5. CECMED. Centro para el control estatal de la calidad de los medicamentos. Regulación 48. Requisitos para aplicar y/o diseñar un ensayo de disolución en cápsulas y tabletas de liberación inmediata. Cuba, 2007.
6. Volonté M, Escales M, Gorriti C. Equivalencia farmacéutica de comprimidos conteniendo Clorhidrato de Propranolol. Acta Farmacéutica Bonaerense; 2005, 24: 538.
7. Velázquez L, Moreno A, Lizasoain I, Leza J, Moro M, Portolés A. Fármacos antiparasitarios. En: Farmacología Básica y Clínica. Buenos Aires, Argentina: Médica panamericana, 2008: 893.
8. Flórez J. Farmacología humana. 5^{ta} ed. Barcelona: Masson Ed, 2008: 827, 828
9. Volonté M, Ruiz E, Rubini A, Pozzo R. Equivalencia farmacéutica de comprimidos conteniendo Metronidazol 500 mg. Latin American Journal of Pharmacy; 2008, 27: 887.
10. Plasencia P, Ruidías D, Quiliche J, Sánchez Y. Bioequivalencia in vitro de tabletas de propranolol 40 mg multifuente e innovador. Farmaciencia; 2013: 29.
11. CECMED. Centro para el control estatal de medicamentos, equipos y dispositivos médicos. Regulación 37. Buenas Prácticas de Laboratorio para el Control de Medicamentos, Cuba. 2012: 33-34
12. Eurolab España. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. 1^a ed. Morillas y col. Eds., 2016: 40. Disponible en: <http://www.eurachem.org>
- Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 40) y 35^a ed del Formulario Nacional (NF 35). US Pharmacopoeial Convention, Inc. Washington DC, Vol 3; 2017: 5643, 6407, 6473 [versión digital]
-